



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM RÉPTEIS DE UMA COLEÇÃO COMERCIAL

TIAGO JOSÉ FERNANDES CARVALHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares
de Sousa Jesus

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PARASITAS GASTROINTESTINAIS EM RÉPTEIS DE UMA COLEÇÃO COMERCIAL

TIAGO JOSÉ FERNANDES CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares
de Sousa Jesus

Doutor Jorge Manuel Jesus Correia

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2018

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, o Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, por me ter apoiado e acompanhado desde a génese deste trabalho.

Ao meu Co-Orientador, o Professor Doutor Jorge Correia, pela disponibilidade, por todas as horas passadas a ver lâminas que enriqueceram este trabalho e o meu conhecimento de histopatologia.

Um agradecimento muito especial aos dois, por terem sempre a porta aberta e não terem perdido a paciência com o alongar da escrita deste documento. Não teria sido possível a realização deste trabalho sem a ajuda de ambos.

À Doutora Svetlana Malysheva pela ajuda na identificação de *Ozolaimus*, pela simpatia e prontidão na resposta e pelas imagens e documentos bibliográficos que disponibilizou.

Ao Doutor Peernel Zwart por me ter ajudado na observação e caracterização de algumas lesões histopatológicas. Por ter dispendido o seu tempo e partilhado a sua vasta experiência, sempre com boa disposição.

Ao Doutor Francisco Ponce-Gordo pela sua inestimável ajuda na identificação de protozoários ciliados e amebas.

Ao Doutor Klaudiusz Szczepaniak por toda ajuda na identificação de algumas coccídeas de lagartos e pela sua prontidão.

Ao Doutor Charles Burseley pela preciosa ajuda na confirmação e identificação de alguns nematodes.

À Professora Doutora Isabel da Fonseca pela disponibilidade para me ajudar a tentar identificar oocistos de *Cryptosporidium*.

Um agradecimento também ao Doutor Ellis Greiner, Doutor Michael Cranfield, Doutor Ian Beveridge e ao Doutor Mike Kinsella por terem ajudado de alguma forma a que este trabalho ficasse mais completo.

Um agradecimento especial à Maria do Rosário Luís e à Sandra Carvalho. Além de toda a ajuda técnica na preparação das minhas lâminas de histopatologia que foi indispensável na realização deste estudo, quero agradecer pela simpatia com que sempre me receberam. Tornaram a minha passagem pelo Serviço de Anatomia-Patológica da FMV-ULisboa mais leve e mais fácil. Muito Obrigado por tudo.

À Dra. Lídia Gomes por me abrir a porta do seu laboratório e por me ter feito sentir “quase” à vontade. Pela disponibilidade para aturar os meus inúmeros pedidos e por toda a ajuda.

Ao João Antunes por me ter disponibilizado espaço na loja e me ter deixado colher amostras aos seus animais. Ao Alexandre “Pablo” e Joana “Juanita” pela companhia que me fizeram durante as largas horas que passei na loja.

Por fim, o agradecimento maior, aos meus pais e irmão. Por me terem ensinado através do exemplo o que é a generosidade. Por me terem acompanhado sempre. Essencialmente, por tudo.

RESUMO

A popularidade dos répteis, enquanto animais de estimação, tem aumentado nas últimas décadas. De maneira a estudar o seu parasitismo gastrointestinal, o efeito das condições de manejo na presença de parasitas e o tipo de lesões e sinais clínicos provocados por parasitas de répteis mantidos em cativeiro, este trabalho foi dividido em três partes.

A primeira parte consistiu num rastreio parasitológico. Colheram-se amostras fecais frescas de 82 répteis (46 serpentes, 33 sáurios e 3 quelónios) a partir das quais se realizaram dois esfregaços a fresco e duas flutuações a cada animal. Foram encontrados parasitas do filo Apicomplexa (n=2), Metamonada (n=1) e Nematoda (n=2) em cinco (12,5% de prevalência média) serpentes das 46 testadas. Foram assinalados parasitas dos filios Amoebozoa (n=11), Apicomplexa (n=6), Ciliophora (n=9), Metamonada (n=13), Nematoda (n=17) e Platyhelminthes (n=1) em 25 (79,3% de prevalência média) dos 33 sáurios testados. Em tartarugas detetaram-se os filios Amoebozoa (n=1), Ciliophora (n=2), Metamonada (n=1) e Nematoda (n=3) nos 3 animais testados (79,7% prevalência média).

A outra parte do estudo consistiu na realização de necrópsias de 41 répteis (19 serpentes, 19 sáurios e três quelónios).

Detetaram-se parasitas do filo Amoebozoa (n=1), Apicomplexa (n=3) e Metamonada (n=1) em 4 serpentes. Parasitas dos filios Apicomplexa (n=2), Nematoda (n=8) e Platyhelminthes (n=1) foram encontrados em 11 sáurios. Nesta fase, não se encontraram parasitas em quelónios.

Na análise estatística das informações colhidas durante o estudo (terceira parte deste trabalho), encontrou-se uma associação estatisticamente significativa entre as condições de manejo dos répteis e a presença de parasitas. Encontrou-se também uma associação estatisticamente significativa entre a presença de parasitas e a manifestação de sinais clínicos do aparelho gastrointestinal.

Este estudo, no qual se determinou uma prevalência parasitária média global de 40,5% no rastreio parasitológico, reforça a ideia de que os parasitas gastrointestinais são um elemento relevante na manutenção de répteis em cativeiro. Estudos mais específicos e direccionados são necessários, quer ao efeito que os parasitas têm no hospedeiro, quer no papel que estes podem ter como potenciais causadores de zoonoses e contaminantes ambientais.

Palavras-chave: Amoebozoa, Apicomplexa, cativeiro, Ciliophora, loja de animais, Metamonada, Nematoda, parasitas gastrointestinais, Platyhelminthes, Portugal, répteis.

ABSTRACT

Reptiles' popularity as pets has increased in the last decades. In order to study the gastrointestinal parasitism, the effects of husbandry practices on the prevalence of that parasites, the lesions and clinical signs caused by them the present study was divided in three sections.

The first section comprise a parasitological survey. Fresh faecal samples were collected from 82 reptiles (46 snakes, 33 lizards and three chelonians) and were screened for gastrointestinal parasites by two fresh smears and two flotations of each animal. Parasites of the phyla Apicomplexa (n=2), Metamonada (n=1) and Nematoda (n=2) were found in five (12,5% of mean prevalence) of the 46 snakes tested. Parasites of the phyla Amoebozoa (n=11), Apicomplexa (n=6), Ciliophora (n=9), Metamonada (n=13), Nematoda (n=17) and Platyhelminthes (n=1) were found in 25 (79,3% of mean prevalence) of the 33 lizards tested. In chelonians the phyla Amoebozoa (n=1), Ciliophora (n=2), Metamonada (n=1) and Nematoda (n=3) were found in the three tested animals (79,7 % of mean prevalence).

The second section of the study includes the necropsies of 41 reptiles (19 snakes, 19 lizards and three chelonians).

Parasites of the phyla Amoebozoa (n=1), Apicomplexa (n=3) and Metamonada (n=1) were detected in four snakes. The phyla Apicomplexa (n=2), Nematoda (n=8) and Platyhelminthes (n=1) were found in 11 lizards. In this section no parasites were found in chelonians.

The statistical analysis (third section) of the data collected in this study revealed an association with statistical significance between the husbandry parameters and the presence of gastrointestinal parasites. It was additionally found an association with statistical significance between the presence of gastrointestinal parasites and the manifestation of gastrointestinal clinical signs.

This study, in which was determined a global mean parasite prevalence of 40,5 % during the parasitic survey, reinforces the importance of the gastrointestinal parasites in captive pet reptiles. More narrow and directed studies are needed particularly on the effect of specific parasites in the host or their role as potential zoonotic agents and environmental contaminants.

