

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS ÊNFASE EM BIOLOGIA MARINHA E
COSTEIRA

LETÍCIA BASTOS DE MATOS

ANÁLISE DA MICROBIOTA AERÓBIA ORAL DE DUAS SERPENTES:
Philodryas patagoniensis e *Xenodon dorbignyi* DE UMA REGIÃO DE DUNAS NO
LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

IMBÉ

2012

LETÍCIA BASTOS DE MATOS

ANÁLISE DA MICROBIOTA AERÓBIA ORAL DE DUAS SERPENTES:
Philodryas patagoniensis e *Xenodon dorbignyi* DE UMA REGIÃO DE DUNAS NO
LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em Ciências
Biológicas com ênfase em Biologia Marinha
e Costeira nas Universidades Federal e
Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Marisa da Costa

Co-orientador: Roberto Baptista de Oliveira

IMBÉ

2012

M433a Matos, Letícia Bastos

Análise da microbiota aeróbia oral de duas serpentes: *Philodryas patagoniensis* e *Xenodon dorbignyi* de uma região de dunas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

47f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha, Imbé / Cidreira, 2012.

Orientação: Profa. Dra. Marisa da Costa.

Co-orientação: Dr. Roberto Baptista de Oliveira.

1. Microbiota oral. 2. Serpentes. 3. *Philodryas patagoniensis*. 4. *Xenodon dorbignyi*. 5. Litoral Norte do Rio Grande do Sul. I. Costa, Marisa da, orient. II. Oliveira, Roberto Baptista, coorient. III. Título.

LETÍCIA BASTOS DE MATOS

ANÁLISE DA MICROBIOTA AERÓBIA ORAL DE DUAS SERPENTES:
Philodryas patagoniensis e *Xenodon dorbignyi* DE UMA REGIÃO DE DUNAS NO
LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em Ciências
Biológicas com ênfase em Biologia Marinha
e Costeira nas Universidades Federal e
Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: /..... /.....

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Patricia Valente /UFRGS

Msc. Cariane Campos Trigo/ CECLIMAR

Prof. Dr. Eduardo G. Barbosa

Dedico este trabalho as pessoas que lutam diariamente ao meu lado tornando os meus dias mais felizes e bonitos. Aos meus pais Solon e Claudete e aos meus irmãos Silvio Junior e Andreson. Sem vocês eu não seria nada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Solon e Claudete, pelo apoio sentimental e financeiro, por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, dando conselhos e aliviando minhas angústias. Obrigada por todo amor e carinho oferecidos e por serem, para mim, referência de caráter e honestidade.

À orientadora Marisa da Costa pela qual possuo profunda admiração e respeito, por ter auxiliado este trabalho com paciência e dedicação e ter confiado em mim para a execução do mesmo.

Ao co-orientador deste trabalho, Roberto Baptista de Oliveira, por ter dedicado muitas horas do seu tempo em campo procurando as espécies analisadas. Obrigada por toda a atenção que deu a este projeto e a mim, esclarecendo dúvidas e fazendo sugestões, tu fostes essencial para a realização deste trabalho!

Às amigas e colegas do curso de biologia marinha, Beatrix, Camila Rigon, Fernanda, Priscila Moraes e Thamara pelo companheirismo. Estávamos juntas nas horas de alegria tomando um “cafezinho” no Shekina e nos momentos de aflição estudando a madrugada inteira para provas difíceis. Pelas risadas que demos, fator importantíssimo para aliviar o stress do final do semestre.

Aos colegas do laboratório 165 de microbiologia, Ester, Jozi e Renê pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais e paciência ao esclarecer minhas dúvidas.

À professora Patricia e à Cariane, por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho. Admiro muito vocês.

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande”

Louis Pasteur, Cientista Francês † 1895.

RESUMO

Durante o período de outubro de 2011 a janeiro de 2012 foram coletadas 18 amostras da cavidade oral de duas serpentes das espécies *Philodryas patagoniensis* e *Xenodon dorbignyi* em uma região de dunas da localidade Magistério, município do Balneário Pinhal, situado na Planície Costeira do Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil, com objetivo de analisar a microbiota aeróbia oral dos exemplares de serpentes coletadas e avaliar se esta pode constituir fonte de infecção no local da picada em caso de acidentes, bem como se pode resultar em e/ou ser a causa de doenças infecciosas nessas espécies. Ambas as espécies estão entre as mais frequentemente encontradas na área de estudo, que vem sofrendo, assim como a maioria das regiões costeiras, uma grande expansão de ocupações urbanas e um crescimento populacional acelerado. Isto resulta em um contato, cada vez mais frequente, entre humanos e estas serpentes e conseqüentemente um maior risco de acidentes ofídicos, especialmente no caso de *P. patagoniensis*, devido ao seu comportamento agressivo. Já *X. dorbignyi*, apesar de apresentar comportamento defensivo elaborado, não é agressiva, de forma que não ocasiona acidentes ofídicos. As amostras foram coletadas em campo tocando um suábe estéril na cavidade oral das serpentes e armazenando em meio de transporte *Stuart* até o laboratório. Então, alíquotas de 0,1 ml de diluições decimais seriadas foram semeadas em placas contendo meio Agar sangue de carneiro desfribinado 5% e incubadas a 37°C por 48 h. Após esse procedimento, realizou-se a quantificação das colônias observadas. Todas as amostras apresentaram crescimento bacteriano e a carga microbiana variou entre $2,4 \times 10^2$ UFC/ ml a $> 3 \times 10^5$ UFC/ ml, sendo que a diluição 1/ 1000 foi a que melhor apresentou uma quantidade adequada para a contagem (entre 30 e 300 colônias). Obteve-se um total de 34 isolados bacterianos e esses foram submetidos a análises da morfologia celular e colonial e provas bioquímicas para a identificação. Foram encontrados cocos e bacilos Gram positivos e ainda bastonetes Gram negativos. Esses últimos foram os mais frequentes, ocorrendo em 68% das amostras analisadas. Até o presente momento, alguns isolados foram identificados quanto ao gênero, são eles: *Aeromonas*, *Aureobacterium*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Proteus*. Sendo esse último encontrado apenas em amostras provenientes de *P. patagoniensis*. *Proteus* e

Aeromonas já foram isolados de abscessos causados por acidentes ofídicos e como causadores de doenças infecciosas em serpentes.

Palavras-chave: Microbiota oral. Serpentes. *Philodryas patagoniensis*.
Xenodon dorbignyi.

ABSTRACT

From October 2011 until January 2012, samples from the mouth of 18 snakes of two species (*Philodryas patagoniensis* and *Xenodon dorbignyi*) were collected in a region of dunes in Magistério, municipality of Balneário Pinhal, situated in the Coastal Region of Rio Grande do Sul, Brazil, with the objective of analyzing the aerobic oral microbiota of the snakes and to evaluate if the bacteria found can be source of infection on the snakebite site or cause infection diseases in snakes. Both species are among the most frequently found in the study area, which has suffered, like most coastal regions, a major expansion of urban occupations, and a rapid population growth, resulting in an ever more frequent contact between humans and these snakes, and consequently a higher risk of snakebites, especially in the case of *P. patagoniensis* due to its aggressive behavior. Unlike *P. patagoniensis*, *X. dorbignyi*, despite having an elaborated defensive behavior is not aggressive, so does not cause snakebites. The samples were collected in the natural environment of this species passing a sterile swab in the oral cavity of snakes and stored in Stuart transport medium until the laboratory. Then, 0.1 ml aliquots of decimal dilutions were plated on agar medium containing defibrinated sheep blood 5% and incubated at 37°C for 48 h. After this procedure, the quantification of colonies was performed. All samples showed bacterial growth and the microbial load ranged from 2.4×10^2 CFU / ml to $> 3 \times 10^5$ CFU / ml, and the dilution 1/1000 presented an appropriate amount of colonies for counting (30 to 300 colonies). It was obtained a total of 34 bacterial isolates and these were subjected to analysis of colonial morphology and biochemical tests for identification. Gram-positive cocci and bacilli and Gram negative bacilli were found in this study. The latter were the most frequent, occurring in 68% of samples. At the present moment, some isolates were identified by gender, they are: *Aeromonas*, *Aureobacterium*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* and *Proteus*. *Proteus* was found only in samples from *P. patagoniensis*. *Proteus* and *Aeromonas* have been isolated from abscesses caused by snakebites and can cause infectious diseases in snakes.

Key-words: Mouth microbiota. Snakes. Philodryas patagoniensis. Xenodon dorbignyi.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 2.1 ORIGEM E DIVERSIDADE DAS SERPENTES..... | 14 |
| 2.2 OFIDISMO..... | 15 |
| 2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA EM SERPENTES E HUMANOS..... | 16 |
| 2.4 INFECÇÕES EM RÉPTEIS..... | 17 |
| 2.5 <i>Philodryas patagoniensis</i> Girard, 1858..... | 18 |
| 2.6 <i>Xenodon dorbignyi</i> Duméril, Bibron & Duméril, 1854..... | 20 |
| 2.7 ÁREA DE ESTUDO..... | 21 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 LOCAL..... | 24 |
| 3.2 MÉTODOS DE CAMPO..... | 25 |
| 3.3 MÉTODOS LABORATORIAIS..... | 26 |
| 3.3.1 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias..... | 27 |
| 3.3.2 Identificação dos isolados bacterianos..... | 27 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 4.1 QUANTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS..... | 28 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS..... | 29 |
| 4.3 <i>Proteus</i> sp..... | 34 |
| 4.4 <i>Aeromonas</i> sp..... | 35 |
| 4.5 <i>Micrococcus</i> sp..... | 36 |
| 4.6 <i>Bacillus</i> sp..... | 36 |
| 4.7 <i>Microbacterium</i> sp..... | 37 |
| 5 CONCLUSÃO | 38 |
| REFERÊNCIAS..... | 39 |

