



Revista Brasileira de Ciência Avícola

ISSN: 1516-635X

revista@facta.org.br

Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia  
Avícolas  
Brasil

Chernaki-Leffer, AM; Biesdorf, SM; Almeida, LM; Leffer, EVB; Vigne, F  
Isolamento de Enterobactérias em Alphetobius Diaperinus e na Cama de Aviários no Oeste do Estado  
do Paraná, Brasil  
Revista Brasileira de Ciência Avícola, vol. 4, núm. 3, septiembre-diciembre, 2002, pp. 243-247  
Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas  
Campinas, SP, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179713978009>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



#### ■ Autor(es) / Author(s)

Chernaki-Leffer AM<sup>1</sup>  
Biesdorf SM<sup>2</sup>  
Almeida LM<sup>1</sup>  
Leffer EVB<sup>3</sup>  
Vigne F<sup>4</sup>

1-Programa de Pós- Graduação em Entomologia,  
Depto. de Zoologia - UFPR, Curitiba

2-Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti,  
Campus I UFPR, Curitiba

3-Gerente Técnico de Avicultura- Schering-  
Plough Coopers

4-Médico Veterinário- Cooperativa Agropecuária  
Cascavel Ltda

#### ■ Correspondência / Mail Address

Lúcia Massutti de Almeida

Depto de Zoologia – UFPR  
Caixa Postal 19020  
81531-980 - Curitiba - PR - Brasil

E-mail: amcleffer@uol.com.br

#### ■ Unitermos / Keywords

*Alphitobius Diaperinus*, enterobactérias, granjas  
avícolas

*Alphitobius Diaperinus*, *enterobacteriaceae*,  
poultry brooder houses

#### ■ Observações / Notes

Contribuição nº 1358 do Depto. de Zoologia,  
Universidade Federal do Paraná.

Agradecimentos ao Sr. Jair Luiz Casarotto  
(Gerente de Produção Avícola) e Sra. Alzira T.  
Matsuda de Medeiros (Engenheira Química) da  
COOPAVEL - Cooperativa Agropecuária Cascavel

## Isolamento de Enterobactérias em *A. Diaperinus* e na Cama de Aviários no Oeste do Paraná, Brasil

*Isolation of Enteric and Litter Organisms from Alphitobius Diaperinus in Brooder Chickens Houses in West of Parana State, Brazil*

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento da família Enterobacteriaceae em adultos de *A. diaperinus*, e a correlação entre as bactérias presentes no inseto e na cama para produção de frangos de corte no oeste do Paraná, Brasil. No experimento, insetos adultos foram coletados em 14 granjas. No experimento, foram coletados insetos e material da cama de aviários. Os adultos foram anestesiados com éter, macerados em salina e o material da cama colhido por "swab". O enriquecimento não seletivo foi feito com caldo BHI e o Rappaport-Vassiliadis e Tetratationato. Os meios de plaqueamento foram o ágar MacConkey, ágar *Salmonella*-verde-brilhante. As enterobactérias isoladas em adultos de foram: *Proteus Vulgaris*, *P. mirabilis*, *Escherichia Coli*, *Enterobacter Agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakasakii*, *Citrobacter Diversus* e *Pneumoniae*, enquanto que na cama foram encontrados *P. mirabilis*, *Escherichia Coli*, *Enterobacter Agglomerans* e isoladas *Salmonella* spp. do inseto nem da cama e *P. vulgaris* predominante. *E. coli* foi freqüente nas granjas, tanto na cama e insetos e contribuem na disseminação da colibacilose em

### ABSTRACT

This study was conducted to determine bacterial Enterobacteriaceae in adults of lesser mealworm, *A. diaperinus*, and the correlation of the bacterial species in the insects and in the litter of poultry brooder houses in West of Parana State, Brazil. In the experiment, the adults were collected in 14 poultry houses. In the experiment the insects and the litter were collected in 12 poultry houses. The adults were anaesthetized with eter, macerated in sterile saline and the litter material was taken off by swab. The enrichment was made on the BHI and in Rappaport-Vassiliadis and Tetratationato. The plating media for isolating the enterobacteria were MacConkey, agar *Salmonella*-Shigella and agar brilliant green. The enterobacteria isolated in adults of *A. diaperinus* were: *Proteus Vulgaris*, *P. mirabilis*, *Escherichia Coli*, *Enterobacter Agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. sakasakii*, *Citrobacter Diversus* and *Klebsiella Pneumoniae*, while in the litter were found *P. mirabilis*, *Escherichia Coli*, *Enterobacter Agglomerans* and isolated *Salmonella* spp. in the insect and not in the litter and *P. vulgaris* was predominant. *E. coli* was found in the poultry houses, in the litter and the insects and the bacteria are