Keywords: Amoebozoa, Apicomplexa, captivity, Ciliophora, Metamonada, Nematoda, gastrointestinal parasites, pet store, Platyhelminthes, Portugal, reptiles.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT.	IV
ÍNDICE DE FIGURASVIII
ÍNDICE DE FIGURASVIII
ÍNDICE DE GRÁFICOSX
ÍNDICE DE TABELASX
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XI
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular.	2
1.1.1 Loja de animais	2
1.1.2 Serviço de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa	2
1.1.3 Serviço de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa.	3
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Manutenção de répteis em cativeiro	4
2.1.1 O comércio de répteis	4
2.1.2 Legislação	4
2.1.2.1 CITES	4
2.1.2.2 Legislação na União Europeia (UE) e Portugal	5
2.1.2.3 Animais não incluídos nos Anexos	5
2.1.3 Classificação taxonómica	6
2.1.4 Origem dos animais	6
2.1.5 Espécies mais frequentes em cativeiro	7
2.1.6 Factores de maior importância no manejo de répteis em cativeiro	8
2.1.6.1 Temperatura	8
2.1.6.2 Água e Humidade relativa (HR)	8
2.1.6.3 Alimentação	9
2.1.6.4 Iluminação e fotoperíodo	9
2.1.6.5 Tipo de terrário	9
2.2 Parasitas gastrointestinais em répteis mantidos em cativeiro	10
2.2.1 Origem dos animais e condições de manejo	10
2.2.2 Efeitos do cativeiro na resposta ao parasitismo - Stress e Imunidade.	11
2.2.2.1 Sistema imunitário e a resposta ao parasitismo	11
2.2.2.2 Stress em cativeiro e o seu impacto na resposta imunitária.	11
2.2.3 Principais parasitas gastrointestinais de répteis	12
2.2.3.1 Filo Amoebozoa	12
2.2.3.2 Filo Apicomplexa - Não-hemoparasitas (Coccídeas)	13
2.2.3.3 Filo Ciliophora	14

2.2.3.4	Filo Metamonada	14
2.2.3.5	Filo Nematoda	15
2.2.3.6	Filo Platyhelminthes	17
2.2.3.6.1	Classe Cestoda.	17
2.2.3.6.2	Classe Trematoda.	19
2.2.3.7	Filo Arthropoda - Subclasse Pentastomida	20
2.2.3.8	Filo Acanthocephala	20
2.2.4	Diagnóstico de parasitas gastrointestinais.	20
2.2.4.1	<i>Ante mortem</i>	20
2.2.4.2	<i>Post mortem</i>	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Origem da amostra.	22
3.1.1	Amostras utilizadas no rastreio Parasitológico.	22
3.1.2	Amostras colhidas durante as necrópsias	22
3.2	Colheita e conservação das amostras	22
3.2.1	Rastreio parasitológico	22
3.2.2	Amostras colhidas <i>post mortem</i>	23
3.2.2.1	Acondicionamento dos cadáveres.	23
3.2.2.2	Técnica de necrópsia	23
3.2.2.3	Tecidos biológicos para análise histopatológica	23
3.2.2.4	Amostras coprológicas e gastrointestinais.	23
3.2.2.5	Parasitas macroscópicos	24
3.3	Processamento das amostras	24
3.3.1	Técnicas coprológicas	24
3.3.1.1	Esfregaço direto	24
3.3.1.2	Flutuação simples	24
3.3.1.3	Coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen	24
3.3.2	Técnicas de histopatologia.	25
3.3.2.1	Preparação e processamento dos fragmentos	25
3.4	Preparação de parasitas macroscópicos para identificação.	25
3.5	Registo fotográfico e processamento das imagens	25
3.6	Medição de parasitas	26
3.7	Registo dos dados obtidos.	26
3.8	Análise estatística	26
3.8.1	Software	26
3.8.2	Cálculos estatísticos	26
3.8.2.1	Animal positivo.	26
3.8.2.2	Atribuição da classificação das condições de manejo.	27
3.8.2.3	Outras variáveis	27
3.8.2.4	Cálculo da prevalência.	27
3.8.2.5	Associação estatística entre variáveis.	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Rastreio parasitológico.	29

4.1.1	Sub-ordem Serpentes	31
4.1.1.1	Filo Apicomplexa - família Eimeriidae	32
4.1.1.2	Filo Metamonada	33
4.1.1.3	Filo Nematoda	34
4.1.2	Sub-ordem Sauria	36
4.1.2.1	Filo Amoebozoa - <i>Entamoeba</i> sp. Casagrandi & Barbagallo, 1895 . .	36
4.1.2.2	Filo Apicomplexa	38
4.1.2.2.1	<i>Isospora amphiboluri</i> Cannon, 1967	39
4.1.2.2.2	<i>Choleoeimeria</i> spp. Paperna, 1989	40
4.1.2.2.3	Oocistos de género não identificado	43
4.1.2.3	Filo Ciliophora	44
4.1.2.3.1	<i>Balantidium</i> sp. Claparède & Lachmann 1858	44
4.1.2.3.2	<i>Nyctotherus</i> sp. Leidy 1849	45
4.1.2.4	Filo Metamonada	49
4.1.2.5	Filo Nematoda	50
4.1.2.5.1	Família Atractidae	50
4.1.2.5.2	Família Pharyngodonidae	52
4.1.2.5.3	Família Physalopteridae	58
4.1.2.6	Filo Platyhelminthes - <i>Oochoristica</i> sp. Luhe 1898	58
4.1.3	Sub-ordem Cryptodira - Testudinidae	60
4.1.3.1	Filo Amoebozoa - <i>Entamoeba</i> sp. Casagrandi & Barbagallo, 1895 . .	60
4.1.3.2	Filo Ciliophora - <i>Balantidium testudinis</i> Chagas, 1911.	61
4.1.3.3	Filo Metamonada	63
4.1.3.4	Filo Nematoda - Família Pharyngodonidae	63
4.1.3.4.1	Ovos	63
4.1.3.4.2	Parasitas adultos - <i>Tachygonetria</i> sp. Wedl, 1862	65
4.2	Formas parasitárias encontradas <i>post mortem</i>	67
4.2.1	Sub-ordem Serpentes	67
4.2.1.1	Filo Amoebozoa	67
4.2.1.2	Filo Apicomplexa - <i>Cryptosporidium</i> sp.	70
4.2.1.3	Filo Metamonada	76
4.2.1.4	Parasitas não gastrointestinais	76
4.2.1.4.1	Filo Apicomplexa - <i>Hepatozoon</i> sp. Miller, 1908 (Hepatozoidae)	76
4.2.1.4.2	Filo Artropoda - <i>Ophionyssus natricis</i> Gervais, 1844 (Macronyssidae) 78	
4.2.2	Sub-ordem Sauria	79
4.2.2.1	Filo Apicomplexa - <i>Isospora amphiboluri</i> Cannon, 1967.	79
4.2.2.2	Filo Nematoda	80
4.2.2.2.1	Família Atractidae - <i>Cyrtosomum (Atractis) penneri</i> Gambino, 1957 . .	80
4.2.2.2.2	Família Pharyngodonidae - <i>Ozolaimus cf linstowi</i> Malysheva, 2015 . .	82
4.2.2.2.3	Família Pharyngodonidae - Ovos de género desconhecido	84
4.2.2.2.4	Família Physalopteridae - <i>Skrjabinoptera phrynosoma</i> Ortlepp, 1922 .	85
4.2.2.3	Filo Platyhelminthes - <i>Mesocestoides</i> sp. Vaillant, 1863	87
4.2.3	Sub-ordem Cryptodira	89
4.3	Associações estatísticas	90

4.3.1	Condições de manutenção.	90
4.3.2	Sinais clínicos	92
5.CONCLUSÕES.		93
6. PERSPECTIVAS FUTURAS		94
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		95
ANEXOS103

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Oocistos de coccídias de género desconhecido em análise coprológica de cobras.	32
Figura 2 - Ovos de género desconhecido em amostras de <i>Pantherophis guttatus</i>	35
Figura 3 - Quistos de <i>Entamoeba</i> sp. encontrados em amostras fecais de lagartos.	37
Figura 4 - Oocistos de <i>Isospora amphiboluri</i> em exame coprológico de <i>Chlamydosaurus kingii</i>	39
Figura 5 - Oocistos de <i>Choleoeimeria pogonae</i> em exame coprológico de <i>Pogona vitticeps</i>	41
Figura 6 - Oocistos de <i>Choleoeimeria</i> sp. em exame coprológico de <i>Cordylus tropidosternum</i>	42
Figura 7 - Oocistos de coccídea de género desconhecido em análise coprológica de <i>Phelsuma madagascariensis</i>	43
Figura 8 - Trofozoítos de <i>Balantidium</i> sp. em exame coprológico de <i>Iguana iguana</i>	44
Figura 9 - Trofozoítos e quistos de <i>Nyctotherus</i> sp. encontrados ao exame coprológico de sáurios.	48
Figura 10 - Trofozoítos e quisto de Metamonada em exames coprológicos.	49
Figura 11 - Nematodes do género <i>Cyrtosomum</i> em exame coprológico de <i>Iguana iguana</i>	51
Figura 12 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de <i>Iguana iguana</i>	53
Figura 13 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de <i>Pogona vitticeps</i>	54
Figura 14 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de <i>Correlophus ciliatus</i>	54
Figura 15 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de <i>Phrynosoma asio</i>	55
Figura 16 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de <i>Crotaphytus collaris</i>	56
Figura 17 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de <i>Eublepharis macularius</i>	56
Figura 18 - Larva de género desconhecido em amostra de <i>Crotaphytus collaris</i>	57
Figura 19 - <i>Parapharyngodon</i> sp. em amostra coprológica de <i>Iguana iguana</i>	58
Figura 20 - Ovos de <i>Oochoristica</i> sp. em amostra de <i>Physignathus cocincinus</i>	59
Figura 21 - Trofozoítos de <i>Balantidium testudinis</i> encontrados no exame coprológico de <i>Centrochelys sulcata</i>	62
Figura 22 - Ovos de Pharyngodonidae em amostras de Tartarugas de esporas africana.	64

