

## CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS LEPTOSPIROSES EM SERPENTES DO BRASIL

Saburo HYAKUTAKE (1), Persio de BIASI (2), Carlos Almeida SANTA ROSA (1) e  
Hélio Emerson BELLUOMINI (2)

### RESUMO

Os Autores, através do teste de soroaglutinação microscópica, examinaram, pela primeira vez no Brasil, 31 soros de serpentes, pertencentes a oito espécies peçonhentas e oito não-peçonhentas. Detectaram aglutininas contra vários sorotipos de leptospira. Nas serpentes (ambos os sexos), o sorotipo predominante foi *andamana* (80,6%), único para algumas das amostras, com títulos entre 1:200 a 1:1.600, em outras amostras ainda em coaglutinação com *icterohaemorrhagiae*, *ballum*, *cannicola*, *australis*, *javanica*, *guaicururus* e *brasiliensis*, com títulos entre 1:100 e 1:400. *Mastigodryas bifossatus bifossatus* só reagiu contra o sorotipo *javanica* (1:400) e coaglutinou com *brasiliensis* (1:200); *Tomodon dorsatus* e *Xenodon newwedii* não apresentaram reação. São comentados, com relação ao sorotipo *andamana*, o encontro da aglutinina anti-*andamana* em casos fatais de leptospiroses humanas, e o aspecto epidemiológico. O exame dos soros dos funcionários da Seção de Venenos do Instituto Butantan apresentou resultado negativo. Sugerem os Autores serem as serpentes prováveis reservatórios naturais de sorotipos, principalmente pelo isolamento do sorotipo *andamana* de *Bothrops pradoi*. Todavia, esse papel dos répteis deve ser melhor analisado, inclusive no que tange à descoberta de outros sorotipos.

### INTRODUÇÃO

É de consenso geral que o Brasil possui uma riqueza exuberante de fauna, notadamente de serpentes, devido à sua posição geográfica privilegiada ao situar a maior parte da sua área em plena região tropical. Embora os animais de sangue frio ofereçam vasto campo de pesquisa para trabalhos científicos, é este grupo um campo ainda em aberto para estudos de biologia, imunologia e epidemiologia.

Do ponto de vista de ecossistema, no que tange ao ciclo biológico, a população de serpentes constitui um dos elementos que compõe a geobiocenose e estaria intimamente relacionada com os outros elementos desta, tais como a água e os animais que lhe servem de repasto, principalmente os roedores: como

exemplo temos os roedores silvestres, dentre os quais se sobressaem, pela importância, os ratos que penetram nos campos cultivados em busca de alimentos, atraindo para aí os seus predadores dentre eles as serpentes.

As leptospiroses são verdadeiras zoonoses muito difundidas no mundo animal e geralmente acometem ao homem acidentalmente, sendo que o rato é o reservatório natural de leptospiroses e pois, em sendo o animal de predileção na alimentação das serpentes, sugere a viabilidade da hipótese de serem estes ofídios, reservatórios potenciais de leptospiroses como aliás já foi apontado por BABUDIERI<sup>2</sup>.

Poucos são os pesquisadores que se dedicaram às investigações na área de leptospiroses em serpentes. A exemplo podemos citar:

(1) Instituto de Ciências Biomédicas da USP

(2) Instituto Butantan de São Paulo, Brasil

Trabalho apresentado ao XI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical no Rio de Janeiro, Brasil

CAMBIESCO & col.<sup>3</sup>, TURNER & col.<sup>10</sup>, FER-  
RIS & col.<sup>6</sup>, WHITE<sup>11</sup> e VAN DER HOEDEN<sup>7</sup>;  
em nosso meio ainda não foi relatado nenhum  
trabalho sobre o assunto.

O presente trabalho descreve, como infor-  
mação preliminar, um levantamento soroló-  
gico e tentativa de isolamento da leptospira  
entre várias espécies de serpentes, peçonhen-  
tas e não-peçonhentas, do Instituto Butan-  
tan de São Paulo, Brasil.