1 INTRODUÇÃO

As serpentes são répteis que se originaram a partir de ancestrais lacertiformes durante o início do Cretáceo (cerca de 120 milhões de anos atrás), e que, juntamente com os lagartos e anfisbenas, compõem o grupo dos Squamata (POUGH *et al.*, 2004; VITT; CALDWELL, 2009). São conhecidas por numerosas características derivadas, como corpo alongado e ausência de membros locomotores, mas que não são restritas ao grupo, estando presentes nos demais grupos de Squamata e que refletem as várias adaptações comportamentais, ecológicas e fisiológicas (POUGH *et al.*, 2004). Ocorrem em todos os continentes exceto na Antártica e no extremo norte do hemisfério norte, ocupando os mais diversificados ecossistemas, refletindo assim um grande sucesso quando se refere à adaptação em ambientes diferentes (VITT; CALDWELL, 2009). Todas as espécies são carnívoras, algumas se caracterizando como generalistas, utilizando ampla variedade de categorias de presas, enquanto outras possuem dieta específica (ZUG *et al.*, 2001). De acordo com Pough *et al.* (2004) existem quatro padrões de dentição nas serpentes: áglifas, opistóglifas, proteróglifas e solenóglifas. As dentições do tipo áglifa e opistóglifa são características das serpentes consideradas, de maneira geral, como não peçonhentas, e que são representadas no Brasil principalmente pela família Dipsadidae, enquanto as proteróglifas e solenóglifas são representadas pelas serpentes peçonhentas das famílias Elapidae e Viperidae, respectivamente (BÉRNILS, 2010; POUGH *et al.*, 2004).

Desde a antiguidade as serpentes são vistas pela sociedade como animais extremamente perigosos e vinculados a acontecimentos ruins, constantemente trazendo sentimentos de medo ou nojo. Em grande parte isto é resultado do elevado número de acidentes ofídicos que ocorrem em todo o mundo, principalmente em países tropicais (PINHO; PEREIRA, 2000). No Brasil ocorrem cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano, os quais se constituem em significativo problema de saúde pública (MS/FUNASA, 2001; PINHO; PEREIRA, 2000). Desta maneira, devido em grande parte a sua importância para o homem, as serpentes são objeto de inúmeros estudos, alguns aplicados à medicina, que abrangem técnicas laboratoriais para extração do veneno utilizado na produção de soro e o isolamento de toxinas para a produção de medicamentos, enquanto outros buscam definir a taxonomia e compreender aspectos ecológicos (LOPES, 2008; ROCHA; FURTADO, 2007;

TOZETTI; OLIVEIRA; PONTES, 2009), muitos dos quais geram informações importantes também para as questões envolvendo saúde pública.

Apesar da ocorrência dos acidentes ofídicos, a maioria das serpentes existentes é considerada não peçonhenta por não constituir risco ao ser humano (MOSMANN, 2001), incluindo aquelas que apresentam glândula de peçonha, mas esta de baixa toxicidade, ou ainda as que não possuem um eficiente aparelho inoculador, como as áglifas (VERRASTRO; SILVA; COLOMBO, 2009). Mesmo assim, muitos acidentes ofídicos são atribuídos a serpentes consideradas não peçonhentas (MINTON, 1990; SILVEIRA; NISHIOKA, 1992; SALOMÃO; ALBOLEA; SANTOS, 2003), principalmente dipsadídeos, cujos acidentes se restringem geralmente à ação tóxica, embora existam registros de casos mais graves (DIAZ et al., 2004; LEMA, 2002; SALOMÃO; DI-BERNARDO, 1995). Estudos têm mostrado que algumas espécies do gênero *Philodryas*, por exemplo, possuem peçonha que ocasionam sintomas semelhantes ao envenenamento bothrópico, mas com ações locais menos intensas (LOPES, 2008; ROCHA; FURTADO, 2007). Adicionalmente, mesmo acidentes ofídicos com espécies que não apresentam peçonha, ou cuja peçonha é de baixa toxicidade, podem apresentar aspectos médicos relevantes, uma vez que as perfurações na superfície cutânea resultantes da mordida danificam a barreira de defesa da pele, favorecendo a ocorrência de infecções por micro-organismos (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008; JORGE; RIBEIRO, 1997). Estudos já realizados demonstraram uma grande relação entre os micro-organismos presentes na cavidade oral das serpentes e em abscessos causados pelas picadas (ANDRADE et al., 1989; GARG et al., 2009; JORGE et al., 1990). Infecções por micro-organismos também tem sido apontadas como uma das principais causas de mortalidade relatadas nesses animais em cativeiro, como estomatites, pneumonias e abscessos cutâneos (FOWLER, 1986; MARCUS, 1971). Existem na literatura alguns estudos realizados com o objetivo de identificar a microbiota oral de serpentes (FONSECA et al., 2008; GOLDSTEIN et al., 1981; JORGE et al., 1990), mas estes são escassos, e no Brasil, se restringem principalmente a espécies peçonhentas do gênero *Brothops*, responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos no país, havendo poucas informações disponíveis acerca de dipsadídeos (ANDRADE, 1989; JORGE et al. 1990; MS/FUNASA, 2001). Dentre os dipsadídeos para os quais não existem informações acerca da bacteriologia oral, estão as espécies *Philodryas patagoniensis* e *Xenodon dorbignyi*. *P. patagoniensis* é uma serpente terrícola de

porte mediano, atingindo cerca de 1400 mm de comprimento total, que possui atividade diurna e dieta variada, consumindo peixes, anuros, lagartos, aves, mamíferos e serpentes, sendo muito comum no RS (GIRAUDO, 2001; PONTES, 2007; SAZIMA & HADDAD, 1992; VERRASTRO; SILVA; COLOMBO, 2009). Possui dentição opistóglifa, é agressiva e pode morder, produzindo dor e edemas locais, como já relatados em alguns trabalhos (ARAÚJO; SANTOS, 1997; NISHIOKA; SILVEIRA, 1994; SILVEIRA; NISHIOKA, 1992; VERRASTRO; SILVA; COLOMBO, 2009). *X. dorbignyi* é uma espécie terrícola de porte mediano, atingindo cerca de 600 mm de comprimento total, que possui atividade diurna e dieta restrita a anuros e eventualmente lagartos e seus ovos (OLIVEIRA *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2005). Apesar de apresentar comportamento defensivo elaborado, não é agressiva, de forma que não ocasiona acidentes ofídicos (TOZETTI; OLIVEIRA; PONTES, 2009). Conforme Oliveira (2005), ambas espécies estão entre as mais frequentemente encontradas nas áreas de dunas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, áreas estas que vêm sofrendo nos últimos anos uma grande expansão de ocupações urbanas e um crescimento populacional acelerado (BRACK, 2006), o que resulta em um cada vez mais frequente contato entre humanos e estas serpentes, e conseqüentemente um maior risco de acidentes ofídicos, especialmente no caso de *P. patagoniensis*, devido ao seu comportamento agressivo.

O presente estudo tem por objetivo identificar os micro-organismos presentes na cavidade oral de exemplares de duas espécies de dipsadídeos, *P. patagoniensis* e *X. dorbignyi*, provenientes da região de dunas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, buscando um maior conhecimento da microbiota oral destas espécies, a fim de avaliar se esta pode constituir fonte de infecção no local da picada em caso de acidentes, bem como, se podem estar associadas com doenças infecciosas nessas espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As serpentes são muito estudadas devido ao considerável número de acidentes ofídicos, mas são poucos os trabalhos que se dedicam a analisar os micro-organismos associados a esses animais.

2.1 ORIGEM E DIVERSIDADE DAS SERPENTES

As serpentes, juntamente com os lagartos e anfisbenas, compõem o grupo denominado Squamata (POUGH *et al.* 2004). Assim como os lagartos, adaptaram-se a diversos tipos de ambientes, tanto de regiões tropicais como temperadas, o que lhes confere grande sucesso evolutivo. Sua origem evolutiva se deu a partir de ancestrais lacertiformes, enquanto alguns lagartos recentes estão se modificando e tornando sua morfologia muito semelhante a das serpentes (LEMA, 2002).

O registro mais antigo que se tem das serpentes é representado por dois vertebrados a partir do início do Cretáceo, e a descoberta do fóssil *Najash* mostra que, provavelmente, as serpentes tiveram um ancestral terrestre e não marinho como se imaginava. Análises filogenéticas apontam *Najash* como grupo irmão de todas as serpentes e, baseado na morfologia do crânio entre outras características, ela possuía, provavelmente, hábitos terrestres/subterrâneos (VITT; CALDWELL, 2009).

Escamados bastante modificados em relação ao seu ancestral quadrúpede, as serpentes exibem, com seu corpo alongado, diferentes tamanhos e texturas corporais, refletindo suas adaptações comportamentais e ecológicas ao ambiente. Possuem numerosas vértebras ao longo do corpo, cada uma com um par de nervuras, conferindo a elas bastante flexibilidade para uma locomoção através de ondulações, muito eficiente na água, solo, subsolo e árvores. Por não possuírem membros, as serpentes capturam, manipulam e consomem suas presas apenas com a boca e o corpo, algumas utilizam apenas o corpo para matar suas presas, enquanto outras possuem presas especializadas que inoculam um veneno altamente tóxico. Grandes modificações no crânio ao longo da evolução ajudaram esses animais a engolir suas presas inteiras, tornando-os extremamente flexíveis; algumas dessas adaptações são exclusivas das serpentes, incluindo a exclusão do osso supraoccipital (VITT; CALDWELL, 2009).

Com relação à dentição, as serpentes possuem tipicamente dentes longos, finos e levemente curvados. São reconhecidas tradicionalmente, quatro categorias de dentição nas serpentes: as áglifas possuem dentição homodonte, ou seja, todos os dentes com tamanho e forma iguais, não possuindo presas especializadas. As opistóglifas possuem um par de dentes alongados localizados na parte posterior da maxila, frequentemente chamados de presa posterior. Nas proteróglifas, a maxila é relativamente longa, possuindo um par de presas ocas (é muito comum haver um dente adicional atrás da presa) na sua extremidade anterior, diferente das solenóglifas que possuem a maxila reduzida, sem dentes adicionais além do par de presas ocas, que é projetado para frente pela rotação da maxila através do osso pré-frontal. Normalmente, os padrões de dentição áglifa e opistóglifa são característicos de colubrídeos e dipsadídeos, as proteróglifas dos elapídeos e solenóglifa característica de viperídeos (POUGH *et al.*, 2004).