Figura 23 - Macho de <i>Tachygonetria</i> sp. em amostra coprológica de <i>Centrochelys sulcata</i>	65
Figura 24 - Larva de Pharyngodonidae encontrada em amostra coprológica de <i>Centrochelys sulcata</i>	66
Figura 25 - Alterações macroscópicas encontradas durante a necrópsia de uma boa arco-íris (<i>Epicrates cenchria</i>).	68
Figura 26 - Fotocomposição de um corte histológico do intestino da mesma boa arco-íris (<i>Epicrates cenchria</i>).	69
Figura 27 - Células inflamatórias na mucosa do intestino da mesma boa arco-íris (<i>Epicrates cenchria</i>).	69
Figura 28 - Oocistos de possível <i>Cryptosporidium</i> spp. em esfregaços fecais corados com a técnica de Ziehl-Neelsen.	71
Figura 29 - Estômago da cobra do milho adulta.	72
Figura 30 - Lesões microscópicas observadas no estômago da cobra do milho adulta em preparação histológica corada com PAS.	73
Figura 31 - Lesões microscópicas encontradas no intestino da cobra do milho juvenil em preparações histológicas coradas com H&E.	73
Figura 32 - Alterações microscópicas encontradas no intestino de cobra do milho juvenil em preparações histológicas coradas com H&E.	74
Figura 33 - Alterações gástricas encontradas numa cobra do leite Hondurenha.	75
Figura 34 - Gamontes de <i>Hepatozoon</i> sp. em preparação histológica do pulmão de uma boa arco-íris corada com H&E.	77
Figura 35 - Ácaros <i>Ophionyssus natricis</i> encontrados durante a necrópsia de uma Boa-Arco-Íris (<i>Epicrates cenchria</i>).	78
Figura 36 - Formas parasitárias de <i>I. amphiboluri</i> encontradas em preparações histológicas do intestino coradas com H&E.	80
Figura 37 - Pormenores de características morfológicas de <i>Cyrtosomum penneri</i> encontrados durante a necrópsia.	81
Figura 38 - <i>Ozolaimos</i> cf <i>linstowi</i> encontrados no cólon de <i>Iguana iguana</i>	82
Figura 39 - Fotocomposição de <i>Ozolaimos</i> cf <i>linstowi</i> encontrados em <i>Iguana iguana</i> durante a necrópsia.	83
Figura 40 - Ovos de Pharyngodonidae em corte histológico de intestino de <i>Iguana iguana</i>	84
Figura 41 - <i>Srjabinoptera phrynosoma</i> encontrados no estômago de <i>Phrynosoma platyrhinos</i> . Imagens originais.	85
Figura 42 - <i>Srjabinoptera phrynosoma</i> encontrados no estômago de <i>Phrynosoma platyrhinos</i>	86
Figura 43 - <i>Srjabinoptera phrynosoma</i> encontrados no estômago de <i>Phrynosoma platyrhinos</i>	86
Figura 44 - <i>Srjabinoptera phrynosoma</i> encontrados no estômago de <i>Phrynosoma platyrhinos</i>	87
Figura 45 - <i>Mesocestoides</i> sp. em <i>Phrynosoma platyrhinos</i>	88
Figura 46 - Larvas de <i>Mesocestoides</i> sp. encontradas em corte histológico no fígado de um <i>Phrynosoma platyrhinos</i>	89

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Prevalência média estimada (%) dos filis de parasitas encontrados nas diferentes Sub-Ordens de répteis.	30
Gráfico 2 - Nº total de animais de cada sub-ordem e respetivo número de animais positivos aos quais foram realizadas as necrópsias.	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Filis encontrados durante os exames coprológicos e respectivas associações (n= nº de animais positivos)..	30
Tabela 2 - Resultados do teste de Fisher para os diferentes grupos definidos. p - valor de p. OR - Odds ratio médio.	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ® - marca registada
% - por cento
APS - Ácido Periódico de Shiff
BID - “bis in die” - duas vezes ao dia
CITES - *Convention of International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora*
cm - centímetro
ED - esfregação direto
EUA - Estados Unidos da América
FI - flutuação
FMV-ULisboa - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
g - grama
°C - graus Celsius
CI - código de identificação
h - horas
H&E - Hematoxilina e Eosina
HD - hospedeiro definitivo
HI - hospedeiro intermediário
HP - hospedeiro paraténico
IBD - “*Inclusion body disease*”
Kg - quilograma
l - litro
m - metro
ml - mililitro
µm - micrometro
mg - miligrama
min - minuto
NaCl - Cloreto de sódio
Obj. - Objectiva
Oc. - Ocular
OR - *Odds Ratio*
PO - “per os” - por via oral
PT - Portugal
QID - “quater in die” - quatro vezes ao dia
s - segundos
SID - “semel in die” - uma vez ao dia
TID - “ter in die” - três vezes ao dia
UE - União Europeia
UV - Ultra Violeta
ZN - Ziehl-Neelsen
ZnSo4 - Sulfato de zinco

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos parasitas de répteis em cativeiro não tem acompanhado o aumento da sua popularidade enquanto animais de estimação.

Tradicionalmente os investigadores interessados em parasitas de répteis eram taxonomistas e, como tal, a maioria das publicações incidiam em descrições morfológicas de parasitas (principalmente de répteis de vida livre), existindo poucos trabalhos sobre os efeitos destes parasitas no seu hospedeiro e respetivos ciclos de vida (Jacobson, 2007).

Durante o estudo de parasitas gastrointestinais de répteis mantidos em cativeiro é necessário responder a algumas questões que evidenciam o carácter multifatorial deste tipo de infecções: qual a origem do animal? Que espécie de réptil estamos a analisar? Quais são os parasitas mais comuns nesta espécie em vida livre e em cativeiro? Qual a influência do cativeiro permanente e o tipo de condições de manejo na capacidade do animal combater uma infeção parasitária? E qual o potencial efeito dos parasitas no hospedeiro?

Se a nível mundial algumas destas questões ainda estão por responder, em Portugal todas elas permanecem em aberto.

Bernadino (2014) realizou o único trabalho em Portugal sobre parasitas de répteis mantidos em cativeiro, utilizando uma coleção privada de geckos leopardo e animais de proprietários privados.

O presente trabalho foi realizado na tentativa de aumentar o conhecimento que foi introduzido pelo estudo anterior.

Foi escolhida uma loja de animais para a realização do trabalho prático visto que este tipo de coleções apresentam características favoráveis ao estudo de infecções parasitárias. São locais que reúnem várias espécies de animais com origens distintas (criados em cativeiro ou apanhados diretamente da natureza) resultando numa grande variedade de parasitas. Adicionalmente, sendo um sítio de alojamento temporário, são por vezes descuidados os cuidados básicos de manutenção que propiciam o aparecimento de doenças parasitárias. Este fato, aliado a uma taxa de mortalidade potencialmente elevada, torna possível o estudo dos efeitos patogénicos dos parasitas através da realização de necrópsias e análises histopatológicas.

Espera-se que este estudo sirva para abrir, definitivamente, a porta a estudos futuros, seja através da caracterização de parasitas ou, com mais necessidade, através de trabalhos direcionados à fisiopatologia e ciclos de vida.

Além de tentar colmatar a falta de estudos nesta área em Portugal, o presente trabalho resulta de um interesse pessoal sobre répteis, em geral e, os seus parasitas em particular.

1.1 Atividades desenvolvidas durante o estágio curricular.

O presente trabalho é o resultado do conjunto de atividades realizadas durante o estágio curricular inserido no Mestrado Integrado em Medicina Veterinária frequentado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Estas atividades desenvolveram-se em três áreas distintas.

1.1.1 Loja de animais

A colheita das amostras e de alguns dados foi efetuada na loja de animais “Welcome to the Jungle” situada no Lumiar.

Era um espaço comercial dedicado a animais exóticos, com predominância de répteis. Além de animais, comercializavam-se produtos relacionados com a sua alimentação, suplementação alimentar, alojamentos e acessórios complementares.

Estavam mantidos em permanência mais de uma centena de répteis divididos entre o espaço de exposição ao público e o espaço interior restrito ao acesso de clientes onde eram mantidos os animais utilizados para reprodução e reposição dos animais vendidos.

As principais atividades realizadas neste local envolveram a colheita de amostras fecais frescas, a preparação e observação de esfregaços a fresco com solução de NaCl e corados com soluto de Lugol. Adicionalmente, dada a possibilidade de contato continuado com os animais, foi possível colher a informação detalhada sobre as condições de manejo de cada animal e a presença de sinais clínicos.