#### MATERIAL E MÉTODOS

##### 1 — Amostragem

Foram examinadas 31 serpentes, 13 das  
quais pertencentes a oito espécies peçonhen-  
tas e as demais a oito espécies não-peçonhen-  
tas, discriminadas: a) Espécies peçonhentas  
— quatro *Bothrops jararaca*, “jararaca”;  
duas *Bothrops pradoi*; uma *Bothrops neuwie-  
dii*, “jararaca pintada” uma *Bothrops mooje-  
ni*, “caçaca”; uma *Bothrops cotiara*, “co-  
tiara” ou “jararaca de barriga preta”; uma  
*Bothrops alternatus*, “urutu”; uma *Bothrops  
jararacussu*, “jararacussu”; duas *Crotalus  
durissus terrificus*, “cascavel”; b) Espécies  
não peçonhentas — três *Waglerophis merre-  
mü*, “boipeva”; três *Boa constrictor amara-  
lis*, “jiboia”; uma *Mastigodryas bifossatus*  
*bifossatus*, “jararacussu do brejo”; uma *Phi-  
lodryas patagoniensis*, “parlheira”; uma *Lio-  
phhis miliaris*, “cobra d’água”; duas *Tom-  
odon dorsatus*, “cobra espada”, duas *Xenodon  
neuwiedii*, “quiriripitá”; cinco *Thamnody-  
nastes strigatus* “cobra espada”.

As serpentes foram obtidas no Serviço de  
Animais Peçonhentos, do Instituto Butantan,  
Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo.

##### 2 — Colheita de Material

*Sangue* — colhido, assépticamente, por pun-  
ção da crossa aórtica esquerda, após dissec-  
ção do animal e o soro foi obtido depois da  
retração do coágulo, por centrifugação.

*Rins* — após dissecação do animal, um dos  
rins foi coletado por seccionamento e uma  
parte foi apanhada imediatamente, em tubos  
de meio de cultura de Fletcher, em cujo in-  
terior foi fragmentada em partes com auxí-  
lio de pipeta Pasteur.

##### 3 — Método da soroaglutinação

O método utilizado para detecção de anti-  
corpos anti-leptospira foi o da soroaglutina-  
ção microscópica, de acordo com a técnica  
recomendada por peritos da OMS, empregan-  
do-se como antígenos as culturas vivas de di-  
ferentes sorotipos. O título mínimo conside-  
rado para nosso levantamento foi o de 1:100.  
A composição da bateria de antígenos utili-  
zada no presente inquerito foi fornecida pelo  
Departamento de Microbiologia e Imunolo-  
gia, do Instituto de Ciências Biomédicas da  
USP.

##### 4 — Isolamento e identificação de leptospiras

###### *Cultura direta de sangue*

O sangue de serpentes coletado assética-  
mente, foi semeado imediatamente em meio  
semi-sólido de Fletcher. Em vista de que o  
excesso de sangue pode inibir o crescimento  
de leptospiras, utilizamos a técnica de “dina-  
mização”. Consiste em semear uma gota de  
sangue no primeiro tubo de cultura, duas no  
segundo e três no terceiro; após homogenei-  
zar, passar uma, duas ou três gotas para ou-  
tras séries de tubos, até se obter uma diluição  
satisfatória.

###### *Cultura direta de rins*

Os rins são órgãos de eleição para o iso-  
lamento de leptospiras; uma vez colhidos as-  
séticamente, foram seccionados em pequenos  
fragmentos com auxílio de tesoura estéril e  
em seguida prontamente colocados num tubo  
de cultura com meio de Fletcher. Com au-  
xílio de pipeta Pasteur, de extremidade cor-  
tada em bisel, dentro do tubo de meio, foi  
perfurada a superfície dos fragmentos renais  
e levados à estufa a 28°C para exame poste-  
rior.

###### *Purificação de culturas contaminadas*

WHITE<sup>11</sup> assinalou o crescimento de bac-  
térias e fungos não identificados em cultu-  
ras de rins e em hemoculturas de serpentes,  
fato este que também ocorreu em nosso tra-  
balho. Como processo de purificação foi uti-  
lizada a filtração através de filtro de Millipo-  
re, com poros de 0,45  $\mu$  de diâmetro.

T A B E L A I

Sorogrupo	Sorotipo	Cepa de referência
1 — <i>Icterohaemorrhagiae</i>	icterohaemorrhagiae	RGa
2 — <i>Canicola</i>	copenhageni	M20
3 — <i>Pomona</i>	canicola	Hond Utrecht IV
4 — <i>Grippotyphosa</i>	pomona	pomona
5 — <i>Tarassovi</i>	grippotyphosa	Moskva V
6 — <i>Hebdomadis</i>	tarassovi	Mitis Johnson
	hebdomadis	Hebdomadis
	wolffi	3705
	sejroe	M84
	saxkoebing	Mus 24
	goiano (*)	—
	guaicurus (*)	—
7 — <i>Australis</i>	australis	Ballico
8 — <i>Bataviae</i>	bataviae	Swart
	brasiliensis (*)	An 776
9 — <i>Ballum</i>	castellonis	Castellón 3
10 — <i>Panama</i>	panama	CZ 214 K
11 — <i>Pyrogenes</i>	pyrogenes	Salinem
	guaratuba (*)	—
12 — <i>Javanica</i>	javanica	Veldrat Batavia 46
13 — <i>Autumnalis</i>	autumnalis	Akiyami A
	djasiman	Djasiman
14 — <i>Cynopteri</i>	cynopteri	3522 C
15 — <i>Shermani</i>	shermani	LT 821
16 — <i>Celledoni</i>	whitcombi	Whitcomb
17 — <i>Andamana</i>	andamana	CH 11
18 — <i>Semarang</i>	patoc	Patoc I