As serpentes representam o segundo maior grupo de répteis vivos, com 3.378 espécies. No Brasil existem 371 espécies de ofídios e no Rio Grande do Sul as 74 espécies estão distribuídas entre as famílias Anomalepididae (duas espécies), Colubridae (cinco espécies), Dipsadidae (58 espécies), Leptotyphlopidae (uma espécie), Typhlopidae (uma espécie) e Viperidae (sete espécies) (BÉRNILS, 2010; HERPETOLOGIA UFRGS, 2010; UETZ, 2010). As serpentes consideradas perigosas ao ser humano estão inseridas nas famílias Elapidae e Viperidae (MS/FUNASA, 2001).

2.2 OFIDISMO

Ofidismo é o nome dado ao acidente com serpente, ele pode ocorrer tanto com humanos quanto com animais de interesse para o homem (LEMA, 2002). Não se fala em serpentes sem mencionar os acidentes ofídicos, e isso se deve ao fato da grande ocorrência e da gravidade de alguns desses acidentes, considerados um problema de saúde pública. No Brasil, são registrados cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano, em sua maioria procedentes da região Sul e Sudeste, e que estão em geral, relacionados a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo (MS/FUNASA, 2001). É interessante observar que esse número se manteve relativamente constante nos últimos 100 anos, quando Vital Brazil estimou, em seu estudo pioneiro em 1909, 19.200 acidentes ofídicos por ano no

Brasil. É claro que a letalidade dos acidentes diminuiu de 25%, estimados por Vital Brazil no ano de 1909 para o estado de São Paulo (BOCHNER; STRUCHINER, 2003), para 0,45% estimados para todo o Brasil entre os anos de 1990 a 1993 (MS/FUNASA, 2001).

A maioria dos acidentes ofídicos é atribuída ao Gênero *Bothrops* que compreende cerca de 30 espécies distribuídas por todo o território nacional (MS/FUNASA, 2001). Das 74 espécies que ocorrem no Rio Grande do Sul, apenas 12 são consideradas peçonhentas, são elas: *Micrurus altirostris*, *Micrurus corallinus*, *Micrurus decoratus*, *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus silviae*, *Bothrops diporus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pubescens*, *Crotalus durissus*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops cotiara* (HERPETOLOGIA UFRGS, 2010; MS/FUNASA, 2001). Entretanto, muitos acidentes com dipsadídeos opistóglifos tem sido relatados, incluindo descrição de quadros de envenenamento e mesmo óbito, caracterizando-os como de interesse médico (DIAZ, 2004; MEDEIROS *et al.*, 2010; MINTON, 1990; SALOMÃO; ALBOLEA; ALMEIDA-SANTOS, 2003; SALOMÃO; DI-BERNARDO, 1995; SANTOS-COSTA, 2000). De acordo com o Centro de Controle de Intoxicações da unidade de emergência do hospital da USP, durante o período de 1995 a 2000, 46,5% dos acidentes ofídicos foram causados por serpentes consideradas não peçonhentas, mas apesar disso, na maioria das vezes, os sintomas são apenas locais e os danos geralmente causados pela ação mecânica da picada, sendo o tratamento constituído pela limpeza do local com água, sabão e soro fisiológico (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA EM SERPENTES E HUMANOS

Tanto o ser humano quanto os demais animais estão expostos a inúmeros micro-organismos presentes no ambiente. São incontáveis as células microbianas coletivamente referidas como microbiota normal, que estão normalmente distribuídas na superfície cutânea e mucosas e variam nas diferentes espécies de animais, devido a diferenças fisiológicas e anatômicas existentes entre elas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; TANNOCK, 1988; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A pele humana é constituída, na sua maioria, por bactérias Gram positivas, geralmente restringindo-se a poucos gêneros, incluindo espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus*. A cavidade oral, também, é um habitat microbiano complexo

variando entre as espécies e o tipo de dieta do animal (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Embora ainda incipiente, é crescente o número de estudos que visam conhecer os micro-organismos associados às serpentes (ELLIE *et al.*, 1981; FONSECA *et al.*, 2008; JORGE *et al.*, 1990; SHEK *et al.*, 2009;). Alguns desses micro-organismos estão associados a doenças em répteis e tem causado grande mortalidade entre as serpentes e ainda outros podem ser transferidos para a vítima durante o acidente ofídico, causando inflamação no tecido, aliados às atividades necrosantes dos venenos de algumas serpentes (ANDRADE *et al.*, 1989; FOWLER, 1986; GARG, 2009; JORGE; RIBEIRO, 1997; MARCUS, 1971; NISHIOKA *et al.*, 2000).

Dentre os gêneros de bactérias que tem sido isoladas da cavidade oral de serpentes podemos citar *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Providencia* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Morganella* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Citrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp., *Bulkolderia* sp. e *Yersinia* sp. (ELLIE *et al.*, 1981; FONSECA *et al.*, 2008; JORGE *et al.*, 1990; SHEK *et al.*, 2009). A presença destes micro-organismos reforça a importância das ações de antissepsia nos tecidos após o acidente com alguma serpente e o acompanhamento da evolução do ferimento para evitar a instalação de uma infecção.

Alguns estudos bacteriológicos mostrando isolados de abscessos e de tecidos inflamados causados por picadas de serpentes já foram publicados, e esses mostraram uma grande semelhança com aqueles micro-organismos isolados da cavidade oral de alguns ofídios, sugerindo que eles possam ter sido inoculados na vítima junto com o veneno (ANDRADE *et al.*, 1989; NISHIOKA *et al.*, 2000).

2.4 INFECÇÕES EM RÉPTEIS

Infecção refere-se a qualquer situação em que um micro-organismo estabelece-se e cresce no interior do hospedeiro, sendo que esse último pode ser prejudicado ou não. Quando o hospedeiro é prejudicado nas suas funções chama-se de doença, que pode ser causada pela microbiota normal do hospedeiro quando esse estiver com resistência comprometida (MADIGAN; MARTINKO; PARKER,

2004). Essas infecções podem ter origem endógena, quando causadas pela microbiota normal do próprio hospedeiro e, exógena, quando causadas por agentes que atingem o hospedeiro a partir de um reservatório ou fonte externa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Em répteis, as infecções bacterianas são comuns, especialmente em espécies criadas em cativeiro, tanto as utilizadas como animais de estimação como em estudos laboratoriais e causam uma alta mortalidade nesses animais (FOWLER, 1986; MARCUS, 1971). Entre as infecções bacterianas mais comuns está a estomatite, que ocorre na mucosa oral e é caracterizada por ulceração, sendo mais frequentemente associada a serpentes do que lagartos. Abscessos cutâneos e subcutâneos também são comuns e *Aeromonas hydrophila* tem sido isolada dessas infecções, apesar de fazer parte da microbiota normal desses animais (FOWLER, 1986; MARCUS, 1971). Pneumonia ocorre muito frequentemente em répteis e é responsável por um número considerável de mortes. Muitos micro-organismos podem causar infecção pulmonar e *Aeromonas hydrophila* tem sido isolada nesses casos, principalmente em serpentes (MARCUS, 1971).

Muitos animais são capazes de transmitir doenças infecciosas ao homem, mas essa transmissão pode ser atenuada devido aos cuidados veterinários com os animais domésticos, situação cada vez mais comum, já que possuem maior contato com humanos. Por outro lado, essa condição é diferente com relação aos animais selvagens, já que não podem contar com cuidados veterinários rotineiros. Sendo assim, quando há interação com esses animais, os cuidados devem ser redobrados (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

2.5 *Philodryas patagoniensis* Girard, 1858

O gênero *Philodryas* Wagler, 1830 é composto por 17 espécies com ampla distribuição geográfica na América do Sul, 13 das quais ocorrem no Brasil (BÉRNILS, 2010; UETZ, 2010). *Philodryas patagoniensis* Girard, 1858 (Figura 1), conhecida popularmente como papa-pinto, possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Nordeste até o sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (PETERS & OREJAS-MIRANDA, 1970), sendo muito comum no litoral do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, 2005; PONTES, 2007). Possui porte mediano atingindo cerca de 1400 mm de comprimento total, hábitos terrícolas e dentição

opistóglifa (HERPETOLOGIA UFRGS, 2010). A espécie é caracterizada por possuir hábito alimentar generalista, sua dieta inclui vertebrados de pequeno porte como peixes, anfíbios, anfisbenas, lagartos, serpentes, aves e roedores, sendo os anfíbios anuros a categoria de presa mais consumida (PONTES, 2007). É agressiva e, quando acuada, pode achatar o corpo dorso-ventralmente, desferir botes e morder com agilidade (HERPETOLOGIA UFRGS, 2010). Possui atividade diurna, que no litoral do Rio Grande do Sul varia ao longo do ano (PONTES, 2007). Nos meses mais quentes, os indivíduos podem ser encontrados no início da manhã e final da tarde, nos meses mais frios sua atividade fica restrita ao período mais quente do dia (OLIVEIRA, 2005; PONTES, 2007).

Apesar da pouca investigação quanto aos venenos de serpentes opistóglifas, alguns trabalhos tem sido realizados a partir do isolamento de toxinas e outras substâncias presentes no veneno de indivíduos do gênero *Philodryas* a fim de se conhecer mais sobre as atividades dos mesmos no metabolismo da vítima de acidente ofídico e também sua composição (LOPES, 2008).