Durante este período foram observadas amostras frescas de 82 animais, que equivalem à observação de 164 esfregaços a fresco para a elaboração do rastreio parasitológico presente neste estudo.

1.1.2 Serviço de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa

As principais atividades desenvolvidas no laboratório do Serviço de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa estavam relacionadas com a execução das análises coprológicas das amostras colhidas na loja de animais (técnica de flutuação) ou durante a necrópsia (técnica de flutuação e esfregaço direto).

Além destas técnicas foi também realizada limpeza e montagem dos espécimes colhidos durante a necrópsia de modo a serem identificados e realizaram-se colorações, com a técnica de Ziehl-Neelsen, de esfregaços fecais e/ou de conteúdo gástrico.

Durante as atividades desenvolvidas neste laboratório foram realizadas 164 flutuações com amostras fecais frescas colhidas a 82 animais e amostras de 17 animais colhidas durante a necrópsia (23 flutuações e 5 esfregaços diretos).

Após a colheita de espécimes, três conjuntos de nematodes colhidos durante a necrópsia, foram lavados e preparados para identificação.

1.1.3 Serviço de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa

As atividades realizadas relacionadas com o Serviço de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa envolveram necrópsias e observação das lâminas resultantes do processamento das amostras colhidas durante as mesmas.

Todas as necrópsias foram supervisionadas pelo Prof. Doutor Jorge Correia, co-orientador do estagiário.

Foram efetuadas 41 necrópsias relacionadas com o presente trabalho. Adicionalmente o estagiário observou e participou na necrópsia de um dragão barbudo (*Pogona vitticeps*), um okapi (*Okapia johnstoni*), um macaco aranha preto (*Ateles paniscus*), um furão (*Mustela putorius*) e um gambá (*Didelphis marsupialis*).

Apesar de o processamento das amostras não ter feito parte das atividades desenvolvidas foi possível acompanhar este processo.

Foi também realizada a observação de cortes histológicos provenientes de órgãos colhidos durante as necrópsias dos animais utilizados no presente trabalho.

Estas atividades desenvolveram-se durante o período decorrido entre 17/12/2014 e o dia 02/03/2017.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Manutenção de répteis em cativeiro

2.1.1 O comércio de répteis

Os répteis são populares enquanto animais de companhia e estima-se que contribuam com mais de 20% para o valor de comércio de animais vivos se excluídos os peixes ornamentais (Robinson, Griffiths, St. John & Roberts, 2015).

A União Europeia (UE) é um dos maiores mercados mundiais de répteis e desde o início dos anos 1990 que estes animais têm começado a tornar-se mais atrativos como animais de estimação. Apesar de a criação em cativeiro ter aumentado nos últimos anos alguns répteis encontrados em lojas de animais ainda têm a sua origem na natureza causando um impacto considerável na conservação destas espécies (Auliya, 2003).

Em 2005 foi estimado que o valor de importações de répteis vivos na UE tenha sido de 7 milhões de euros (€), superando países como os Estados Unidos da América (EUA) e Japão (Engler & Parry-Jones, 2007).

Segundo um inquérito efetuado pela “American Pet Products Association” (APPA) referente a 2015-2016 é estimado que nos EUA sejam mantidos cerca de 9.3 milhões de répteis (APPA, 2016). No Reino Unido (RU) o número estimado é de 900 mil (PFMA, 2016).

O número de répteis mantidos em cativeiro em Portugal é desconhecido. Com registo na base de dados da CITES (“DATABASE | CITES”, 2018), entre 2010 e 2017, foram importados mais de 450.000 répteis vivos, sendo que mais de 90% pertenciam à família Emydidae. Ainda assim, tendo em conta que estes números apenas contabilizam a entrada registada de animais pertencentes à CITES, estimar um valor de répteis mantidos em Portugal é impossível mas será de esperar que tenha vindo a aumentar como nos restantes países da UE.

2.1.2 Legislação

2.1.2.1 CITES

A nível mundial a regulamentação do comércio de animais é, em parte, baseada na Convenção Internacional Sobre Comércio das Espécies da Flora e Fauna (CITES).

Estabelecida em 1973, entrando em vigor em 1 Julho de 1975 teve como objectivo regular o comércio internacional das espécies de fauna e flora com a intenção de prevenir que este se tornasse uma ameaça para a sobrevivência destas espécies na natureza (Auliya, 2003).

Até hoje, 181 países aceitam voluntariamente as regras desta convenção nos quais se incluem todos os países da União Europeia sendo que Portugal integrou esta lista em 1980 (“Member countries | CITES”, 2016).

As espécies protegidas e o grau de restrição a que estão sujeitas estão organizadas em três anexos denominados I, II e III.

O anexo I inclui as espécies que estão ameaçadas de extinção e o seu comércio é permitido apenas em casos muito restritos e especiais.

O anexo II é constituído pelas espécies que, apesar de não correrem risco eminente de extinção podem vir a estar se o seu comércio não for regulado.

O anexo III inclui espécies que se encontram protegidas em pelo menos um país e que é necessária a cooperação dos outros países para o controlo do seu comércio. Este anexo é diferente dos outros, já que cada país pode fazer alterações independentes (“How CITES works | CITES”, 2016).

Das 10.711 espécies de répteis descritas, atualmente, 80 estão inseridas no anexo I, 673 no anexo II e 40 no anexo III (“The CITES species | CITES”, 2016).

Apesar de seguirem as regulamentações estabelecidas pela CITES os países membros são livres de intensificarem e criarem leis internas específicas. Cada país é incumbido de designar entidades responsáveis por fazer cumprir as normativas. Em Portugal esta responsabilidade é, principalmente, do Serviço de Proteção da Natureza e Ambiente uma divisão da Guarda Nacional Republicana que geralmente atua em cooperação com o Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas.

2.1.2.2 Legislação na União Europeia (UE) e Portugal

Até Julho de 2015 a UE, enquanto entidade, não fazia parte dos membros da CITES. Desta forma foi necessário criar uma legislação própria que apareceu na forma do regulamento (CE) nº. 338/97 do Conselho de 9 de Dezembro de 1996 no qual estão presentes quatro Anexos com as espécies que são abrangidas por este regulamento.

O anexo A compreende todas as espécies ameaçadas de extinção que são ou poderiam ser afetadas pelo seu comércio. O anexo B inclui aquelas espécies cujo comércio pode comprometer a sua sobrevivência ou a sobrevivência de populações em determinados países, ainda que não estejam atualmente ameaçadas de extinção. O anexo C refere-se às espécies indicadas por um determinado país. O anexo D inclui as espécies cujo comércio atinja um volume tal que justifique uma determinada vigilância.

O Regulamento (UE) n.º 750/2013 da Comissão, de 29 de julho de 2013, que altera o Regulamento (CE) n.º 338/97 do Conselho, relativo à proteção de espécies da fauna e da flora selvagens através do controlo do seu comércio é a última atualização feita a estes Anexos (Comissão europeia, 2007; ICNF, 2016).

Portugal enquanto estado membro da UE é regido pela sua legislação e subscreve também a CITES.

A portaria 1226/2009 foi uma alteração importante no que diz respeito à manutenção de répteis em cativeiro já que legalizou a manutenção de algumas cobras das famílias Pythonidae e Boidae, como é o caso das pitão real (*Python regius*), um dos répteis mais populares como animal de estimação a nível mundial (Diário da República, 2009).

2.1.2.3 Animais não incluídos nos Anexos

Apesar da CITES e da legislação Portuguesa e Europeia permitir algum grau de monitorização das espécies incluídas nesses regulamentos, as espécies excluídas circulam dentro da UE com uma liberdade quase total, principalmente no caso de animais criados em cativeiro, sendo muito difícil saber o número de indivíduos mantidos e vendidos.

O aparecimento do comércio “online” criou um mercado de répteis global (legal e ilegal) não regulamentado.

Pelo menos cerca de 700 espécies de répteis excluídos da CITES são comercializados na UE. No entanto, este número poderá ser maior devido à dificuldade de contabilizar as espécies não pertencentes aos anexos da CITES. Adicionalmente, a tendência da manutenção em cativeiro de novas espécies de répteis parece ser crescente (UNEP-WCMC, 2009).

2.1.3 Classificação taxonómica

A classe Reptilia é composta por quatro ordens: Crocodylia, Rhynchocephalia, Squamata e Testudines (Vitt & Caldwell, 2014).

As espécies das ordens Crocodylia (crocodilos, aligátors e gaviais) e Rynchocephalia (tuataras) estão maioritariamente incluídas no ANEXO I e, em menor número, no ANEXO II da CITES o que significa que raramente são encontrados enquanto animal de estimação. Desta forma não serão abordados animais pertencentes a estas ordens de ora em diante.