A bateria de antígenos é composta de 18 Sorogrupos e 27 Sorotipos.

(\*) — Novos sorotipos isolados no Brasil por SANTA ROSA & col.: *goiano* e *guaicurus*, de bovino; *guaratuba*, da cuica (*Philander opossum* L.) e *brasiliensis*, de gambá (*Didelphis marsupialis*)

### Identificação de leptospiros

As leptospiros isoladas foram testadas contra vários soros hiperimunes de coelho, preparados na Seção de Parasitoses Sistemáticas, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, para posterior tipagem no Laboratório de Referência da OMS.

### RESULTADOS

#### 1) Reação de soroaglutinação microscópica

Os resultados dos 31 soros provenientes das serpentes examinadas são apresentados nas Tabelas II e III, onde se observa, em ambas, a predominância notável da aglutinina contra *andamana* (80,6%). A Tabela II mostra, das serpentes peçonhentas, o nome científico e vulgar, o sexo, os títulos para *andamana* e a

coaglutinação para outros sorotipos com respectivos títulos.

A Tabela III, que apresenta a mesma disposição da anterior, reúne os dados obtidos dos soros de serpentes não peçonhentas. Verifica-se que seis soros são negativos; o soro da *Mastigodryas bifossatus bifossatus* foi o único, que não reagiu contra sorotipo *andamana*, mas sim contra *javanica* e *brasiliensis*, aos títulos de 1:400 e 1:200, respectivamente.

#### 2) Culturas em meio de Fletcher

##### Sangue

Apesar da assepsia utilizada na técnica de isolamento, do sangue semeado em série de tubos, não se conseguiu isolar nenhuma leptospira a não ser outras bactérias contaminantes.

TABELA II  
Soroaglutinação microscópica dos soros de serpentes peçonhentas

Nome	Sexo		Neg.	Títulos p/ <i>andamana</i> 1:					Outros Sorotipos	Títulos
	F	M		100	200	400	800	1.600		
<i>Bothrops jararaca</i> "jararaca"	+				+		+		<i>icterohaemorrhagiae guaicurus</i>	1:100 1:100
		+			+			+	<i>icterohaemorrhagiae ballum</i>	1:400 1:100
<i>Bothrops pradoi</i>		+				+			<i>icterohaemorrhagiae canicola panama ballum</i>	1:200 1:200 1:200 1:100
	+					+			<i>icterohaemorrhagiae ballum</i>	1:100 1:100
<i>Bothrops newiiedi</i> "jararaca pintada"	+					+				
<i>Bothrops moojeni</i> "caçaca"	+						+			
<i>Bothrops cotiara</i> "cotiara"	+								<i>brasiliensis</i>	1:100
		+				+				
<i>Bothrops alternatus</i> "urutu"	+									
<i>Bothrops jararacussu</i> "jararacussu"		+							<i>australis</i>	1:100
	+									
<i>Crotalus durissus terrificus</i> "cascavel"	+					+			<i>javanica bataviae brasiliensis</i>	1:200 1:100 1:100
	+									

8 espécies (13 amostras)

TABELA III  
Soroaglutinação microscópica dos soros de serpentes não peçonhentas

Nome	Sexo		Títulos p/ <i>andamana</i> I:					Outros Sorotipos	Títulos
	F	M	Neg.	Títulos					
				100	200	400	800		
<i>Waglerophis merremii</i> "boibeva"	+								1:100
	+			+					
	+				+				
<i>Boa constrictor amaralis</i> "jibola"	+		+						1:400 1:200
	+				+				
<i>Mastigodryas bifossatus</i> "jararacussu do brejo"									1:200 1:100
	+					+			
<i>Liophis miliaris</i> "cobra d'água"									1:200 1:100
								+	
<i>Tomodon dorsatus</i> "cobra espada"									1:200 1:100
	+								
<i>Xenodon newwiedi</i> "quiriripitá"									1:100
<i>Thamnodynastes strigatus</i> "cobra espada"	+								1:100
	+								
	+								

