



## Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil\*

Enterobacteriaceae in the *Alphitobius diaperinus* got from avian farms from Rio Grande do Sul and Santa Catarina States, Brazil

Stefanie Dickel Segabinazi<sup>1</sup>, Maristela Lovato Flóres<sup>2</sup>, Aléverson da Silva Barcelos<sup>3</sup>, Gislaine Jacobsen<sup>3</sup> & Rosângela Dariva Eltz<sup>4</sup>

### RESUMO

O cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) é um inseto considerado como uma das maiores pragas da indústria avícola no Brasil e em diversos países no mundo. A presença dele nos aviários gera diversos transtornos, pois sua ingestão pelas aves, prejudica o ganho de peso e também podem albergar e disseminar entre as aves diversos patógenos. Coletaram-se cascudinhos em seis empresas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, constando de aviários de frangos de corte 54 amostras e de aviários de perus, 10 amostras. Através de métodos de bacteriologia convencional, foram isoladas 14 espécies de 10 gêneros de bactérias da família Enterobacteriaceae das superfícies externa e interna do cascudinho, sendo as quais: *Cedecea* sp. (6,89%), *Citrobacter freundii* (6,89%), *Edwardsiella ictaluri* (6,89%), *Enterobacter aerogenes* (5,07%), *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (0,37%), *Enterobacter gergoviae* (2,53%), *Escherichia coli* (36,96%), *Klebsiella oxytoca* (4,34%), *Klebsiella pneumoniae* (18,11%), *Proteus mirabilis* (8,34%), *Proteus vulgaris* (1,44%), *Salmonella* sp. (0,37%), *Serratia marcescens* (1,44%) e *Yersinia enterocolitica* (0,37%). A maior frequência de isolados bacterianos e da diversidade de espécies isoladas foi observada na superfície externa do inseto quando comparado com a superfície interna. A presença destas enterobactérias nos cascudinhos demonstra que os mesmos são reservatórios potenciais de bactérias patogênicas para as aves.

**Descritores:** cascudinho, enterobactérias, frangos de corte, perus, patologia aviária.

### ABSTRACT

The lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) is an insect considered the great plague of the poultry raising in Brazil and many countries. The present of this insect in poultry farms produce several perturbations, its ingestion by poultry cause lower weight and to protect and to disseminate among poultry several pathogens. The lesser mealworm were harvested from six poultry farms in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Fifty-four samples were harvested from broiler farms, whilst ten samples were harvested from turkey farms. Using the bacteriological analyze, was possible to isolate fourteen species from ten genus of bacteria from the Enterobacteriaceae family on the external and internal surfaces of the lesser mealworm: *Cedecea* sp. (6.89%), *Citrobacter freundii* (6.89%), *Edwardsiella ictaluri* (6.89%), *Enterobacter aerogenes* (5.07%), *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (0.37%), *Enterobacter gergoviae* (2.53%), *Escherichia coli* (36.96%), *Klebsiella oxytoca* (4.34%), *Klebsiella pneumoniae* (18.11%), *Proteus mirabilis* (8.34%), *Proteus vulgaris* (1.44%), *Salmonella* sp. (0.37%), *Serratia marcescens* (1.44%) and *Yersinia enterocolitica* (0.37%). The greater bacterial isolations frequency and the greater species diversity was observed in the external surface of the insect than in the internal surface. The presence of these bacteria on the lesser mealworm shows that it can work as a carrier of infectious agents for the poultry.

**Key words:** lesser mealworm, Enterobacteriaceae, poultry, turkey, avian pathology.

## INTRODUÇÃO

A avicultura industrial em sistema de confinamento proporcionou ao cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) um hábitat ideal para sua multiplicação, tornando-o um problema mundial. Em criações intensivas de perus e frangos estes insetos causam problemas sanitários e econômicos, afetando a saúde e a performance das aves [9].

*Alphitobius diaperinus* (Panzer) é um besouro do Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Coleoptera e Família Tenebrionidae [15]. As formas larval e adulta, são descritas como mantenedoras de patógenos viáveis na sua superfície externa e no seu trato digestivo [12].

O cascudinho pode abrigar amostras patogênicas de *Escherichia coli* por tempo suficiente para infectar pintos, pois insetos adultos eliminam a bactéria nas fezes por seis dias e as larvas por 10 dias [14]. Também é evidente a capacidade do inseto vivo ou morto de carrear *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* no seu interior [5], concordando com afirmações que ele pode servir de reservatório, mantendo a *S. Typhimurium* nos aviários durante e entre seus períodos de crescimento [13]. A larva de *A. diaperinus* também pode ser vetor mecânico de patógenos entéricos de perus [6].