A ordem Squamata, a mais diversificada, é composta por três subordens: Amphisbaenia que compreende cerca de 194 espécies (Uetz & Hošek, 2018) de animais vulgarmente chamados de cobra-cega. A subordem Lacertilia ou Sauria composta por 6451 espécies (Uetz & Hošek, 2018) de lagartos e a subordem Serpentes ou Ophidia onde se incluem as cobras e contém 3691 espécies (Uetz & Hošek, 2018).

Por sua vez a ordem Testudines é composta por duas subordens: Pleurodira, onde estão agrupadas tartarugas mais primitivas que para esconder a cabeça têm que dobrar o pescoço lateralmente e, a subordem Cryptodira onde se encontram tartarugas capazes de recolher a cabeça rostro-caudalmente (Vitt & Caldwell, 2014). Estas duas subordens compreendem cerca de 350 espécies (Uetz & Hošek, 2018).

Enquanto animais de estimação as subordens mais importantes e significativas são a Sauria, Ophidia e Cryptodira, pertencendo a estas três todos os animais presentes neste estudo e a grande maioria dos répteis mantidos em cativeiro.

Na tabela do Anexo 1 estão indicados o nº de animais de cada ordem, sub-ordem, família e espécie, assim como, o anexo da CITES ou da legislação europeia em que estão inseridos e o seu estatuto de conservação.

2.1.4 Origem dos animais

Os répteis com destino a animal de companhia podem ser de três origens diferentes: criação de cativeiro, apanhados diretamente da natureza ou quintas de criação (“ranching”).

Apesar de a maioria dos estudos efetuados incidirem apenas num determinado país ou grupo reduzido de espécies, na generalidade, apoiam a ideia de que a criação em cativeiro tem aumentado, não só em número de animais como em quantidade de espécies (Auliya, 2003). Em alguns casos a criação em cativeiro pode ser uma alternativa viável à colheita direta da natureza diminuindo a pressão nas populações selvagens. No entanto, animais criados em cativeiro são sujeitos a um controlo menos restrito do que os selvagens. Muitos animais são criados no país de destino, ou países vizinhos, o que pode contribuir para o aumento da investigação científica nas áreas da biologia, requisitos de manutenção e doenças.

No entanto, a tendência para se importarem cada vez menos animais dos países nativos pode representar um decréscimo nas receitas efetuadas pelo comércio destes animais e que podem ter um impacto significativo na economia desses países.

A obtenção relativamente fácil de animais criados em cativeiro pode criar também um distanciamento entre estes animais e os seus homólogos selvagens e limitar a eficácia de campanhas de sustentabilidade e conservação (Robinson et al., 2015).

Em Portugal será de esperar que a criação em cativeiro seja a principal fonte de oferta de répteis com destino a serem mantidos como animais de estimação.

A dificuldade de controlar animais não pertencentes à CITES é especialmente importante em animais apanhados diretamente da natureza.

Apesar do número de espécies de répteis pertencentes ao anexo II da CITES recolhidos diretamente da natureza parecer estar a diminuir, esta ainda é uma fonte significativa de animais. O seu impacto na conservação das espécies ainda não está devidamente conhecido mas sabe-se que o ritmo a que são recolhidos pode representar um risco para as populações destas espécies e ameaçar a sua existência. O decréscimo do comércio de répteis do anexo II da CITES apanhados da natureza está intimamente associado ao decréscimo de indivíduos de iguana verde com esta origem (Robinson et al., 2015).

O “ranching” é definido pela CITES como a criação em ambiente controlado de espécimes que foram coletados da natureza quer sob a forma de ovo ou juvenis, que teriam uma probabilidade reduzida de sobreviver até idade adulta (CITES, 2002).

Por vezes esta colheita é compensada através da libertação de alguns indivíduos de volta à natureza. Esta forma de criação é sempre feita no país de onde é originária a espécie e se bem organizada pode contribuir tanto para a preservação da mesma na natureza como contribuir para o retorno monetário para esses países (Robinson et al., 2015).

Em Portugal o número de répteis comercializados cuja origem é a natureza ou o “ranching” é completamente desconhecido. Mas será expectável que sejam uma fração pequena quando comparada com os animais criados em cativeiro.

2.1.5 Espécies mais frequentes em cativeiro

Apesar de não existirem números oficiais do tipo de espécies e o número de espécimes mantidos em cativeiro, tradicionalmente algumas espécies são mais procuradas do que outras. A iguana verde foi consistentemente, ao longo dos anos, o réptil pertencente ao anexo II da CITES mais comercializado a nível mundial (Auliya, 2003).

Dentro dos animais pertencentes a este anexo, a pitão real é a espécie de ofídio mais comercializada. No caso dos quelónios, quase todos incluídos no anexo II, as tartarugas semi-aquáticas da família Emydidae (géneros *Trachemys*, *Pseudemys* e *Graptemys*) e as terrestres, como a tartaruga russa (*Agrionemys horsfieldii*), a tartaruga de esporas africana (*Centrochelys sulcata*) e a tartauga leopardo (*Stigmochelys pardalis*) são as mais procuradas. Dos répteis excluídos da CITES os sáurios mais mantidos são os dragões barbudos (*Pogona vitticeps*) e os geckos leopardo (*Eublepharis macularius*). No que diz respeito aos ofídios, as espécies mais populares são a cobra do milho (*Pantherophis guttatus*), as cobras do leite (*Lampropeltis triangulum* ssp.) e as cobras rei californianas (*Lampropeltis getula californiae*) (Auliya, 2003; UNEP-WCMC, 2009).

2.1.6 Factores de maior importância no manejo de répteis em cativeiro

A diversidade geográfica das espécies de répteis mantidas em cativeiro torna impossível conhecer as condições de manejo de todos os animais. No entanto existem algumas bases que podem ser estabelecidas e usadas como referência quando se procura satisfazer as necessidades de um réptil.

2.1.6.1 Temperatura

Uma das características mais importantes que distingue os répteis dos outros animais é o facto de serem ectotérmicos. Isto significa que a principal fonte de energia térmica é exterior (Rossi, 2006).

Os comportamentos de termorregulação utilizados pelos répteis incluem: a aproximação e afastamento de fontes de calor como o sol ou substrato aquecido e de zonas de sombra, água ou tocas; variações voluntárias do volume corporal, forma, orientação e postura (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

Todos os répteis têm a sua própria zona de temperatura ótima preferida (ZTOP) que é relativamente característica da espécie (Jacobson, 2007). Isto significa que é necessário providenciar simultaneamente fontes de aquecimento localizadas através de lâmpadas (cerâmica, infravermelhos, halogénio, etc), cabos, tapetes ou pedras de aquecimento e zonas com temperaturas mais baixas para que o animal consiga fazer adequadamente a sua termorregulação. Dependendo dos hábitos de cada animal os esconderijos poderão ser providenciados através de caixas opacas, casca de côco, substratos que permitam ao animal fazer tocas ou plantas artificiais/naturais para animais arborícolas (Rossi, 2006).

2.1.6.2 Água e Humidade relativa (HR)

A disponibilidade de água e a HR dentro do terrário são fatores de extrema importância que dependem e variam consoante os hábitos naturais de cada espécie.

A manutenção do equilíbrio hidrostático é feita através da ingestão/absorção de água necessária para compensar as perdas. Os répteis perdem água pela evaporação através da pele e membranas respiratórias, urina e defecação. Por outro lado a água é adquirida através do consumo direto, da alimentação e em menor quantidade através da absorção cutânea e condensação nas cavidades nasais. Animais de ambientes desérticos estão mais adaptados a reter água, tendo geralmente pele mais impermeável, enquanto animais aquáticos têm pele mais permeável (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

A disponibilidade de água limpa é crucial assim como a manutenção de HR apropriada. Isto pode ser obtido através da oferta de recipientes com água para ingestão direta e banhos, borrifando o terrário com água, dispositivos criadores de nevoeiro e substratos com elevada retenção de água na totalidade do terrário ou em esconderijos.

Nos casos em que é necessária humidade elevada, esta não deve ser obtida com o comprometimento da ventilação, que pode resultar na acumulação de fungos, bactérias e produtos químicos (Varga, 2004; Rossi, 2006).

2.1.6.3 Alimentação

A qualidade da dieta e a periodicidade da oferta de comida devem ser suficientes para garantir um crescimento regular e manutenção de condição corporal adequada (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

Devido ao metabolismo lento e índice de conversão elevado característico dos animais ectotérmicos, alguns répteis podem não necessitar de alimentação frequente. A temperatura, fotoperíodo e humidade relativa influenciam de forma apreciável a capacidade de ingestão e metabolização dos alimentos, sendo estas condições externas determinantes na condição corporal e saúde geral dos répteis (Frye, 1995; Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

Os vegetais e frutas fornecidos devem ser o mais frescos possível e livres de contaminação. No caso de alimento vivo como artrópodes ou roedores a sua alimentação também deve ser tomada em consideração (Frye, 1995).