8 espécies (18 amostras)

#### Rins

Dentre os tubos semeados com rins de serpentes, naquele com material colhido no dia 10 de maio de 1974, da *Bothrops pradoi*, macho, observou-se ao exame em microscópio de campo escuro, o crescimento de leptospiiras junto de outras bactérias, em cultura de 7 dias, na estufa a 28°C. Para fim de purificação do material foi utilizado para eliminar os contaminantes, o filtro Millipore, com poros de 0,45  $\mu$  de diâmetro. O material filtrado foi imediatamente semeado, pelo processo de "dinamização", em série de tubos e após uma semana obteve-se uma cultura sem contaminação. As leptospiiras isoladas foram testadas contra vários soros hiperimunes de coelhos. A aglutinação ocorreu somente contra o antisoro *andamana*.

#### DISCUSSÃO E COMENTARIOS

Na literatura especializada em Leptospiroses, inúmeros são os inquéritos encontrados com o fim de se determinar a prevalência de leptospiiras e anticorpos anti-leptospira em animais silvestres. Poucos, porém, são os trabalhos neste sentido referentes às serpentes, sejam elas peçonhentas ou não; no Brasil esta é a primeira pesquisa que se efetuou em tal sentido e nela, conforme foi verificada, as aglutininas mais encontradas nos soros das serpentes, em ambos os grupos estudados, foram do sorotipo *andamana* (80,6%). Algumas amostras reagiram apenas para este sorotipo, enquanto que outras reagiram ainda como coaglutinação com *icterohaemorrhagiae*, *ballum*, *canicola*, *australis*, *javanica*, *guai-curus* e *brasiliensis*. Os títulos para *andamana* foram iguais ou superiores aos dos anticorpos coagulantes, o que fala muito em favor da especificidade dos anticorpos encontrados em relação ao sorotipo em questão, embora em alguns casos houvessem títulos iguais entre *andamana* e um outro sorotipo.

O sorotipo *andamana*, isolado inicialmente de homem, em 1930 por TAYLOR & GOYLE<sup>9</sup>, em 1962 foi incluído na relação de leptospiiras apatogênicas. No entanto, CORRÊA & col.<sup>4</sup> em 1964 relataram o isolamento de amostra do sorotipo *andamana* do liquor de paciente portador de forma meningítica fatal.

A amostra em questão foi identificada por Dr. Kitaoka, de acordo com a informação de CORRÊA & col.<sup>5</sup>, como sendo absolutamente idêntica à cepa *andamana* CH<sub>11</sub> de TAYLOR & GOYLE, a qual tinha características culturais idênticas às saprofíticas. Em face de tais circunstâncias, o Grupo de peritos da OMS, reunido em Moskow em 1966 aconselhou considerar o gênero *Leptospira* como monoespecífico até que seja possível delimitar as espécies com todo rigor, sendo o nome da espécie *interrogans* recomendado em razão de sua prioridade sobre *icterohaemorrhagiae* e *biflexa*. Em inquérito sorológico realizado em 1970, SANTA ROSA & col.<sup>8</sup> encontraram 5 soros de trabalhadores da limpeza pública urbana que reagiram somente com *andamana*. Em 1971, CORRÊA & col.<sup>5</sup> relataram mais 8 novos casos humanos de leptospirose por *andamana* diagnosticados através das provas de soroaglutinação.

Estes fatos sugerem estar o sorotipo em questão espalhado em a natureza, hipótese que se reforça agora com os resultados preliminares desta pesquisa. Sabe-se que as serpentes são animais rastejantes estando em contato permanente com o solo e ou a água, possibilitando a sua infecção. Por outro lado, embora se desconheça qualquer isolamento do sorotipo *andamana* de roedores, pode-se supor que as serpentes também possam se infectar através de tais animais que constituem parte de sua alimentação.

ABDULLA & KARSTAD<sup>1</sup> demonstraram, em trabalho experimental, a infecção por sorotipo *pomona* em ofídios, tendo provado inclusive a transmissão entre serpentes por contato, o que torna evidente que as leptospiiras são excretadas pelas serpentes infectadas, provavelmente através da urina tal como acontece em outras espécies de animais.