## INTRODUÇÃO

O Brasil é consolidado pela alta produtividade da atividade agropecuária, dentro da qual a avicultura vem se destacando no cenário internacional. Qualidade e baixos custos são fatores que colocam o Brasil como o 3º maior produtor e 2º maior exportador de frangos do mundo. O estado do Paraná é o maior produtor de frangos (18,6% da produção nacional) e o oeste paranaense é responsável por 47% da produção do estado (1,13 milhão de aves/ dia).

Este crescimento tem estimulado práticas de manejo como o aumento do número de lotes sobre a mesma cama (devido à escassez da maravalha) e intervalos entre lotes algumas vezes reduzido (5 a 10 dias). Estes fatores parecem contribuir para o aumento populacional de *Alphitobius Diaperinus*, o cascudinho. Esse inseto foi encontrado infestando aviários em Indiana, Estados Unidos, desde 1950 (Gould & Moses, 1951). Segundo Chernaki & Almeida (2001), o ciclo total de *A. diaperinus* à temperatura constante de 28°C é de 42,5 dias, o que indica que a cada lote introduzido na granja (o que ocorre a cada 50 dias, aproximadamente) pode ocorrer uma nova geração de insetos, podendo cada fêmea produzir acima de 2 mil ovos (Steelman, 1996).

Conforme Harris (1966), os estágios de larva e adulto alimentam-se de carne e órgãos internos de aves mortas ou moribundas. Esse hábito, somado ao contato direto do inseto com a cama das aves (rica em excrementos e restos de ração), faz desse coleóptero um possível veiculador de diversos patógenos, como o vírus da leucose aviária (Eidson *et al.* 1965; 1966); vírus da Doença de Gumboro (McAllister *et al.* 1995); Coronavírus (Watson *et al.* 2000); bactérias como *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus*, *Proteus Mirabilis*, *P. vulgaris*, *Paracoloclostridium* Intermedium, *Escherichia Coli*, *E. intermedia*, *E. freundii*, *Serratia Marcescens*, *Klebsiella-Aerobacter*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Salmonella* Saint Paul; fungos como *Aspergillus Flavus*, *A. niger*, *A. repens*, *A. candidus*, *Penicillium* sp. e *Candida* sp. (De las Casas *et al.*, 1972) e protozoários como *Eimeria* (Steelman, 1996; Goodwin & Waltman, 1996).

De las Casas *et al.* (1968) evidenciaram a capacidade de *A. diaperinus* em transmitir *Escherichia*

aviários, embora a maior quantidade de ser sido isolada dos insetos. McAllister estudando larvas e adultos do inseto, encontrou na superfície externa e interna de seus corpos as larvas continham a bactéria por 6 dias e por 10 dias. Porém, após a passagem de um para outro, a bactéria não foi mais detectada, indicando que não ocorre passagem trans

Dentre as bactérias, as do gênero *Salmonella* apresentam maior importância na avicultura, devido ao risco de contaminação alimentar em seres humanos. Essa bactéria já foi isolada de *A. diaperinus*. A presença é rotineiramente verificada em aviários através de pesquisa bacteriológica. De las Casas *et al.* (1968), os adultos de *A. diaperinus* são capazes de veicular *Salmonella*. Harein *et al.* (1970) isolaram 5 espécies em adultos de *A. diaperinus*, identificadas como *S. heidelberg*, *S. whorthington*, *S. typhimurium* var. *copenhagen*. McAllister *et al.* encontraram *S. typhimurium* em larvas de *Alphitobius Diaperinus*, na superfície e no corpo. A bactéria foi isolada das fezes por 28 dias após uma única exposição. Entretanto, Davies & Wray (1995) não isolaram *S. enteritidis* de *A. diaperinus*, por de superfície de dois aviários, 22% continham a bactéria. Harein *et al.* (1970) microorganismos da cama e de *A. diaperinus* concluíram que a cama apresentou um maior número de bactérias quando comparadas às superfícies dos insetos. Os autores também encontraram *S. typhimurium* spp. na superfície da cama e nos insetos.