Deverão ser efetuados todos os esforços para que um animal se alimente de forma independente e evitar o ato de stress que é a alimentação forçada (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

2.1.6.4 Iluminação e fotoperíodo

As necessidades de exposição e a sensibilidade à luz ultravioleta (UV) variam substancialmente consoante a espécie de réptil. Animais de habitat aberto e com pouca vegetação têm depósitos de melanina na pele e peritoneu que limitam a penetração da luz UV. Por sua vez, animais de ambientes florestais são mais sensíveis (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

A qualidade da luz fornecida é de grande importância. Alguns animais precisam de luz UV (principalmente UVB de 290 a 320 nm) para a síntese de vitamina D3 na pele. Esta vitamina é importante para a absorção do cálcio no trato gastrointestinal. A luz UVA (320 a 400 nm) apesar de não interferir no metabolismo da vitamina D3 pode ter benefícios a nível comportamental (Rossi, 2006). Os efeitos da intensidade e espectro da luz ainda não estão bem definidos, se por um lado alguns grupos de répteis necessitam, obrigatoriamente, de luz UV para a síntese de vitamina D3, outras espécies têm sido mantidas com aparente sucesso sem luz UV (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

Além da qualidade e intensidade da luz, também a sua periodicidade representa um fator importante. A quantidade de luz fornecida por dia deve ser maior nos meses de verão do que nos meses de inverno. A incapacidade de fornecer um fotoperíodo adequado a cada espécie pode resultar em problemas reprodutivos ou outras doenças (Rossi, 2006).

Quando não se conhecem os requisitos de luz de uma determinada espécie, é aconselhável o princípio da precaução e utilizar lâmpadas de largo espectro (Lillywhite & Gatten Jr., 1995).

2.1.6.5 Tipo de terrário

O desenho de um terrário para manter um réptil requer alguma preparação prévia e a decisão entre providenciar um ambiente minimalista ou um mais complexo que se aproxime mais ao habitat natural do animal.

O tamanho do terrário deve permitir uma movimentação confortável do animal e ser grande o suficiente para existir um gradiente térmico (Varga, 2004). O tipo de esconderijos e materiais de decoração (ramos, material para fazer covas, etc.) devem ser ajustados aos hábitos que cada espécie manifesta na natureza (Varga, 2004; Rossi, 2006).

Devem ser providenciados esconderijos ao longo de todo o gradiente térmico de forma a um animal nunca ter de escolher entre a sua segurança e a manutenção da sua temperatura (Pough, 1991).

Apesar de existirem poucos estudos nesta área, os animais mantidos em terrários naturalistas parecem apresentar uma melhor capacidade de expressarem mais comportamentos naturais e menos comportamentos anormais do que os mantidos em instalações minimalistas (Warwick & Steedman, 1995).

A tabela do Anexo 2 apresenta alguns dos parâmetros de manutenção das espécies incluídas no presente estudo.

2.2 Parasitas gastrointestinais em répteis mantidos em cativeiro

As doenças gastrointestinais dos répteis são um dos principais motivos de consulta veterinária e o parasitismo a principal causa de sintomas gastrointestinais (Benson, 1999). Para entender porque é que os parasitas são um problema grave em répteis mantidos em cativeiro, é preciso reconhecer que a manifestação de doença parasitária está relacionada com stress de cativeiro e as condições em que os répteis são mantidos (Wilson & Carpenter, 1996).

2.2.1 Origem dos animais e condições de manejo

Os animais criados e mantidos em cativeiro por várias gerações estão mais expostos a parasitas com ciclo de vida direto. Por outro lado, os animais apanhados diretamente da natureza, dado o contato com os hospedeiros intermediários naturais, podem apresentar infecções por parasitas heteroxenos (Jacobson, 2007).

Na natureza os animais raramente contactam com os seu dejetos e restos de comida (Rataj, Lindtner-Knific, Vlahović, Mavri & Dovč, 2011). Além de serem um substrato disponível para bactérias e fungos, perpetuam a reinfeção por parasitas com ciclo de vida direto (Klingenberg, 2007a).

As lojas de animais são um local onde se encontram concentrados animais com origens distintas. Isto significa que um réptil pode contactar com parasitas aos quais nunca foi exposto e, como tal, não ter uma resposta eficaz a esta infeção.

A incapacidade de providenciar uma boa alimentação, gradiente térmico adequado, a concentração de animais em espaços reduzidos e, por vezes, em más condições de higiene, contribuem para ao desenvolvimento, multiplicação e disseminação de parasitas (Reavill & Griffin, 2014).

2.2.2 Efeitos do cativeiro na resposta ao parasitismo - Stress e Imunidade

O cativeiro, por representar um fator intrínseco de stress, além de poder determinar o tipo e a quantidade de parasitas encontrados, pode influenciar a capacidade de o réptil responder à infecção.

2.2.2.1 Sistema imunitário e a resposta ao parasitismo

O sistema imunitário dos répteis é, como na maioria dos vertebrados, constituído por uma rede complexa de células e moléculas circulantes, órgãos e conjuntos de tecidos envolvidos na proteção do animal contra agentes patogénicos (vírus, bactérias e parasitas) e células anormais (tumores) (Origgi, 2007; Zimmerman, Vogel, & Bowden, 2010).

A resposta do sistema imunitário pode ser dividida em imunidade inata e adquirida. A componente inata é composta por um conjunto de respostas inespecíficas de atuação rápida, tratando-se de uma defesa inicial constituída por lisozimas, péptidos antimicrobianos, via do complemento e leucócitos não específicos. Uma função importante da imunidade inata é a resposta inflamatória (Origgi, 2007; Zimmerman et al., 2010). Em répteis uma das respostas inflamatórias mais comuns é a formação de granulomas heterofílicos se o agente patogénico for extracelular ou granulomas histiocíticos se for intracelular. Em répteis, o envolvimento dos eosinófilos em infecções parasitárias, ao contrário do que acontece em mamíferos, não está determinado (Stacy & Pessier, 2007; Zimmerman et al., 2010).

A imunidade adquirida é mais específica para o tipo de agente presente, requerendo dias a semanas para ser totalmente ativada. É dividida em imunidade humoral e celular. A resposta mediada por células citotóxicas é baseada na ação de linfócitos T e células “*natural killers*” e a resposta humoral, principalmente, na síntese e libertação de imunoglobulinas por parte de linfócitos tipo-B. Durante a resposta imunitária existe interação entre os mecanismos de imunidade inata e adquirida (Origgi, 2007; Zimmerman et al., 2010).

O modo de resposta está dependente do tipo e quantidade de parasitas, da sua localização no hospedeiro, do estado imunitário e das condições ambientais em que é mantido o hospedeiro (Stacy & Pessier, 2007).

2.2.2.2 Stress em cativeiro e o seu impacto na resposta imunitária

Em cativeiro, ao contrário do que acontece na natureza, não é dada a possibilidade de os répteis se afastarem ou protegerem dos fatores de stress aos quais são expostos. Desta forma, o confinamento em cativeiro, representa uma origem de stress (Arena & Warwick, 1995).

Os factores de stress podem ser divididos em dois grupos: fisiológicos e psicológicos.

Os fisiológicos englobam aqueles que dificultam a manutenção da homeostasia por parte do animal e incluem temperaturas desajustadas, água e comida insuficientes ou privação de O₂. Por outro lado, os fatores psicológicos como a dominância social, novos ambientes, manuseamento e o confinamento, provocam uma resposta ao stress, apesar de não representarem uma alteração fisiológica direta.

A fase aguda da resposta ao stress é regulada pelo sistema autónomo simpático e inclui a libertação de epinefrina por parte da medula da adrenal (Denardo, 2006).

Outra resposta fisiológica ao stress é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que resulta na produção de corticosteroides pela glândula adrenal. Nos répteis o principal corticosteroide produzido é a corticosterona. Existe uma forte evidência de que os corticosteroides desempenhe um papel crucial na resposta imunitária, causando imunodepressão (Guillette, Cree & Rooney, 1995).

A concentração plasmática elevada de corticosterona está associada a lise da maioria dos timócitos, decréscimo de linfócitos tipo-T e tipo-B (30-50 %) tanto no sangue como no baço e comprometimento da produção de anticorpos (Zapata, Varas & Torroba, 1992).

Apesar de os mecanismos pelos quais isto acontece ainda não estarem definidos parece existir uma relação entre a presença de stress, o aumento de corticosteroides e consequentemente imunossupressão (Guillette et al., 1995). Além desta relação direta entre o stress e a imunodepressão, outros fatores ambientais (principalmente a temperatura) podem simultaneamente causar imunodepressão direta e indireta através do aumento do stress. A involução sazonal do timo associada à baixa temperatura no inverno pode explicar a falta de resposta humoral e celular de répteis mantidos a baixas temperaturas (Guillette et al., 1995; Origgi, 2007).