Do ponto de vista epidemiológico ressalta-se a importância dos achados neste trabalho, sugerindo que também as serpentes se constituem em reservatórios de leptospiiras, podendo contribuir para a transmissão das leptospiroses ao homem e outros animais, particularmente pelo isolamento do sorotipo *andamana* de *Bothrops pradoi*. O papel dos répteis como reservatórios de leptospiiras pa-

togências, no entanto, deve ser melhor analisado através de outras pesquisas, inclusive no que tange a descoberta de répteis hospedeiros de outros sorotipos.

#### SUMMARY

#### *Contribution to the epidemiological study on leptospirosis in Brazilian snakes*

The Authors examined, for the first time in Brasil, by the microscopic serogglutination test, 31 sera of snakes pertaining to 8 venomous, and 8 non venomous species. Agglutinins against several leptospiral serotypes were detected.

In snakes (of both sexes) the predominant serotype was *andamana* (80.6%), the only among some of the samples with titers between 1:200 — 1:1.600; other samples in co-agglutination with *icterohaemorrhagiae*, *ballum*, *canicola*, *australis*, *javanica*, *guaicururus* and *brasiliensis*, present titers between 1:100 — 1:400. *Mastigodryas bifossatus bifossatus* reacted only against the *javanica* serotype (1:400), and co-agglutinated with *brasiliensis* (1:200); *Tomodon dorsatus* and *Xenodon newwiedii* did not show any reaction.

Commented are, in relation to the *andamana* serotype, the detection of anti-*andamana* agglutinin in fatal cases of human leptospirosis, as well as the epidemiologic aspect. An examination of sera from the staff of the Department of Venoms at the I.B. gave negative results.

The Authors suggest, mainly on account of the isolation of the *andamana* serotype from *Bothrops pradoi*, that snakes probably are a natural reservoir of serotypes. However, the role of reptiles in this respect, inclusive as regards the detection of other serotypes, has to be further analysed.

#### AGRADECIMENTOS

Aos Srs. Wilson Fernandes e Giuseppe Puorto, auxiliares de laboratório da Seção de Venenos do Instituto Butantan pela colaboração dada na parte técnica de colheita do material e a Srta. Julieta Bernardes da Silva, auxiliar de laboratório do Instituto Adolfo Lutz, na parte laboratorial da técnica de isolamento de leptospira e das reações de sorroagglutinação microscópica realizadas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLA, P. K. & KARSTAD, L. — Experimental infections with *L. pomona* in snakes and turtles. *Zoonoses Res.* 1:295-306, 1962.
2. BABUDIERI, B. — Animal Reservoirs of Leptospiroses. *Ann. New York Acad. Sci.* 70: 393-413, 1958.
3. CAMBIESCO, D.; STURDZA, N.; RADU, I.; SEFER, M. & NICOLESCO, I. — Recherches Concernant les Sources d'Infection dans les Leptospiroses. *Arch. Roum. Path. Exper.* 18: 361-372, 1959.
4. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; TIRIBA, A. C. & GALVÃO, P. A. A. — Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6:71-74, 1964.
5. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; TIRIBA, A. C.; MARTIRANI, I.; GALVÃO, P. A. A.; ALBANO, A.; FILIPPI, J.; KAIRALLA, C. & AMATO NETO, V. — Leptospire humana por *Leptospira andamana*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13: 137-143, 1971.
6. FERRIS, D. H.; RHOADES, H. E.; HANSON, L. E.; GALTON, M. & MANSFIELD, M. E. — Research into the Nidality of *Leptospira ballum* in Campestral Hosts Including the Hog-Nosed Snake (*Heterodon platyrhinus*). *Cornell Vet.* 51:405-419, 1961.
7. HOEDEN, VAN DER J. — Leptospiral antibodies in cold-blooded animals. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 46:171-172, 1966.
8. SANTA ROSA, C. A.; COSCINA, A. L.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; DA SILVA, A. S. & QUEIROZ, J. C. — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de trabalhadores de diversas profissões. *Rev. Microbiol.* 1: 19-24, 1970.
9. TAYLOR, D. & GOYLE, A. N. — Leptospirosis in Andamans. *Ind. Med. Res. Mem.* n.º 20, 1931.
10. TURNER, L. H.; ELISBERG, B. L.; GORDON SMITH, C. E. & BROOM, J. C. — Acute Febrile illnesses in Malaya: Leptospirosis. *Med. J. Malaya* 14:83-98, 1959.
11. WHITE, F. H. — Leptospiral agglutinins in snake serums. *Amer. J. Vet. Res.* 24: 179-182, 1963.

Recebido para publicação em 23/1/1975.