Este trabalho tem como objetivo o isolamento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em *A. diaperinus*, buscando também uma correlação entre as bactérias presentes no inseto e na cama, em produção de frangos de corte no oeste do Paraná.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento I

Adultos de *Alphitobius Diaperinus* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) foram coletados em granjas avícolas do oeste do Paraná e submetidos a análises bacteriológicas com objetivo de verificar



## Experimento II

Na segunda etapa, foram feitas coletas de insetos e do material da cama de 12 aviários localizados na mesma região da etapa anterior, em sítios diferentes.

### Preparo dos Insetos

Os insetos foram coletados em diversos locais das granjas, abaixo dos comedouros e acondicionados em potes plásticos providos de aeração. Após encaminhamento das amostras ao laboratório, os adultos foram separados do material da cama, anestesiados em éter e pesados. O macerado foi feito em condições assépticas, utilizando-se cubas e pistilos estéreis. No primeiro experimento, os adultos foram macerados em 10 mL de água destilada estéril e no segundo experimento, em 10 mL de solução salina estéril 0,85%. O macerado em solução salina foi adotado nesta etapa conforme indicado nos trabalhos de De las Casas *et al.* (1968, 1972) e Harein *et al.* (1970, 1972).

### Swab de Arrasto

Esta técnica é feita como rotina em aviários para detectar presença de *Salmonella* spp.

Inicialmente, foi preparado um meio de pré-enriquecimento em caldo não seletivo, que compreende uma solução de leite 1% (Leite Molico - Nestlé S.A.) e Caldo Triptose Fosfato) esterilizados à 121°C por 15 minutos e conservados em frascos estéreis (500 mL) com tampa rosqueável.

Foram utilizados 200 mL por galpão. No momento da coleta, gases com cordas esterilizadas (3 gases por galpão) foram mergulhadas na solução e em seguida arrastadas por toda a área do aviário. Após feito o arrasto, as gases foram novamente mergulhadas, mantidas fechadas nos vidros e conservadas em gelo reciclável. Seis horas antes do processamento das amostras no laboratório, os frascos foram retirados do gelo e mantidos em temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ).

As etapas bacteriológicas seguiram a metodologia empregada para o macerado, conforme Experimento II, porém as amostras de swab foram homogeneizadas e colhidas com pipetas estéreis.

macerado em meios de cultura seletivos- in MacConkey (MC), ágar verde brilhante *Salmonella- Shigella* (SS), incubados a 37°C (Experimento I).

Segundo: Inóculo das amostras em enriquecimento não seletivo *Brain Heart* em caldo de enriquecimento seletivo *Rappaport* (RV) (Experimento I e II) e caldo Tetr (Experimento II). Foram utilizados 2 g de macerado em 20 mL de BHI, 0,2 g em 20 mL de RV e 2 g em 20 mL de Tetr.

Terceiro: Incubação dos caldos de enriquecimento a 37°C e 43°C, por 18 a 24 horas, procedendo-se ao plaqueamento nos meios seletivo-indole em auxílio de alça níquel-cromo. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 37°C (Experimento I).

Quarto: Leitura das placas, onde foram observadas 2 ou 3 colônias pequenas e/ou médias, com lactose (incolores), com característica de fermentação também aquelas de coloração rosada e esverdeada.

Quinto: Identificação bioquímica preliminar em repicar de cada uma das placas 2 a 3 colônias com características anteriormente citadas em meio SIM (Sulphide Indol Motility), meio Sugar Iron) e LIA (Lisina Iron Agar), incubadas por 18 a 24 horas.

Sexto: Provas bioquímicas completas. O crescimento bacteriano no TSI foi replicado em meio SIM (*Sulphide Indol Motility*), meio Vermelho de metila (VM), voges-Proskauer de Simmons.

Sétimo: Após 18 a 24 horas a 37°C, as placas foram comparadas com base na tabela de identificação de Enterobacteriaceae (Quinn *et al.*, 1994).

## RESULTADOS

Não foi realizada contagem bacteriana, sendo portanto uma análise estritamente qualitativa.