As bactérias da família Enterobacteriaceae são encontradas no solo, na água, frutas, vegetais, grãos, flores e árvores, e em animais, desde insetos ao homem. Habitam os intestinos do homem e animais, como membros da microbiota normal ou como agentes infecciosos [16].

Este trabalho objetivou a pesquisa de bactérias da família Enterobacteriaceae nas superfícies externa e interna do cascudinho, para caracterizá-lo como possível mantenedor e vetor mecânico de enterobactérias em aviários do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 64 amostras de cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*) procedentes de seis empresas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo 54 amostras de aviários de frangos e 10 de aviários de perus. Os insetos foram coletados junto à cama dos aviários, sob bebedouros e comedouros, em três pontos de coleta (nas extremidades e no centro do aviário) sendo acondicionados em potes plásticos esté-

reis e estocados a -18°C. No laboratório cada amostra foi constituída por 2,5g, equivalente a cerca de 250 insetos, sendo processadas conforme a metodologia preconizada para isolamento de salmonelas [17]. Realizou-se análise qualitativa da contaminação externa e interna do cascudinho, como está descrito a seguir:

1. Exame da contaminação externa do cascudinho: 2,5 g de insetos foi lavada em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina 2,5% estéril. Posteriormente, foi coletado 2,5 mL do líquido para ser semeado em tubos de ensaio contendo 22,5 mL de água peptonada tamponada 1%, para o pré-enriquecimento, e incubado a 37°C, durante 24 horas.
2. Exame da contaminação interna do cascudinho: após a amostra ser lavada, foi retirada dos tubos de ensaio e colocada em placas de Petri estéreis contendo álcool 70°, durante 1 minuto, para desinfecção da superfície externa. Após a evaporação completa do álcool, a mesma foi macerada e semeada em caldo de enriquecimento, conforme o descrito para a análise da superfície externa.

O enriquecimento das amostras foi realizado nos caldos tetracionato e Rapaport-Vassiliadis. O plaqueamento em meios sólidos foi feito em ágar verde brilhante e ágar Hektoen. A série bioquímica foi realizada conforme o protocolo de isolamento utilizado [17] e sua leitura e interpretação seguiram a orientação presente em tabelas para identificação de Enterobacteriaceae [10,16].

Colônias suspeitas de *Salmonella* sofreram provas sorológicas com anti-soro somático polivalente O. A amostra positiva para *Salmonella* sp. foi liofilizada e enviada para tipificação no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz.

## RESULTADOS

Foi possível o isolamento de 14 espécies de 10 gêneros de bactérias da família Enterobacteriaceae das superfícies externa e interna do inseto. A enterobactéria mais isolada foi *Escherichia coli*, com 36,96% das amostras positivas, seguida da *Klebsiella pneumoniae* com 18,11% e *Proteus mirabilis* em 8,34%, como pode ser visualizado na Tabela 1. Nesta, se observa a relação de isolamentos bacterianos nas superfícies externa (lavado) e interna (macerado) do cascudinho. Nas 64 amostras de cascudinhos analisadas, obteve-se o total de 301 isolamentos.

**Tabela 1.** Frequência de enterobactérias isoladas de amostras da superfície externa e interna de cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*), coletados de galpões de frangos de corte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, 2004.

Enterobactéria	Externa	Interna	Total	%
<i>Escherichia coli</i>	57	45	102	36,96
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	18	50	18,11
<i>Proteus mirabilis</i>	09	14	23	8,34
<i>Cedecea</i> sp.	07	12	19	6,89
<i>Citrobacter freundii</i>	10	09	19	6,89
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	09	10	19	6,89
<i>Enterobacter aerogenes</i>	11	03	14	5,07
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12	00	12	4,34
<i>Enterobacter gergoviae</i>	01	00	07	2,53
<i>Proteus vulgaris</i>	03	01	04	1,44
<i>Serratia marcescens</i>	04	00	04	1,44
<i>Enterobacter agglomerans</i>	01	00	01	0,37
<i>Salmonella</i> sp.*	01	00	01	0,37
<i>Yersinia enterocolitica</i>	01	00	01	0,37
Total	161 <sup>a</sup>	115 <sup>b</sup>	276	100,00

\* Números com letras iguais não diferem entre si (p<0,05).

+ Amostra móvel, não identificada sorologicamente.

Nas dez amostras de cascudinhos coletadas em galpões de perus, apenas duas espécies de enterobactérias foram isoladas, *Escherichia coli* (88%) e *Klebsiella pneumoniae* (12%) (Tabela 2). A maior frequência de isolamentos de *E. coli* ocorreu na superfície interna do inseto (94,12%) e de *K. pneumoniae* ocorreu na superfície externa (25%).