Apesar de ser considerada uma espécie não-peçonhenta, acidentes ofídicos envolvendo a espécie *Philodryas patagoniensis* tem sido relatados e em alguns casos, apresentando importante quadro clínico, mas na maioria das vezes as manifestações clínicas são apenas locais e descritas como dor, sangramento e edema (ARAÚJO; SANTOS, 1997; MEDEIROS, 2010; NISHIOKA; SILVEIRA, 1994; SILVEIRA; NISHIOKA, 1992). Apesar disso, estudos relacionados ao veneno da espécie mostram uma semelhança com a peçonha bothrópica no que diz respeito às ações e atividades, como indução de edema bem pronunciado já nos primeiros minutos, hemorragia e inflamação (LOPES, 2008).



Figura 1. Foto de exemplar de *Philodryas patagoniensis* encontrada em uma região de dunas na localidade Magistério, Rio Grande do Sul, Brasil.

Fonte: Autor, 2011.

2.6 *Xenodon dorbignyi* Duméril, Bibron & Duméril, 1854

O gênero *Xenodon* é composto por 11 espécies que se distribuem do sul da América do Sul até o México, nove das quais ocorrem no Brasil (BÉRNILS, 2010; UETZ, 2010).

Xenodon dorbignyi Duméril, Bibron & Duméril, 1854, conhecida popularmente como cobra-nariguda, devido à forma modificada do escudo rostral, ocorre no sul do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (LEMA, 1994). Comum em ambientes arenosos, *X. dorbignyi* foi a espécie mais encontrada no litoral do Rio Grande do Sul em uma região de dunas onde a vegetação é escassa (OLIVEIRA, 2005). Espécie terrícola de porte mediano, podendo atingir cerca de 600 mm de comprimento e dentição aglifodonte (OLIVEIRA, 2005). Alimentam-se principalmente de anfíbios anuros, podendo predar também lagartos e seus ovos (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Não costumam morder quando manuseadas, mas podem assumir atitudes intimidativas como falsos botes, triangulação da cabeça, movimentos erráticos e *display* da cauda (Figura 2) (TOZETTI; OLIVEIRA; PONTES, 2009). *X. dorbignyi* apresenta coloração dorsal parda, com manchas escuras no dorso e lados do corpo. A região ventral é

avermelhada. Devido à coloração dorsal (Figura 2), esta espécie é frequentemente confundida com as jararacas (*Bothrops* spp) (HERPETOLOGIA UFRGS, 2010).



Figura 2- Foto de exemplar da espécie *Xenodon dorbignyi* exibindo *display* da cauda, encontrada em uma região de dunas na localidade Magistério, Rio Grande do Sul, Brasil. Fonte: Autor, 2011.

2.7 ÁREA DE ESTUDO

O Rio Grande do Sul possui uma extensa planície costeira, com cerca de 610 km de comprimento, atingindo até 120 km de largura, estendendo-se desde Torres, ao norte, até o Arroio Chuí, ao sul (VILLWOCK, 1994). Essa estreita e diversificada faixa ambiental chamada Planície Costeira rio-grandense corresponde à parte emersa da bacia sedimentar de Pelotas e é formada pela faixa entre o escudo e a linha marginal às lagunas litorâneas, pelas restingas do Rio Grande e São José do Norte e pelas grandes depressões lacustre-lagunares (VIEIRA; RANGEL, 1988).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul formou-se durante o período quaternário pela justaposição lateral de quatro sistemas deposicionais denominados sistemas barreira-laguna I, II, III e IV. A sobreposição destes sistemas foi controlada pelas ações de transgressão e regressão do nível do mar, por esse motivo o

ambiente é composto por sucessões entre depósitos marinhos e lagunares (VILLWOCK, 1994).

Segundo o Programa de Gerenciamento Costeiro da FEPAM (GERCO), o litoral do Rio Grande do Sul está dividido em três setores: Litoral Norte, Litoral Médio e Litoral Sul. O Litoral Norte é composto por 19 municípios e apresenta uma linha de costa com cerca de 136 km de extensão. Limita-se ao Sul pelo Balneário Pinhal, ao norte pelo Rio Mampituba (FEPAM, 2007). Os municípios que integram o litoral norte possuem suas atividades econômicas basicamente voltadas para o turismo (FEPAM, 2007), por isso, são sérios os problemas ambientais na região, principalmente no verão, onde a superpopulação gera grandes volumes de lixo e esgoto. Outro problema comum é a ocupação urbana desordenada, onde a população invade as áreas de dunas com construções não apropriadas. A destruição das dunas acarreta prejuízos como o favorecimento do avanço do mar durante as tempestades, aumentando os danos materiais (VILLWOCK, 2009).

O litoral norte (Figura 3) possui paisagem de rara beleza fornecendo suporte a muitos ecossistemas. Esse cenário é marcado por sucessões de cristas e pequenos terraços arenosos intercalados por depressões formando lagos e lagoas (VILLWOCK, 2009). O regime de ventos característicos da região favorece a formação de campos de dunas eólicas (TOMAZELLI *et al.*, 2008), esses campos são formados por mantos mais espessos de dunas coalescentes, de alturas variáveis (VIEIRA; RANGEL, 1988). Um campo de dunas móveis bem desenvolvido pode ser observado ao longo do município de Cidreira, com largura variável entre 2 e 8 Km e se estendendo praticamente em toda a linha de costa (VILLWOCK, 2009).

Com relação à vegetação, é importante mencionar que o fator vento imprime feições marcantes, fazendo com que as copas das árvores e arbustos da vegetação das matas de restinga arenosas mais frontais se moldem na direção dos mesmos. O xeromorfismo é marcante na vegetação psamófila, verificando-se a presença de folhas reduzidas, lustrosas na face superior, coriáceas, com acúleos e espinhos (BRACK, 2006).

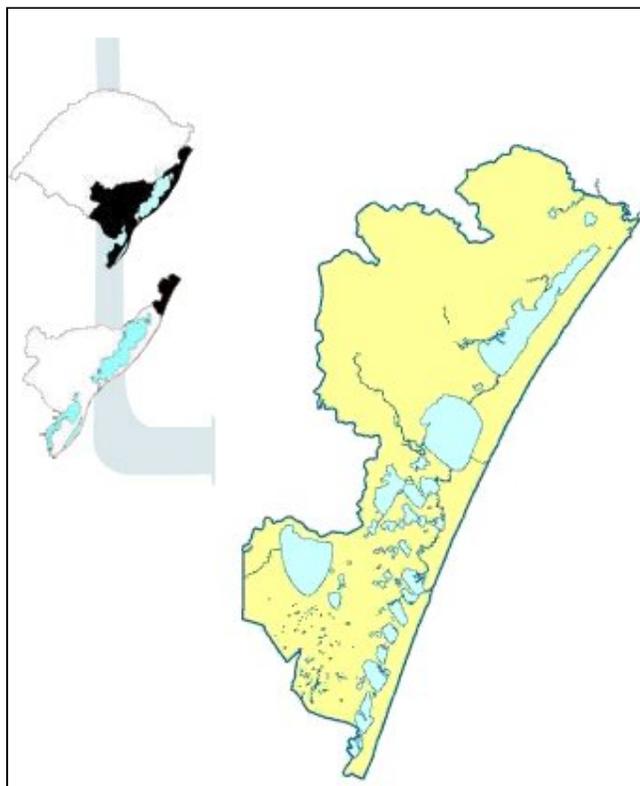


Figura 3- Mapa de localização do Litoral Norte do Rio Grande do Sul.
Fonte: FEPAM, 2007.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram feitas coletas no período entre outubro de 2011 a janeiro de 2012. As amostras foram obtidas em uma região de dunas da localidade Magistério, município do Balneário Pinhal, situado na Planície Costeira do Litoral do Estado do Rio Grande do Sul, e segundo o Programa de Gerenciamento Costeiro (GERCO) da FEPAM, limita ao sul a área considerada como Litoral Norte do RS.

3.1 LOCAL

Para a obtenção das amostras o presente estudo realizou-se em uma região de dunas em Magistério (30°21'S; 050°17'W) (Figura 4). A área possui 333 ha, e localiza-se cerca de 1000 m do oceano Atlântico, próximo às lagoas da Cerquinha e Rincão das Éguas. Compreende uma região de dunas móveis intercaladas por pequenas depressões úmidas, que ficam alagadas nos períodos de pluviosidade elevada. A vegetação é escassa, não superior a 5%, e podem ser encontradas em abundância espécies de gramíneas (Figura 5) como *Panicum racemosum* (WAECHTER, 1985). Próximo às lagoas ocorrem alguns banhados permanentes e áreas com vegetação densa, composta principalmente por juncos e gramíneas (OLIVEIRA, 2005).



Figura 4 – Imagem de satélite da área de estudo localizada em Magistério, próximo às lagoas Cerquinha e Rincão das Éguas. Fonte: Google Earth.



Figura 5 – Fotos da área de estudo, localidade Magistério. Região de dunas com locais de vegetação densa (direita) e escassa (esquerda).
Fonte: Autor, 2011.

3.2 COLETA DO MATERIAL

Para a obtenção dos 18 exemplares de serpentes distribuídos entre as espécies *Philodryas patagoniensis* e *Xenodon dorbignyi*, analisadas no presente estudo, foram realizadas saídas de campo semanais à área de estudo, cada uma com duração aproximada de três horas. Foi utilizado o método de procura visual para localização das serpentes. Uma vez localizados, os indivíduos foram

capturados manualmente, medidos (Figura 6. B) e sexados e logo após, procedida a coleta das amostras com suábe.