2.2.3 Principais parasitas gastrointestinais de répteis

Nesta secção, serão referidos apenas os parasitas gastrointestinais mais prevalentes, alguns que apesar de não afetarem este aparelho aparecem nos exames coprológicos de rotina e, outros que apesar de pouco prevalentes, são importantes pela sua patogenicidade.

2.2.3.1 Filo Amoebozoa

O protozoário mais importante neste grupo é a espécie *Entamoeba invadens* e o único que será abordado. Apesar de ser cada vez menos comum, devido ao desenvolvimento do conhecimento das condições de manejo, é um parasita altamente patogénico (Jacobson, 2007; Scullion & Scullion, 2009).

Tem um ciclo de vida direto e reproduz-se assexuadamente através de divisão binária. Formam quistos que são a forma infectante e apresentam elevada resistência no exterior sendo ingeridos pelo hospedeiro através da contaminação fecal da comida, água e terrário. Uma vez no trato gastrointestinal desenvolvem-se em trofozoítos (Jacobson, 2007 ; Mitchell, 2007). Da progressão da infeção podem resultar úlceras nos locais de desenvolvimento abrindo uma via de entrada dos trofozoítos na corrente sanguínea dispersando-os a outros órgãos, preferencialmente o fígado (Mitchell, 2007).

Os sinais clínicos associados à infeção por *E. invadens* são, geralmente, os associados a doença gastrointestinal. Anorexia, perda de peso, desidratação, diarreia e em muitos casos morte.

Apesar de poderem ser encontradas lesões histológicas em vários órgãos (pulmões, baço, pâncreas e rins), as mais comuns são as trato gastrointestinal e fígado.

As lesões presentes no cólon e fígado parecem ser as primárias e as do intestino delgado e estômago secundárias (Greiner & Mader, 2006; Scullion & Scullion, 2009; Jacobson, 2007). O fígado pode apresentar-se mosqueado, de castanho pálido a vermelho escuro e geralmente aumentado de tamanho e friável. Microscopicamente aparecem igualmente lesões necróticas no parênquima hepático que podem ser mascaradas pela presença de tromboembolismos devido à obstrução da veia porta (Mitchell, 2007).

As serpentes são os répteis mais afetados, mas existem casos descritos de amebíase clínica em quelônios (Jacobson & Greiner, 1984) e sáurios (Gray, Marcus, McCarten & Sappington, 1966; Chia et al., 2009).

2.2.3.2 Filo Apicomplexa - Não-hemoparasitas (Coccídeas)

As coccídeas são encontradas em todas as ordens de répteis e, geralmente, desenvolvem-se no interior das células do trato gastrointestinal, apesar de algumas poderem encontrar-se noutros órgãos (Scullion & Scullion, 2009).

Os protozoários gastrointestinais mais relevantes deste filo pertencem à subclasse Coccidia, subordem Eimeriorina e aos géneros *Cryptosporidium*, *Eimeria/Choleoeimeria/Acroeimeria* e *Isospora* (Greiner, 2003; Jacobson, 2007; Scullion & Scullion, 2009).

Estas espécies têm um ciclo de vida monoxeno e a forma infectante é o oocisto. Com a exceção de *Cryptosporidium*, em que a esporogonia acontece dentro do hospedeiro onde produz os oocistos, em todas as outras acontece fora do hospedeiro em ambiente abiótico.

Apesar de pouco se saber acerca dos ciclos de vida particular das espécies que parasitam répteis é aceite que têm uma elevada afinidade por um número restrito de hospedeiros (Greiner, 2003; Scullion & Scullion, 2009).

A forma de infeção é fecal-oral e a presença de fezes no terrário serve de contaminação tanto do substrato como da comida e água. *Isospora amphiboluri* é um parasita comum em Dragões barbudos (*Pogona* sp.) e presente frequentemente em grupos de criação nos EUA, sendo associado a mortalidade em animais neonatos e juvenis (Jacobson, 2007).

As coccídeas do género *Choleoeimeria* provocam hipertrofia e deslocamento do epitélio da vesícula biliar (Paperna & Landsberg, 1989).

Cryptosporidium serpentis provoca regurgitação, anorexia, perda de peso e por vezes um inchaço no terço médio em cobras que corresponde à hipertrofia gástrica associada ao desenvolvimento anormal de tecido conjuntivo, dilatação dos túbulos gástricos e hiperplasia e hipertrofia das glândulas gástricas (Brownstein, Strandberg, Montali, Bush & Fortner, 1977); Greiner, 2003).

Alguns casos envolvendo *Cryptosporidium*, possivelmente *C. saurophilum*, foram reportados em geckos leopardo e as lesões observadas encontravam-se principalmente no intestino delgado com hiperplasia epitelial e inflamação com a presença de células mononucleadas (Jacobson, 2007).

2.2.3.3 Filo Ciliophora

Os parasitas do filo Ciliophora são organismos unicelulares que se movem usando cílios. Todos possuem um macronúcleo, um micronúcleo e, habitualmente, vacúolos contráteis (Scullion & Scullion, 2009).

Os dois géneros com maior interesse pertencentes a este filo são, pela sua elevada prevalência, *Balantidium* e *Nyctotherus*.

O seu ciclo de vida compreende uma via assexuada de divisão vegetativa que ocorre por divisão binária transversa e uma alternativa sexuada através de conjugação, autogamia e citogamia (Frank, 1984).

Os cistos são a forma infectante e são ingeridos durante a alimentação ou contacto com o ambiente contaminado (Greiner & Mader, 2006).

Estes protozoários são considerados comensais em répteis e apenas o género *Balantidium* foi relacionado com doença, causando colite (Barnard & Upton, 1994).

2.2.3.4 Filo Metamonada

Os protozoários flagelados de maior importância clínica que parasitam o sistema gastrointestinal pertencem ao subfilo Mastigophora e às ordens Trichomonadida (géneros *Hexamastix*, *Hypotrichomonas*, *Monocercomonas*, *Tetratrichomonas* e *Tritrichomonas*), Diplomonadida (géneros *Giardia* e *Spironucleus/Hexamita*) e Kinetoplastida (género *Leptomonas*) (Scullion & Scullion, 2009; Greiner & Mader, 2006; Jacobson, 2007).

Os flagelados parasitas do sistema gastrointestinal de répteis encontram-se em pequeno número no lúmen intestinal da maioria dos animais clinicamente saudáveis (Scullion & Scullion, 2009).

Têm um ciclo de vida direto e reproduzem-se assexuadamente através de divisão binária. Os trofozoítos móveis proliferam em condições de humidade e temperatura elevadas e alguns formam quistos para sobreviverem à dessecação. A infeção pode ocorrer através do contacto com fomites, vectores mecânicos que incluem alguns insectos e a ingestão de água e comida contaminadas ou através da cópula (Mitchell, 2007 ; Scullion & Scullion, 2009).

As espécies do género *Monocercomonas* encontram-se em sáurios e ofídios e podem causar sinais de doença gastrointestinal como anorexia, letargia, hipertrofia gástrica, fezes moles, cinzentas e aquosas, ocasionalmente cólicas e prolapso cloacal (Scullion & Scullion, 2009).

A hexamitose é uma doença causada pelo flagelado *Hexamita parva* e foi descrita em quelónios. Normalmente este protozoário, que mede cerca de 8 µm, encontra-se no lúmen intestinal mas por vezes entra nos tratos biliares e urinários (Greiner & Mader, 2006).

Zwart e Truyens, 1975 (citados por Jacobson, 2007) referiram a doença em 6 géneros de Testudines. No seu estudo referiram os sinais clínicos como sendo inespecíficos que incluíam perda de peso e apatia progressiva.

De uma forma geral os sinais clínicos associados a um sobrecrecimento de protozoários flagelados são inespecíficos e podem incluir diarreia, desidratação, anorexia e perda de peso (Mitchell, 2007; Schneller & Pantchev, 2008). As alterações histológicas incluem descamação epitelial e células inflamatórias dentro de uma camada de fibrina na superfície da mucosa (Jacobson, 2007).

2.2.3.5 Filo Nematoda

Os nematodes são os parasitas internos mais diversos e prevalentes em répteis. Existem mais de 500 espécies identificadas que habitam o estômago, intestino delgado, cólon, ceco e, dependendo da migração que fazem, o esôfago, livres na cavidade celômica, no tecido subcutâneo, vias nasais, pulmões entre outros locais (Klingenberg, 2004; Greiner & Mader, 2006).

Sinais clínicos são mais frequentemente observados em animais mantidos em cativeiro que apresentam infecções massivas ou outras doenças concomitantes (Wilson & Carpenter, 1996). Dada a variedade de parasitas deste filo serão organizados pelas famílias e/ou superfamílias mais importantes.

Os nematodes da família Pharyngodonidae são os mais prevalentes deste filo em sáurios e quelônios, havendo poucos registos em serpentes (Pasmans, Blahak, Martel & Pantchev, 2008; Rataj et al., 2011).