### Experimento I

Foram isoladas dos insetos 9 espécies: *Proteus Vulgaris*, *P. mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *E. agglomerans*, *E. sakazakii*, *Citrobacter Diversus* e *Klebsiella* spp.

Não foi isolada *Salmonella* spp. nas amostras de macerado de insetos.

*Proteus Vulgaris* foi encontrado em 71,4% das amostras. *E. coli* foi a segunda mais frequente, isolada em 35,7% das amostras.



menor quantidade (7,1%), *K. pneumoniae* e demais espécies de *Enterobacter*.

## Experimento II

Não foram isoladas *Salmonella* spp. dos insetos nem do material da cama colhido através de swab de arrasto. *Proteus* Vulgaris foi a bactéria mais predominante. As bactérias isoladas da cama nem sempre estavam presentes nos insetos, embora a diversidade tenha sido a mesma nas duas condições. Foi verificado também que a maior porcentagem de granjas afetadas teve contaminação bacteriana oriunda dos insetos (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

As bactérias isoladas neste estudo foram relatadas por vários autores americanos nas décadas de 70 e 80, não havendo até então registros deste tipo de pesquisa no Brasil. Dessa forma, a caracterização desse inseto como veiculador de bactérias entéricas torna este estudo bastante relevante para avicultura brasileira.

Concordando com os resultados deste trabalho, De las Casas *et al.* (1972) isolaram os gêneros *Proteus* e *Klebsiella*. Segundo Harrison & Harrison (1986), *K. pneumoniae* é causadora da pneumonia de Friedländer's em humanos, entretanto não há relatos de que a doença seja uma zoonose. Os mesmos autores citam que o gênero *Citrobacter*, também isolado do inseto neste trabalho, provoca bacteremia após penetração na mucosa intestinal, podendo até causar a morte em aves jovens, sendo que, clinicamente, sinais de diarreia podem ser observados. Relataram ainda que os gêneros *Enterobacter* e *Proteus* são geralmente de baixa patogenicidade. Entretanto Morgan (1965) relata que bactérias gram-negativas como *Proteus* sp. podem ser patogênicas ou potencialmente patogênicas para animais de sangue quente, incluindo o homem.

O isolamento de *Escherichia Coli* neste trabalho confere com os resultados de De las Casas *et al.* (1968, 1972), Harein *et al.* (1970, 1972) e McAllister *et al.* (1996). *E. coli* pode infectar aves causando uma doença conhecida como colibacilose. O agente causal é habitante normal do trato intestinal de mamíferos e aves, entretanto, algumas cepas podem causar a doença em aves imunodeprimidas. Neste estudo não

com os resultados de Davies & Wray (1995) que *Alphitobius Diaperinus* possa ser resistente à colonização por esta bactéria. A contaminação persistente do ambiente associados os maiores fatores de risco de infecção. *et al.* (1970, 1972) isolaram espécies de *A. diaperinus*, representando 2,2% da população testada, mas acreditam que essa pode ser significativamente maior e que as amostras podem ter sido contaminadas por *Citrobacter* e *Proteus* spp., que produzem colônias semelhantes a *Salmonella* no ágar verde brilhante. Entretanto, ainda que o isolamento da bactéria tenha sido precocemente em insetos analisados inicialmente, que quando analisados em grupos, relatam que *A. diaperinus* contribui significativamente para a transmissão de microorganismos quando comparado com amostras de cama e pó em aviários. Nascimento *et al.* (2000), a presença de *A. diaperinus* dificulta a ação dos caldos de enriquecimento (Tetrationato, p. ex.) sobre os microrganismos competidores. Todos estes fatores podem contribuir para a ausência de *Salmonella* nesta análise, se as amostras analisadas estivessem contaminadas.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os adultos de *Diaperinus* albergam bactérias diversas e que não tenham sido isoladas espécies de *Salmonella*, estas podem estar presentes, já que o inseto vive em um ambiente rico em matéria orgânica e em contato com as aves.

Os resultados indicam que *E. coli* é bastante comum em granjas avícolas, tanto na cama, como no inseto, e que *A. diaperinus* contribui na disseminação da bactéria em aviários.

O material de cama analisado mostrou que as mesmas bactérias presentes no inseto, por uma quantidade por granja avaliada.