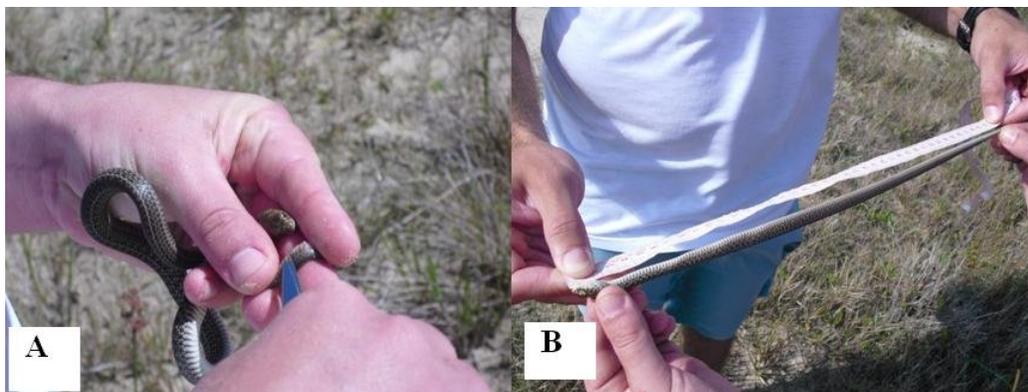


Figura 6 – Fotos durante procedimentos de marcação e medição em exemplar de *Philodryas patagoniensis*. (A) Corte da escama ventral. (B) Medição do comprimento rostro-cloacal.

Fonte: Autor, 2011.

As amostras foram coletadas em campo tocando um suábe estéril na cavidade oral das serpentes em região localizada próxima aos dentes. Logo após a coleta, o material foi armazenado em meio de transporte *Stuart* para o deslocamento até o laboratório. Entre o período de coleta da amostra e o início da inoculação, a mesma foi mantida em temperatura ambiente durante 24 h. Após a coleta das amostras, os indivíduos foram marcados através do corte da escama ventral (Figura 6. A), de forma a permitir o reconhecimento individual e garantir a independência das amostras, uma vez que apenas uma amostra de cada indivíduo será incluída na análise.

Para garantir a segurança dos envolvidos durante a pesquisa, foram adotadas algumas medidas com relação ao manuseio dos animais, objetivando não causar danos tanto nas serpentes quanto ao ambiente e às pessoas. Para isso, a contenção dos animais durante a obtenção das coletas foi realizada por profissional em Zoologia e foi exigida a utilização de luvas por todos os envolvidos, bem como o uso de roupas apropriadas para a procura de serpentes em campo. Para auxiliar na abertura da cavidade oral das serpentes, durante a passagem do suábe, foi utilizada pinça metálica, desinfetada antes e depois do processo com álcool 70%.

3.3 MÉTODOS LABORATORIAIS

Para que as amostras fossem cultivadas e tivessem um número de colônias favorável para a contagem, foram realizadas diluições a fim de diminuir o número de bactérias no inóculo. Assim, o suabe foi colocado em um tubo contendo 2 ml de solução salina e suspenso por um minuto em agitador de tubo tipo vórtex. Após esse procedimento, pipetou-se 1 ml desse fluido em 9 ml de solução salina, homogeneizou-se e então foi retirado 1 ml e transferido para outro tubo com mesma solução (9 ml de salina) e assim mais uma vez, obtendo as diluições 1/10, 1/100 e 1/1000. De cada diluição, foram inoculados 100 microlitros da solução em Ágar sangue (carneiro desfribinado 5%), pelo método de espalhamento, em duplicata. Após esse procedimento, o material foi incubado a 37°C por 48 h.

Após a incubação, foram realizadas a quantificação do número total de colônias, e a caracterização de colônias com características morfológicas diferentes. Para isso, foram observadas características como forma, elevação, bordos, pigmentação e consistência. Colônias com morfologias distintas foram repicadas em ágar sangue. Para cada colônia diferente foram realizados dois isolamentos consecutivos a fim de obter colônias puras. Depois da obtenção de cepas isoladas foi executado novo isolamento em Agar triptose de soja (TSA) para verificar a necessidade ou não de sangue no cultivo. A próxima etapa consistiu em semear cada cepa em Agar TSA ou sangue inclinado para a manutenção das mesmas e para proceder ao congelamento (- 20°C) destas cepas em criotubos contendo leite desnatado 10%.

3.3.1 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias

Para cada amostra foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para isso foi realizado o cálculo a partir das diluições realizadas e a contagem do número de colônias observadas em cada diluição. Foram utilizadas para a contagem placas que possuíam número de colônias entre 30 a 300. O número total de UFC foi calculado como segue: número de colônias na placa, multiplicado pela diluição da amostra utilizada para a contagem.

3.3.2 Identificação dos isolados bacterianos

Para realizar a identificação das cepas isoladas foram necessárias, além das etapas iniciais descritas acima, a realização de coloração pelo método de Gram e provas bioquímicas. A partir da coloração de Gram foram analisadas as características morfológicas celulares dos isolados. As provas bioquímicas foram realizadas seguindo a chave de identificação de bactérias e provas bioquímicas segundo MacFaddin (2000), são elas: crescimento em Agar MacConkey, testes da Catalase, oxidase, Oxidação e fermentação da glicose (O/F), redução do nitrato e SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 18 amostras provenientes da cavidade oral de duas espécies de serpentes em seu ambiente natural, sendo 11 dessas amostras provenientes de *Philodryas patagoniensis* e 7 oriundas da espécie *Xenodon dorbignyi*, durante o período de outubro de 2011 a janeiro de 2012.

Todas as amostras obtidas no presente estudo apresentaram crescimento bacteriano. Os grupos de micro-organismos encontrados foram comparados aos poucos trabalhos que têm se dedicado ao isolamento e identificação das bactérias associadas a esses animais e às infecções causadas por acidentes ofídicos, assim como trabalhos que associam os gêneros de bactérias encontrados com infecções em humanos e, portanto, utilizados para discutir os resultados encontrados.

4.1 QUANTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

A carga microbiana total das amostras quantificadas variou entre $2,4 \times 10^2$ UFC/ ml a $> 3 \times 10^5$ UFC/ ml (Tabela 1). Sendo que, as amostras provenientes da espécie *P. patagoniensis* variaram entre $2,4 \times 10^2$ UFC/ ml a $> 3 \times 10^5$ UFC/ ml e das amostras de *X. dorbignyi* variaram entre $2,5 \times 10^4$ a $> 3 \times 10^5$ estimado.. Algumas amostras não puderam ser quantificadas devido ao alto crescimento de colônias, apresentando muitas delas sobrepostas. A diluição 1/ 1000 foi a que melhor apresentou uma quantidade adequada para a contagem (entre 30 e 300 colônias), mas ainda assim algumas amostras não puderam ser quantificadas. Quando a amostra apresentou um grande número de colônias e elas não puderam ser quantificadas foi atribuído um número estimado (acima de 300 colônias) (Figura 7).

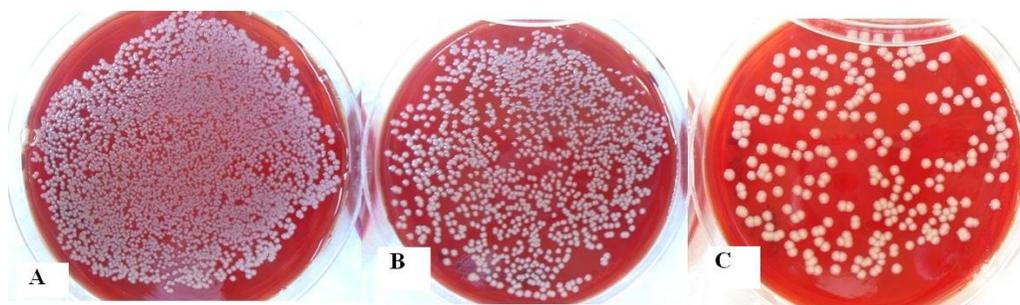


Figura 7 – Exemplo de crescimento bacteriano após as diluições seriadas das amostras coletadas da cavidade oral das serpentes. Amostra proveniente da serpente *X. dorbignyi*. Cultivos em Agar Sangue de carneiro (5%). (A) diluição 1/10. (B) Diluição 1/100. (C) Diluição 1/1000.

Fonte: Autor, 2011.

Tabela 1- Carga microbiana de amostras da cavidade oral de duas espécies de serpentes brasileiras, em uma região de dunas em Magistério, RS.

| Espécie | Nº amostra | UFC*/ ml |
|---------------------------------|------------|----------------------------|
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 1 | $2,36 \times 10^3$ |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 2 | $> 3 \times 10^3$ estimado |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 3 | $2,4 \times 10^2$ |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 4 | $2,8 \times 10^3$ |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 5 | $> 3 \times 10^4$ estimado |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 8 | $> 3 \times 10^5$ estimado |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 9 | $2,2 \times 10^5$ |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 14 | $1,6 \times 10^5$ |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 15 | $> 3 \times 10^5$ estimado |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 17 | $1,8 \times 10^5$ |
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | 18 | 8×10^4 |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 6 | $2,5 \times 10^4$ |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 7 | $> 3 \times 10^4$ estimado |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 10 | $9,6 \times 10^4$ |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 11 | $> 3 \times 10^5$ estimado |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 12 | $8,3 \times 10^4$ |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 13 | $> 3 \times 10^5$ estimado |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | 16 | $> 3 \times 10^5$ estimado |

* Unidades formadoras de colônias

4.2 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Após o isolamento e a obtenção de colônias puras, obteve-se um total de 34 isolados bacterianos. Esses foram numerados a partir da amostra ao qual foram provenientes e codificados com uma letra para diferenciá-los entre as colônias de uma mesma amostra, sendo eles: 1B, 1C, 1E, 2A, 3A, 4A, 5A, 5B, 6A, 7A, 8A, 8B,

9A, 10A, 10C, 10E, 11A, 11B, 11J, 12A, 12I, 12G, 13A, 13B, 14B, 14B', 14D, 15A, 16A, 16E, 17A, 17B, 18A E 18B. Para a identificação dos isolados foi adotada a chave de identificação de MacFaddin (2000).

Todos os isolados foram positivos para o teste de catalase. Quanto à morfologia, as colônias apresentaram características variadas, a partir das observações da forma, elevação, bordos, transparência e pigmentação, como exemplificado na Figura 8, sendo dispostas na Tabela 2, juntamente com a morfologia celular, reação ao método de Gram e o número de identificação do isolado.