**Tabela 2.** Frequência de enterobactérias isoladas de amostras da superfície externa e interna de cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*), coletados de galpões de perus do Estado de Santa Catarina, Brasil, 2004.

Enterobactéria	Externa		Interna		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Escherichia coli</i>	06	75	16	94,12	22 <sup>a</sup>	88
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	25	01	5,88	03 <sup>b</sup>	12
Total	08	100,00	17	100,00	25	100,00

\* Números com letras iguais não diferem entre si (p<0,05).

## DISCUSSÃO

As espécies e gêneros de bactérias isoladas dos cascudinhos neste trabalho são semelhantes aos achados de outros autores [3,4]. Um grande número de bactérias Gram negativas, sendo algumas da família Enterobacteriaceae, foram isoladas de cascudinhos, como *E. coli*, *E. intermedia*, *Salmonella* Saint Paul, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella* sp., *Paracolobactrum intermedium* e *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Também corroboram com os resultados obtidos a partir de cascudinhos adultos coletados em aviários do Estado do Paraná e macerados para análise bacteriológica, onde isolaram-se as enterobactérias: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Escherichia coli*,

*Enterobacter* sp., *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakasakii*, *Citrobacter diversus* e *Klebsiella pneumoniae* [3].

A prevalência de *E. coli* nos isolados deste trabalho é muito significativa, demonstrando a possibilidade das aves se infectarem com cepas virulentas de *E. coli* ao os ingerirem. Pois o cascudinho pode estar envolvido na transmissão direta de *E. coli* virulenta e contribuir para a disseminação desta bactéria nos sistemas de produção de frangos e perus, os quais quando infectados com a mesma podem apresentar vários quadros clínicos com septicemia [2,14].

Não foram encontrados na literatura relatos da ocorrência de bactérias do gênero *Cedecea* nos cascudinhos. O maior número de isolados foi recuperado da superfície interna do inseto, sugerindo que a *Cedecea* sp. poderia ser um habitante natural do trato intestinal do cascudinho. Em aves, esta bactéria foi encontrada em dejetos de incubação e no ambiente do incubatório [11], e não há relatos sobre sua importância clínica.

A ocorrência de *K. pneumoniae* nos cascudinhos foi significativa. Isolou-se também *K. oxytoca*, mas ao contrário da *K. pneumoniae*, não há relatos de sua patogenicidade para as aves, nem de seu isolamento em *Alphitobius diaperinus*. Como estão presentes na flora intestinal dos animais, poderia explicar o grande número de isolamentos de *K. pneumoniae* nos insetos que estão em contato com a cama. A *K. pneumoniae* causa, em aves, onfalite, septicemia, doença ocular, respiratória e reprodutiva. Em perus jovens, agrava doenças respiratórias [1,16].

As bactérias do gênero *Citrobacter* são habitantes normais do trato intestinal e respiratório das aves [1], mas sob determinadas situações, podem tornar-se oportunistas produzindo infecções em aves jovens, perus e patos.

Foram isoladas três espécies do gênero *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. gergoviae* e *E. agglomerans*. O fato de o gênero fazer parte da flora intestinal das aves explicaria a maior frequência desta bactéria na superfície externa do cascudinho do que na interna. Elas podem infectar ovos e aves jovens, provocando morte embrionária e onfalite [1].

A enterobactéria *Edwardsiella ictaluri*, foi encontrada em maior número na superfície interna do inseto, sugerindo que ela pode ser um habitante natural do trato intestinal. *E. ictaluri* pode ser um patógeno

oportunista dos animais [16], mas não há informações sobre sua patogenicidade para as aves.

O isolamento de *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris* nas amostras analisadas de *Alphitobius diaperinus* era esperado, pois estes organismos ocorrem, normalmente, no trato intestinal das aves e também provavelmente, no trato intestinal dos insetos.

O único isolamento de *Salmonella* sp. ocorreu na superfície externa do cascudinho, cuja identificação final não foi possível. Assim pode-se afirmar que o inseto contaminou-se com a bactéria que estava presente no substrato da cama do aviário, pois é sabido que as salmonelas podem permanecer por um grande período de tempo no meio ambiente. Como o inseto vive em um ambiente rico em matéria orgânica e em contato com as aves, pode desta forma, também se contaminar com salmonelas [3].

Apesar de salmonelas serem constantes nos aviários, é possível que o número de isolamentos neste trabalho não tenha sido maior devido à provável contaminação das culturas por enterobactérias dos gêneros *Citrobacter* e *Proteus*, pois se sabe que isto pode ocorrer, dificultando assim o isolamento das salmonelas [8]. O cascudinho pode ter relativa resistência à colonização por salmonelas [7]. Contudo, o inseto vivo ou morto é capaz de carrear *S. Typhimurium* em seu interior [4].