Com isso, pode-se afirmar que o controle de *diaperinus* deve ser reforçado, bem como o manejo da cama de aviários, pois estas são fontes de disseminação de microorganismos para frangos de corte.



**Tabela 1** – Bactérias isoladas em macerado de *Alphitobius Diaperinus* (Panzer) na cama e em ambos substratos, coletados em aviários do oeste do Paraná.

Bactérias	Macerado	Cama	Macerado e Cama
<i>Proteus Vulgaris</i>	11 (83,3%)	8 (66,6%)	9 (75%)
<i>Proteus Mirabilis</i>	6 (50%)	4 (33,3%)	2 (16,6%)
<i>Escherichia Coli</i>	4 (33,3%)	4 (33,3%)	2 (16,6%)
<i>Enterobacter Agglomerans</i>	2 (16,6%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chernaki AM, Almeida LM. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology* 2001; 30 (3): 365-8.

Davies RH, Wray C. Contribution of the lesser mealworm beetle (*Alphitobius Diaperinus*) to carriage of *Salmonella Enteritidis* in poultry. *Veterinary Record* 1995; 137: 407-8.

De las Casas E, Pomeroy BS, Harein PK. Infection and quantitative recovery of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia Coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius Diaperinus* (Panzer). *Poultry Science* 1968; 47(6): 1871-5.

De las Casas E, Harein PK, Pomeroy BS. Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. *Environmental Entomology* 1972; 1(1): 27-30.

Eidson CS, Schmitt SC, Lal JB, Goode RB. The role of darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*) in the transmission of acute leukosis in chickens. *Poultry Science* 1965; 44: 1366-1367.

Eidson CS, Schmitt SC, Goode RB, Lal JB. Induction of leukosis tumors with the beetle *Alphitobius Diaperinus*. *American Journal Veterinary Research* 1966; 27(119): 1053-7.

Goodwin M.A., Waltman WD. Transmission of *Eimeria*, Viruses, and bacteria to the chicks: darkling beetles (*Alphitobius Diaperinus*) as vectors of pathogens. *Journal of Applied Poultry Research* 1996; 5: 51-55.

Gould GE, Moses HE. Lesser mealworm infestation in a broiler house. *Journal of Economic Entomology* 1951; 44: 265.

Harein PK, De las Casas E, Pomeroy BS, York MD. *Salmonella* spp. and serotypes of *Escherichia coli* isolated from the lesser mealworm collected in poultry brooder houses. *Journal of Economic Entomology* 1970; 63(1): 80-2.

Harris F. Observations on the lesser mealworm, *Alphitobius Diaperinus* (Panz.). *Journal of the Georgia Entomologic Society* 1954; 47: 1-10.

Harrison GJ, Harrison LR. *Clinical Avian Medicine and Surgery*. Saunders Company. Philadelphia 1986; 717p.

Mcallister JC, Steelman CD, Skeeles JK. Reservoir Competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology* 1994; 31(3): 369-372.

Mcallister JC, Steelman CD, Newberry LA, Skeeles JK. Disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. *Poultry Science* 1995; 74: 45-9.

Mcallister JC, Steelman CD, Skeeles JK, Newberry LA. Reservoir Competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology* 1996; 33(6): 983-9.

Morgan H. The enteric bacteria. p.610-48. In: *Dictionary of Bacteriology* [ed.] Bacterial and mycotic infections of man. 4<sup>th</sup> ed. Co., Philadelphia, Pa. 1965; 1025p.

Nascimento MS, Berchieri Jr A, Barbosa MD, Zancan M. Comparação de meios de enriquecimento e plaqueamento na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2000; 2(1): 85-9.

Quinn ME, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Microbiology*. London Wolfe Publishing. 1994; 648p.

Steelman D. Beetles threaten profit by damaging poultry carrying diseases and reducing growth, feed efficiency. *Poultry Science* 1996; p.22-23.

Watson DW, Guy JS, Stringham SH. Limited transmission of coronavirus in young turkeys by adult *Alphitobius Diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Medical Entomology* 1996; 33(6): 983-9.

Chernaki-Leffer AM, Biesdorf SM,  
Almeida LM, Leffer EVB, Vigne F



Isolamento de Enterobactérias em  
Diaperinus e na Cama de Aviários no Oeste  
do Paraná, Brasil