Figura 8 – Aspecto das colônias do isolado 1B cultivado em Agar sangue de carneiro (5%), circular, espraçada, bordos ondulados, opaca, fosca, branca.
Fonte: Autor, 2012.

Foram encontrados cocos e bacilos Gram positivos e ainda bastonetes Gram negativos. Esses últimos foram os mais frequentes, ocorrendo em 68% das amostras analisadas. Os bacilos Gram negativos tem sido indicados como principais agentes etiológicos de enfermidades em serpentes e ainda associados como patógenos secundários em infecções virais nesses animais (CUBAS; SILVA; DIAS-CATÃO, 2006; MITCHELL; DIAZ-FIGUEROA, 2005). Em humanos, esse grupo possui destaque fazendo parte da microbiota normal e podendo ocasionar infecções em ferimentos (HARVEY; CHAMPE, FISHER, 2008).

Tabela 2 – Características celulares, de morfologia de colônia e seus respectivos gêneros dos isolados bacterianos de serpentes coletadas em região de dunas em Magistério, RS.

| Gram | Nº Isolado | Morfologia Celular | | Morfologia Colonial | | | | | | | | | | | | Gênero | |
|------|------------|--------------------|------|---------------------|-----------|-----------|---------|----------|-----------|--------|-------------|---------------|-------|---------|------|--------|-----------------------|
| | | | | Forma | | | | Elevação | | Bordos | | Transparência | | Brilho | | | Pigmentação |
| | | Bacilo | Coco | Circular | Irregular | Espraiada | Convexa | Inteiros | Ondulados | Opaca | Translúcida | Brilhosa | Fosca | Amarela | Bege | | Branca |
| + | 1B | | X | X | X | | | X | X | | | | X | | X | | <i>Micrococcus</i> |
| - | 1C | X | | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | NI* |
| + | 1E | | X | X | X | | | X | X | | | | X | | X | | <i>Micrococcus</i> |
| - | 2A | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | | X | NI* |
| + | 3A | X | | X | | X | | X | | X | | | X | | | | <i>Microbacterium</i> |
| - | 4A | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | | X | <i>Aeromonas</i> |
| - | 5A | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | | X | NI* |
| - | 5B | X | | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | NI* |
| - | 6A | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | X | | NI* |
| - | 7A | X | | X | | X | | X | X | X | | X | | X | | | <i>Aeromonas</i> |
| + | 8A | X | | | X | X | | X | X | X | | | X | | | X | <i>Bacillus</i> |
| - | 8B | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | X | | NI* |
| - | 9A | X | | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | NI* |
| + | 10A | X | | X | X | | | X | X | X | | | X | | | X | <i>Bacillus</i> |
| - | 10C | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | X | | NI* |
| + | 10E | X | | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | <i>Microbacterium</i> |
| + | 11A | X | | X | | X | | X | | X | | | X | | | | <i>Microbacterium</i> |
| + | 11B | | X | X | X | | | X | X | X | | X | | X | | | <i>Micrococcus</i> |
| + | 11J | X | | X | | X | | X | | X | | X | | X | | | <i>Microbacterium</i> |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------------|
| + | 12A | X | | X | X | | X | X | | X | | X | <i>Bacillus</i> |
| - | 12I | X | | X | | X | X | X | | X | | X | NI* |
| - | 12G | X | | X | X | | X | X | | X | | X | NI* |
| - | 13A | X | | X | | X | X | | X | X | | X | NI* |
| - | 13B | X | | X | | X | X | X | | X | | X | NI* |
| - | 14B | X | | X | | X | X | X | | X | | X | <i>Aeromonas</i> |
| - | 14B' | X | | X | | X | X | X | | X | | X | NI* |
| + | 14D | | X | X | X | | X | X | | X | | X | NI* |
| - | 15A | X | | X | X | | X | | X | X | | X | <i>Proteus</i> |
| - | 16A | X | | X | | X | X | | X | | | X | NI* |
| - | 16E | X | | X | | X | X | X | | X | | X | NI* |
| - | 17A | X | | X | | X | X | | X | | X | X | NI* |
| - | 17B | X | | X | | X | X | X | | X | | X | NI* |
| - | 18A | X | | X | | X | X | X | | X | X | X | NI* |
| - | 18B | X | | X | X | | X | X | | X | | X | <i>Proteus</i> |

*Gênero não identificado até o momento.

Assim como no presente estudo, Shek *et al.* (2009) observaram um maior número de bactérias Gram negativas fazendo parte da microbiota oral de duas espécies de serpentes na China (*Naja atra* e *Trimeresurus albolabris*). Também, Jorge *et al.* (1990) isolaram bacilos Gram negativos na maioria de suas amostras provenientes da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*, sendo que antes dele Andrade (1989) já havia encontrado, em maior frequência, bacilos gram-negativos em abscessos de pacientes vítimas de acidentes ofídicos causados por jararaca (gênero *Bothrops*), sugerindo uma possível fonte de infecção. Já Fonseca *et al.* (2008), analisando a microbiota oral de serpentes de cativeiro no Brasil, encontraram maior frequência de bactérias Gram positivas em suas amostras. Entre as espécies analisadas pelo autor, está presente o gênero *Philodryas* representado pela espécie *P. natteresi* (Steindachner, 1870), na qual foram encontrados bacilos e cocos Gram positivos e também bacilos Gram negativos.

No presente estudo, a classificação dos isolados bacterianos de acordo com gênero foi possível para *Aeromonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp. e *Proteus* sp. (Tabela 2). Os gêneros de bactérias isoladas em cada espécie de serpente estão sumarizados na tabela 3. *Proteus* sp. foi encontrada somente em amostras oriundas da espécie *P. patagoniensis*. Com exceção de *Microbacterium* sp., os gêneros encontrados no presente estudo já foram isolados da cavidade oral de serpentes. *Micrococcus* sp. e *Proteus* sp. já foram isolados em serpentes chinesas, assim como *Bacillus* sp. em cascavéis no Brasil. Do mesmo modo, *Aeromonas* sp. já foi observada em amostras provenientes de serpentes do gênero *Thamnophis*, conhecidas como “Garter Snakes” e também em *Naja atra* e *Trimeresurus albolabris*. (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2009; GOLDSTEIN *et al.*, 1981; SHEK *et al.*, 2009).

Tabela 3. Gêneros de bactérias isoladas em duas espécies de serpentes de dunas na praia Magistério, RS.

| Espécie de serpente | Gêneros de bactérias isoladas |
|---------------------------------|---|
| <i>Philodryas patagoniensis</i> | <i>Microbacterium</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp. e <i>Proteus</i> sp.. |
| <i>Xenodon dorbignyi</i> | <i>Microbacterium</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. e <i>Micrococcus</i> sp. |

4.3 *Proteus* sp.

Proteus sp. é um bacilo Gram negativo móvel, apresenta um crescimento característico de suas colônias em forma de véu, espalhando-se por toda a placa (Figura 9), além disso seu cultivo possui um forte odor de putrefação. Considerado colonizador do corpo humano e patógeno oportunista (HARVEY; CHAMPE, FISHER, 2008; MACFADDIN, 2000), é frequente a sua associação com infecções em ferimentos cutâneos, como os relatados por Archibald & Jarvis (2011) e, ainda, em feridas de pacientes pós-cirúrgicos (LEIGH, 1981; YALQIN *et al.*, 1994) Twum-Danso *et al.*(1992) isolando amostras provenientes de feridas cirúrgicas, afirmaram que a probabilidade de *Proteus* sp. estar associado a essas infecções é de 79%.

De acordo com Macfaddin (2000) são descritas quatro espécies patogênicas para o homem e que estão associadas a infecções: *P. mirabilis*, *P. mixofaciens*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* e *P. stuartii*. GARG *et al.* (2009) registraram *Proteus* sp. em sua revisão sobre infecções secundárias causadas por picadas de serpentes, durante os anos de 2003 e 2008, na Índia. Também Andrade (1989) isolou *Proteus* sp. de abscessos causados por acidentes com jararacas (*Bothrops jararaca*). Assim como *Proteus* tem sido associado a infecções em humanos, também pode ser considerado importante causador de doenças infecciosas em ofídios, entre elas podem ser citadas estomatites, abscessos cutâneos e pneumonias (CUBAS; SILVA; DIAS-CATÃO, 2006; COUTINHO *et al.*, 2001; FOWLER, 1986; SCHUMACHER, 2003).

O gênero *Proteus* já foi encontrado na cavidade oral de jararacas (*Bothrops jararaca*), cascavéis (*Crotalus* sp.), “Garter Snakes” (gênero *Thamnophis*) e em cobras chinesas (*Naja atra* e *Trimeresurus albolabris*) (FERREIRA-JUNIOR *et al.* 2009; GOLDSTEIN *et al.* 1981; JORGE *et al.* 1990; SHEK *et al.* 2009).



Figura 9 – Crescimento de colônias de *Proteus* sp. em Agar sangue de carneiro (5%) de amostra proveniente da serpente *P. patagoniensis*.

Fonte: Autor, 2011.

4.4 *Aeromonas* sp.

Aeromonas sp. é um grupo de bacilos Gram negativos de vida-livre que podem ser encontrados na água, solo, alimentos à base de peixe e isolados de alguns grupos de animais como répteis, anfíbios, sanguessugas e alguns pássaros. Possuem a habilidade de crescer bem e produzir toxinas como citotoxinas, enterotoxinas e proteases, essa última causa danos teciduais e ajuda no estabelecimento de infecções. Além disso, produzem várias adesinas que permitem a aderência na superfície epitelial (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Esse grupo tem sido associado a uma grande variedade de infecções ocorridas em humanos, indicando que esses organismos possuem importante potencial patogênico (JOSEPH *et. al.* 1979).