O isolamento de *Serratia marcescens* é compatível com os resultados obtidos por outros autores [4]. Esta bactéria ocorre naturalmente nos tratos intestinais de insetos e roedores [10]. O número de isolados de *S. marcescens* obtidos neste trabalho não foi significativa, mas não deve ser descartada sua importância como patógeno oportunista para as aves.

A enterobactéria *Yersinia enterocolitica* foi isolada da superfície externa do cascudinho em apenas uma amostra e na literatura consultada não foram encontrados relatos sobre o isolamento desta bactéria em insetos. A *Y. enterocolitica* é encontrada no meio ambiente e em várias espécies de animais, não sendo patogênica para as aves, pois somente a *Y. pseudotuberculosis* afeta as aves determinando a pseudotuberculose aviária [10,16].

## CONCLUSÕES

O cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), presente na cama dos aviários de frangos de corte e perus dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, possui em suas superfícies externa e in-

terna, diversas bactérias da família Enterobacteriaceae, dentre as quais algumas podem ser patogênicas para as aves em contato direto com o inseto. O grande número de isolamentos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* nos insetos, aponta a possibilidade de transmissão de cepas virulentas, presentes nestes, para as aves.

A partir dos resultados obtidos pode-se demonstrar o potencial deste inseto como reservatório e vetor mecânico de agentes infecciosos bacterianos para frangos de corte e perus da indústria avícola do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e desta forma atentar para a melhoria de suas formas de controle e erradicação dos aviários.

#### REFERÊNCIAS

- 1 **Barnes H.J. 2003.** Miscellaneous and sporadic bacterial infections. In: Saif Y.M. (Ed). *Diseases of Poultry*. 11th edn. Ames: Iowa State, pp.845-862.
- 2 **Barnes H.J., Vaillancourt J.P. & Gross W.B. 2003.** Colibacillosis. In: Saif Y.M. (Ed). *Diseases of Poultry*. 11th edn. Ames: Iowa State, pp.631-656.
- 3 **Chernaki-Leffer A.M., Biesdorf S.M., Almeida L.M., Leffer E.V.B. & Vigne F. 2002.** Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*.4: 243-247,.
- 4 **De Las Casas E., Harein P.K. & Pomeroy B.S 1972.** Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder house. *Environmental Entomology*.1: 27-30.
- 5 **De Las Casas E., Pomeroy B.S & Harein P.K. 1968.** Infection and quantitative recovery of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). *Poultry Science*. 47: 1871-1875.
- 6 **Despins J.L. & Axtell R.C. 1994.** Feeding behavior and growth of turkey poults fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poultry Science*. 73: 1526-1533.
- 7 **Davies R.H. & Wray C. 1995.** Contribution of the lesser mealworm beetle (*Alphitobius diaperinus*) to carriage of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Veterinary Record*. 137: 407-408.
- 8 **Gilchrist M.J.R. 1995.** Enterobacteriaceae: oportunist pathogens and other genera. In: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. & Tenover F.C. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6th edn. Washington: ASM, pp.457-464.
- 9 **Guimarães J.H. 2000.** Ectoparasitas e outros artrópodes importantes para indústria avícola. In: Berchieri Junior A. & Macari M. (Eds). *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, pp.413-422.
- 10 **Holt J.G. 1994.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edn. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 787p.
- 11 **Khan F.M., Afzal H. & Deeba F. 2003.** Bacterial flora of hatchery environment and their in-vitro susceptibility to antimicrobial agents. *Pakistan Veterinary Journal*. 23: 73-77.
- 12 **Krinsky W.L. 2002.** Beetles (Coleoptera). In: Mullen G. & Durden L.(Eds). *Medical and Veterinary Entomology*. San Diego: Academic, pp.87-101.
- 13 **McAllister J.C., Steelman C.D. & Skeeles J.K. 1994.** Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Salmonella* Typhimurium (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology*. 31: 369-372.
- 14 **McAllister J.C. Steelman C.D., Skeeles J.K., Newberry L.A. & Gbur E.E. 1996.** Reservoir competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology*. 33: 983-987.
- 15 **Paiva D.P. 2000.** Cascudinho: biologia. In: *Anais do Simpósio Brasil Sul de Avicultura* (Chapecó, Brasil). pp.135-139.
- 16 **Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994.** *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby, 648p.
- 17 **Siqueira R.S. 1995.** *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Brasília: Embrapa, 159p.