Infecções cutâneas tem sido associadas à *Aeromonas* sp, sendo que Carnahan *et. al.* (1989) isolaram o gênero de amostras provenientes de infecções em feridas localizadas nas pernas de dois pacientes atendidos em um hospital de Baltimore. Outro estudo destacou o gênero *Aeromonas* sp., isolando-o de pacientes vítimas de queimaduras na pele com posterior infecção (KIENZLE; MULLER; PEGG, 1999), mas, de um modo geral estão associados a lesões na pele e o posterior contato com o solo e água de rios ou lagos (GOLD; SALIT, 1993) . Geralmente, essa infecção é localizada e manifesta-se poucas horas após a contaminação, mas em

alguns casos pode expandir e evoluir para necrose tecidual (GOLD; SALIT, 1993; JOSEPH, *et. al*, 1979).

Em ofídios, as infecções causadas por *Aeromonas* sp. tem se destacado e o gênero vem sendo considerado o mais importante grupo de patógeno, causando uma alta mortalidade entre as serpentes. Entre as doenças infecciosas em répteis causadas por *Aeromonas* sp., podem ser destacadas as estomatites e enfermidades ligadas ao trato respiratório (CUBAS; SILVA; DIAS-CATÃO, 2006; FOWLER, 1986; MARCUS, 1971; SCHUMACHER, 2003). Assim como neste trabalho, *Aeromonas* sp. já foi isolado por Goldstein (1981) em suas amostras da orofaringe de serpentes do gênero *Thamnophis* e por Shek *et al.* (2009) com amostras oriundas de cobras chinesas.

4.5 *Micrococcus* sp.

Micrococcus sp. são cocos Gram positivos que podem apresentar arranjos em pares, tétrades ou cachos irregulares (MACFADDIN, 2000). O gênero compreende as espécies *M. luteus* e *M. lylae*. De maneira geral, esse grupo é encontrado no meio ambiente e transitoriamente na pele do ser humano, mas normalmente, não estão associados a infecções (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). *Micrococcus* sp. já foram isolados em amostras oriundas da cavidade oral de serpentes por Shek *et al.* (2009), assim como em cascavéis de vida livre e de cativeiro por Ferreira-Junior (2009) em São Paulo.

4.6 *Bacillus* sp.

Bacilos gram-positivos (Figura 10) e formadores de esporos, o gênero *Bacillus* compreende mais de 50 espécies que podem ser encontradas, em sua maioria, no solo e na água (HARVEY; CHAMPE, FISHER, 2008). A espécie mais conhecida desse grupo é o *B. anthracis*, desde 1887 como causador do antraz ou carbúnculo (doença que pode ser cutânea ou pulmonar). Outra espécie, *B. thuringiensis*, é utilizada na agricultura, pois produz uma toxina letal para certas espécies de insetos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), mas, esta espécie também pode ser associada a infecções de pele, pois já foi isolada por Damgaard *et al.* (1997) em infecções de ferimentos causados por queimaduras, assim também como Talan *et al.* (1999), que

isolaram espécies de *Bacillus* de abscessos causadas por mordida de gatos e cachorros em Los Angeles. Assim como no presente estudo, espécies deste gênero já foram isoladas, por Shek et al. (2009), em amostras provenientes da orofaringe de serpentes da espécie *Trimeresurus albolabris*, conhecidas como “víboras bambu”.

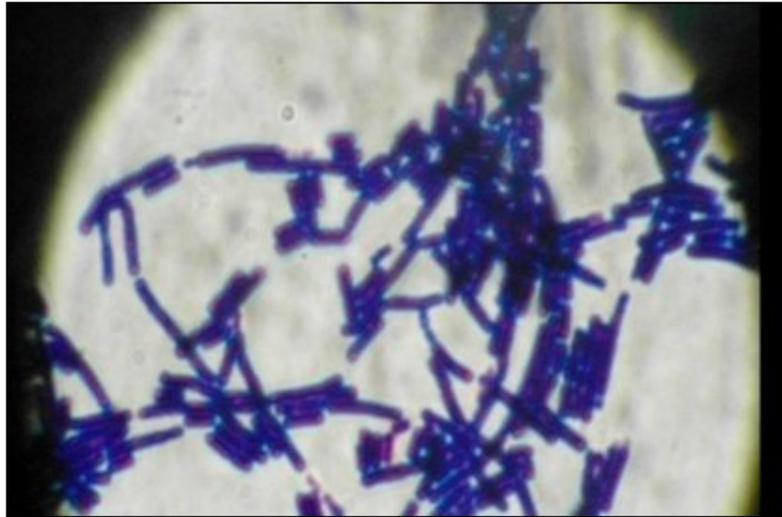


Figura 10 - Bacilo gram-positivo do gênero *Bacillus* visualizado em microscópio óptico, encontrado na cavidade oral de serpentes na localidade Magistério, RS.
Fonte: Autor, 2012.

4.7 *Microbacterium* sp.

Os micro-organismos incluídos no gênero *Microbacterium* são bacilos Gram positivos irregulares que geralmente apresentam pigmentação amarela em suas colônias e normalmente são isolados de fontes ambientais, incluindo o solo e detritos (FUNKE; FALSEN; BARREAU, 1995; TANG *et al.*, 2000). No entanto, apesar de apresentar baixa frequência, tem sido relatado o isolamento desse grupo em amostras clínicas associados a infecções pulmonares e pós-cirúrgicas (GIAMMANCO *et al.*, 2006; PALANCA *et al.*, 2008), os isolados são geralmente obtidos após exame sanguíneo, como já relatado em paciente com leucemia por Laffineur *et al.* (2003).

5 CONCLUSÃO

As duas espécies de serpentes analisadas no presente estudo (*Philodryas patagoniensis* e *Xenodon Dorbigny*) apresentaram uma grande quantidade de bactérias presentes em sua cavidade oral, principalmente bacilos gram-negativos, constituindo mais da metade dos isolados. Entre os gêneros de bactérias isoladas neste trabalho estão *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp. e *Proteus* sp., os quais têm sido associados a infecções de pele em humanos e, com exceção de *Bacillus* sp., também a doenças infecciosas em serpentes. Assim, pode-se dizer que a cavidade oral dessas duas espécies de ofídios abrigam micro-organismos patógenos tanto para a própria serpente quanto para o homem, que pode ser contaminado durante o acidente ofídico. Esse último, principalmente por *P. patagonienis* já que possui comportamento agressivo e há relatos de acidentes com importantes manifestações clínicas. O efeito necrosante das secreções dessa espécie descrito por alguns autores como Lopes (2008) e Peichoto (2004) apontam uma grande semelhança com aquele encontrado nas jararacas (*Bothrops* sp.), o que aumenta as chances de infecções no local da picada.

A identificação das principais bactérias que constituem a microbiota oral de serpentes é de grande importância, pois, além de auxiliar no tratamento médico, quando necessário, no caso de acidentes ofídicos, é relevante para o diagnóstico de infecções que acometem esses animais, tanto em cativeiro, devido ao stress gerado nesses ambientes, como em ambiente natural, já que o conhecimento das bactérias envolvidas em um processo de infecção propicia ao clínico, uma escolha inicial de um antibiótico com melhor margem de acerto, mesmo antes dos resultados de cultura e antibiograma.

Por isso, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de conhecer a microbiota oral de serpentes, já que, principalmente no Brasil, são escassos os trabalhos com esse objetivo e os existentes analisaram a microbiota de serpentes em cativeiro, ao contrário deste estudo, onde as amostras foram obtidas no ambiente natural destas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J.G. de *et al.* Estudo bacteriológico de abscessos causados por picada de serpentes do gênero *Bothrops*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 363-367, nov./dez. 1989. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v31n6/01.pdf>. Acesso em: 06 mai. 2012.

ARAÚJO, M.E. de; SANTOS, A.C.M.C.A. dos. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 6, nov./dez. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v30n6/0682.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2011.

ARCHIBALD, L. K.; JARVIS, W. R. Health Care–Associated Infection Outbreak Investigations by the Centers for Disease Control and Prevention, 1946–2005. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 174, n. 11, p. 47-64, Ago. 2011.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 480-489, abr./dez. 2003.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. **Brazilian reptiles – List of species**. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em: 05/06/2012.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n. 1, p. 16-17, jan/fev. 2003.

BRACK, P. Vegetação e paisagem do Litoral Norte do Rio Grande do Sul: patrimônio desconhecido e ameaçado. In: ENCONTRO SOCIOAMBIENTAL DO LITORAL NORTE DO RS, 2., 2006, Imbé. **Ecossistemas e sustentabilidade**: livro de resumos... Imbé: CECLIMAR – UFRGS, 2006. p. 46-71.

CARNAHAN *et al.* Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 27, n. 8, p. 1826-1830, Ago. 1989.

COUTINHO *et al.* Bacterial Septicemia in Water Snakes (*Helicops modestus*) in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 53, n. 4, ago. 2001.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; DIAS-CATÃO, J. L.; **Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

DAMGAAR *et al.* Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. **Immunology and Medical Microbiology**. Oxford, v. 18, p. 47-43, 1997.

DIAZ, F. *et al.* Envenomation by neotropical opisthophthalmid colubrid *Thamnodynastes cf. pallidus* Linné, 1758 (serpentes: colubridae) in Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 46, n. 5, p. 287-290, set./out. 2004.

ELLIE *et al.* Aerobic Bacterial Oral Flora of Garter Snakes: Development of Normal Flora and Pathogenic Potential for Snakes and Humans. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 13, n. 5 p. 954-956, mai. 1981.
FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental, (2007). Web page. Disponível em: <www.fepam.rs.gov.br>. Arquivo acessado em 20 de maio de 2012.

FUNKE, G.; FALSEN, E. ; BARREAU, C. Primary identification of *Microbacterium* spp. encountered in clinical specimens as CDC coryneform group A-4 and A-5 bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 1, p. 188, 1995.

FERREIRA *et al.* Comparative Analysis of Viperidae Venoms Antibacterial Profile: a Short Communication for Proteomics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Nova York, v. 2011 n. [S.I.], Jul. 2008.

FERREIRA-JUNIOR *et al.* Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 12, p. 999-1003. Dez., 2009.

FONSECA, M.G. *et al.* Oral Microbiota of Brazilian Captive Snakes. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 54-60, 28 fev. 2008.

FOWLER, M.E. **Zoo and wild animal medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1986.

GARG *et al.* Wound infections secondary to snakebite. **Journal of Infection in Developing Countries**. Sassari, v. 3, n. 3, p. 221-223, 2009.

GIAMMANCO *et al.* Interstitial pulmonary inflammation due to *Microbacterium* sp. after heart transplantation. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 55, p. 335-339, 2006.

GIRAUDO, A. **Serpientes de la Selva Paranaense y del Chaco Húmedo**. Buenos Aires: L.O.L.A, 2001. 328p.

GOLD, W. L.; SALIT, I. E.; *Aeromonas hydrophila* of skin and soft tissue: report of 11 cases and a review. **Clinical infectious diseases**. Oxford, v. 16, p. 69-74, 1993.

GOLDSTEIN, E.J.C. *et al.* Aerobic Bacterial Flora of Garter Snakes: Development of Normal Flora and Pathogenic Potential for Snakes and Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 13, n. 5, p. 954-956, maio 1981.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISHER, B.D. **Microbiologia Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HERPETOLOGIA UFRGS. 2010. **Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. On line. Versão 1.0, Novembro 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/herpetologia>. Acesso em (15/05/2012).

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. **Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 3 n. 2, 1997.

JORGE, M.T. *et al.* Flora Bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 6-10, jan./fev. 1990. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v32n1/a02v32n1.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2011.

JOSEPH, *et al.* *Aeromonas* Primary Wound Infection of a Diver in Polluted Waters. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 10, n. 1, p. 46-49, Jul. 1979.

KIENZLE, N.; MULLER, M.; PEGG, S.; *Aeromonas* wound infection in burns. **Burns**, London, v. 26, n [S. I.], p. 478-482, 1999.

LAFFINEUR *et al.* Description of *Microbacterium paraoxydans* Species in a Patient with Leukemia and Bacteremia Due to a Novel *Microbacterium* sp. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 41, n. 5, p. 2242–2246, Maio 2003.

LEIGH, D. A. An eight year study of postoperative wound infection in two district general hospitals. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 2, p. 207-217, 1981.

LEMA, T. Lista comentada dos répteis ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia** v. 7, p. 41-150, 1994.

LEMA, T. **Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografia – ofidismo**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2002.

LOPES, P. H. **Alterações locais induzidas pela secreção tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Instituto de Biociências , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MARCUS, L.C. Infectious diseases of reptiles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v.159, p.1626-1631, 1971.

MEDEIROS, *et. al.* Bites by the colubrid snake *Philodryas patagoniensis*: A clinical and epidemiological study of 297 cases. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. [S. I] p. 1018–1024, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MINTON, S.A. Venomous bites by nonvenomous snakes: an annotated bibliography of colubrid envenomation. **Journal of Wilderness & Environmental Medicine**. [S. I.], v. 1, n. [S. I.], p. 119-127, 1990.

MITCHELL, M. A.; DIAZ-FIGUEROA, O. Clinical Reptile Gastroenterology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. Philadelphia, v. 8, p. 277–298, 2005.

MOSMANN, M.N. **Guia das principais serpentes do mundo**. Canoas: ULBRA, 2001. v.1.

MS (Ministério da Saúde)/FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), 2001. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/FUNASA.

NISHIOKA *et. al.* South American rattlesnake bite and soft-tissue infection: report of a case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberlandia, v. 33, n. 4, p. 401-402, 2000.

NISHIOKA, S.A.; SILVEIRA, P.V.P. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 279-281, maio/jun 1994. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v36n3/a13v36n3.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2011.

OLIVEIRA R. B. *et. al.* DIETA E COMPORTAMENTO ALIMENTAR DA COBRA-NARIGUDA, *LYSTROPHIS DORBIGNYI* (DUMÉRIL, BIBRON & DUMÉRIL, 1854), NO LITORAL NORTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. **Cuadernos de herpetología**, Jujuy, v.14, n. 2, p. 117-122, 2001.

OLIVEIRA, R.B. de **História natural da comunidade de serpentes de uma região de dunas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. 108 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

PALANCA *et. al.* The First Documented Case of *Microbacterium* sp. Pneumonia. **Clinical Microbiology and Infection**. Paris, v. 30, n. 6, 2008.

PEICHOTO, M.E. *et. al.* Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon**, Oxford, v. 44, p. 589–596, 2004.

PETERS, J.A. & OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical Squamata. Part I - Snakes. **United States National Museum Bulletin**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 297-347, 1970.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. OFIDISMO. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-9, 03 abr. 2000.

PONTES, G. M. F. **História natural de *philodryas patagoniensis* (serpentes: colubridae) no litoral do rio grande do sul, brasil**. Tese (Doutorado em Zoologia) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

POUGH, F. H. *et. al.* **Herpetology**. Third edition. United States of America: Pearson Prentice Hall, 2004.

ROCHA, M.M.T. da; FURTADO M. F. D. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 410-418, jun. 2007.

SALOMÃO, E.L.; M. DI-BERNARDO. 1995. *Philodryas olfersii*: uma cobra comum que mata. Caso registrado na área da 8ª Delegacia Regional de Saúde do RS. **Arquivos da Sociedade de Zoológicos do Brasil**, [S.l.], v. 14, n. 16, p. 21-21, 1995.

SALOMÃO, M. da G.; ALBOLEA, A. B. P.; SANTOS, S. M. A. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetological Review**. São Paulo: v. 34, n.3, p. 307-312, 2003.

SANTOS-COSTA *et. al.* Envenomation by the neotropical colubrid *Boiruna maculata* (Boulenger, 1896): a case report. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 283-286, Set./Out. 2000.

SAZIMA, I. & HADDAD, C.F.B. 1992. Répteis da Serra do Japi: notas sobre história natural. In: MORELLATO, P.C. ed. **História Natural da Serra do Japi. Ecologia e Preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Campinas: Editora da Unicamp / FAPESP.

SHEK *et. al.* Oral bacterial flora of the Chinese cobra (*Naja atra*) and bamboo pit viper (*Trimeresurus albolabris*) in Hong Kong SAR, China. **Hong Kong Medical Journal**, Hong Kong, v. 15, n. 3, p. 183-190, Jun. 2009.

SCHUMACHER, J. Reptile respiratory medicine. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 213–231, 2003.

SILVEIRA, P. V. P.; NISHIOKA, S. A. Non- venomous snake bite and snake bite without envenoming in a Brazilian teaching Hospital. Analysis of 91 cases. **Revista**

do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo , V. 34, n. 6, p. 499-503, Nov/Dez , 1992.

TALAN, D. A. *et. al.* BACTERIOLOGIC ANALYSIS OF INFECTED DOG AND CAT BITES. **Massachusetts Medical Society**, Massachusetts, v. 340, n. 2, p. 85-92, 1999.

TANG *et. al.* Identification of Coryneform Bacterial Isolates by Ribosomal DNA Sequence Analysis. **Journal of clinical microbiology**, Whashington, v. 38, n. 4, p. 1676–1678. Apr. 2000.

TANNOCK, G.W. The normal microflora: new concepts in health promotion. **Microbiology**, Whashington, v. 5, n. 4, 1988.

TOMAZELLI *et. al.* Geomorfologia e Potencial de Preservação dos Campos de Dunas Transgressivos de Cidreira e Itapeva, Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Pesquisas em Geociências**, Porto Alegre, v. 35, n. 2, p. 47-55, Ago./ Out. 2008.

TOZETTI, A. M.; OLIVEIRA, R. B.; PONTES, G. M. F. Defensive repertoire of *Xenodon dorbignyi* (Serpentes, Dipsadidae). **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 157-163, Set. 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. UETZ, P. 2010. **Reptile Database**. Disponível em www.reptile-database.org. Acesso em 16/05/2012.

TWUM-DANSO, *et. al.* Microbiology of postoperative wound infection: a prospective study of 1770 wounds. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 21, p. 29-37, Nov. 1992.

VERRASTRO, L.; SILVA, C.M. da; COLOMBO, P.A Herpetofauna dos ecossistemas de dunas do Litoral Norte do RS. In: WÜRDIG, N.L.; FREITAS, S.M.F. de. (Orgs.) **Ecossistemas e biodiversidade do Litoral Norte**. Porto Alegre: Nova Prova, 2009. p. 202-219.

VIEIRA, E. F.; RANGEL, S. R. S. **Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Geografia física, vegetação e dinâmica sócio-demográfica. Porto Alegre: Sagra, 1988. 256p.

VILLWOCK, J. A. A **Costa Brasileira: Geologia e Evolução**. Notas Técnicas, v. 7, p. 38-49, 1994.

VILLWOCK, J. A. Geografia, Geologia e Gênese do Litoral Norte. *In*: WÜRDIG, N.L.; FREITAS, S.M.F. de. (Orgs.) **Ecosistemas e biodiversidade do Litoral Norte**. Porto Alegre: Nova Prova, p. 12-25, 2009.

VITT, L.J.; CALDWELL J. P. **Herpetology**: an introductory biology of amphibians and reptiles. 3 ed. San Diego: Academic Press, 2009.

WAECHTER, J. L. Aspectos ecológicos da vegetação de restinga no Rio Grande do Sul. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS (série Botânica)**, v. 33, p. 49-68, 1985.

WANG *et. al.* Cathelicidin-BF, a Snake Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptide, Could Be an Excellent Therapeutic Agent for Acne Vulgaris. **Plos One**, Bélgica, v. 6, n. 7, jul. 2011.

YALQIN, *et. al.* Postoperative wound infections. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 29, p. 305-309, Nov. 1994.

ZUG, G.R.; Vitt, L.J.; Caldwell J. P. **Herpetology**: an introductory biology of amphibians and reptiles. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2001.