Têm ciclo de vida direto e vivem no colón e ceco principalmente de répteis herbívoros. As fêmeas produzem ovos com parede espessa e não embrionados. Geralmente são ovos alongados com um lado aplanado e um opérculo sub-polar pode ser encontrado na maioria (Anderson, 2000). A forma de infecção é principalmente fecal-oral (Klingenberg, 2007b).

Na generalidade são considerados organismos comensais e existem autores que afirmam que podem ajudar na digestão de alimentos de origem vegetal. No entanto, em casos de infecções massivas podem provocar obstruções do trato gastrointestinal, prolapso cloacal e por vezes uma ligeira reacção inflamatória local (Greiner & Mader, 2006; Klingenberg, 2007b; Jacobson, 2007).

Em serpentes uma das famílias de nematodes mais importantes é a família Diaphanocephalidae onde se inclui o género *Kalicephalus*.

Têm ciclo de vida direto, os adultos encontram-se no trato gastrointestinal e as fêmeas colocam ovos em estágio avançado de mórula. No exterior, as larvas eclodem e desenvolvem-se até à forma infectante de L3. A forma como infectam os hospedeiros ainda não é totalmente conhecida, podendo ser através de ingestão da L3, diretamente ou através de hospedeiros paraténicos e possivelmente por via transcutânea (Anderson, 2000; Jacobson, 2007).

Estes parasitas encontram-se fixados à mucosa gastrointestinal e são hematófagos. Os sinais clínicos incluem anorexia, letargia, desidratação, inapetência, diarreia hemorrágica e, em casos graves, anemia. Estes sinais clínicos resultam da ação direta dos nematodes na mucosa gastrointestinal e que provocam lesões que vão desde enterite ulcerativa, hemorragia, impactação gástrica, gastrite, peritonite, infecção secundária por bactérias Gram- e possivelmente morte (Jacobson, 2007; Klingenberg, 2007b; Schneller & Pantchev, 2008).

Duas famílias com maior importância em serpentes, mas também presentes em sáurios e mais raramente em quelônios são a família Rhabdiasidae (parasitas pulmonares) e Strongyloididae (parasitas gastrointestinais).

Apresentam ciclo de vida direto com uma fase homogónica (dentro do hospedeiro) que se caracteriza por fêmeas partenogénicas e uma fase heterogónica (de vida livre) (Greiner e Mader, 2006). A infecção ocorre quando ovos ou larvas são ingeridas através de comida ou água contaminada (Klingenberg, 2007b) ou então através de migração percutânea das larvas eclodidas em meio abiótico (Greiner & Mader, 2006).

Os gêneros *Rhabdias* (ofídios) e *Entomelas* (sáurios), ambos pertencentes à família Rhabdiasidae, podem causar pneumonia e os sinais clínicos incluem boca constantemente aberta, secreções espumosas, falta de ar, glote estendida. Pode existir pneumonia bacteriana secundária.

O gênero *Strongyloides* (família Strongyloididae) geralmente provoca sinais clínicos mais inespecíficos que incluem perda de peso, anorexia, letargia e por vezes diarreia (Klingenberg, 2007b; Greiner, 2003; Jacobson, 2007).

As migrações efetuadas pelas larvas infetantes podem causar sinais clínicos respiratórios. Durante a necrópsia pode observar-se exsudado e necrose celular nas vias respiratórias principais (Jacobson, 2007).

Os parasitas da superfamília Ascaridoidea, apesar de menos prevalentes que os mencionados anteriormente, importantes em serpentes, sáurios e quelônios.

De uma forma geral os parasitas desta superfamília têm um ciclo de vida heteroxeno e usam vertebrados como hospedeiros intermediários (HI) e definitivos (HD), sendo regular o uso de hospedeiros paraténicos (HP). Habitam o estômago e o intestino do HD e alimentam-se da comida que este ingere. Os ovos dos parasitas desta superfamília que são transmitidos em ambientes terrestres possuem uma cápsula exterior grossa, enquanto os que são transmitidos em ambiente aquático possuem cápsula fina (Anderson, 2000).

Os sinais clínicos associados são inespecíficos e incluem perda de peso ligeira e progressiva, regurgitação de alimento parcialmente digerido e anorexia.

Algumas espécies de ascarídeos podem causar lesões na zona cranial do trato gastrointestinal. Nematodes adultos do gênero *Ophidascaris*, parasitas de ofídios, encontram-se na parte posterior do esófago e estômago onde estão localizados profundamente na submucosa. Uma reação inflamatória esclerosante pode estar associada a estes parasitas. Secundariamente a estas lesões pode ocorrer infeção bacteriana (Jacobson, 2007, Mitchell, 2007).

Também as superfamílias Gnathostomatoidea e Camallanoidea (ordem Spirurida) podem aparecer em todos os grupos de répteis.

Da primeira superfamília, os parasitas do gênero *Spiroxys* encontram-se principalmente em tartarugas (Mitchell, 2007), enquanto os do gênero *Tanqua* parasitam lagartos monitores (Varanidae) (Jacobson, 2007).

Têm um ciclo de vida indireto usando copépodes como HI (Anderson, 2000). As fêmeas depositam ovos em estágio de 4-16 células no interior. No ambiente as larvas desenvolvem-se e eclodem em estágio de L2. São posteriormente ingeridas pelo HI e no hemocélio desenvolvem-se até L3 que é a forma infectante. Os HD ingerem o HI e as L3 libertam-se no estômago e terminam o seu desenvolvimento (Anderson, 2000; Mitchell, 2007).

Os parasitas da superfamília Camallanoidea com maior importância pertencem aos gêneros *Camallanus* e *Serpinema*. Ambos parasitam preferencialmente quelônios (Mitchell, 2007).

O ciclo de vida é indireto e como descrito para a superfamília Gnathostomatoidea utilizam copépodes como HI. No entanto, nesta superfamília, as larvas L1 eclodem *in utero* e saem para o exterior com as fezes ou através da migração de fêmeas grávidas até à cloaca. Em contato com a água, ocorre a sua ruptura e libertam as larvas (Anderson, 2000).

Os parasitas de ambas as superfamílias encontram-se agarrados à mucosa intestinal e gástrica e, sendo hematófagos, a sua presença pode originar úlceras hemorrágicas, inflamação, anemia, peritonite e infeção bacteriana secundária.

Os sinais clínicos incluem anorexia, perda de peso, desidratação, diarreia, melena e possivelmente morte (Klingenberg, 2007b; Mitchell, 2007).

A família *Atractidae*, presente principalmente em sáurios e quelônios, contém parasitas que têm a particularidade de serem ovovivíparos e com ciclo de vida direto. Os ovos eclodem e a larva desenvolve-se até ao terceiro estágio *in utero*. Nesse momento são capazes de autoinfetar o hospedeiro resultando em infecções por um grande número de parasitas (Jacobson, 2007). A transmissão de hospedeiro em hospedeiro ainda não é totalmente conhecida (Anderson, 2000).

Foram atribuídas lesões patológicas ao género *Protractis* que se encontra no intestino grosso de quelônios. As lesões encontradas variaram entre colite verminosa, endurecimento e espessamento do ceco e cólon proximal. Microscopicamente foi descrita uma extensa necrose da mucosa e encontraram-se miríades de parasitas dentro da mucosa com reação inflamatória que se estendia à *muscularis* (Rideout et al., 1987; citado por Jacobson, 2007)

Outra superfamília relevante de parasitas gastrointestinais relevante é a *Physaloptera* na qual se encontram os géneros *Physaloptera*, *Abreviatta* e *Srjabinoptera*.

Têm um ciclo de vida indireto e utilizam artrópodes como hospedeiros intermediários. As fêmeas depositam ovos com larvas L1 totalmente desenvolvidas. No exterior são bastante resistentes entrando no hospedeiro intermediário por ingestão. Completam a sua maturação e a larva L3 infecta os répteis após a predação dos HI. No estômago a larva L3 alimenta-se não do hospedeiro mas da comida que este ingere (Anderson, 2000).

Como obtêm os seus nutrientes a partir dos alimentos ingeridos pelo hospedeiro (Anderson, 2000) em casos de animais com má condição corporal podem contribuir dificultando a sua recuperação.

2.2.3.6 Filo Platyhelminthes

Os parasitas do filo Platyhelminthes mais prevalentes em répteis pertencem às classes Cestoda e Trematoda.

2.2.3.6.1 Classe Cestoda

Várias espécies de cestodes foram identificadas no intestino delgado e outros tecidos principalmente em ofídios e sáurios. Todas as espécies parasitas de répteis têm um ciclo de vida indireto e os répteis infectam-se após a ingestão de invertebrados ou mamíferos parasitados (Klingenberg, 2007b).

Os répteis atuam com hospedeiros intermediários ou definitivos (Wilson & Carpenter, 1996). Anatomicamente, os adultos, são compostos por um escólex, um pescoço e vários proglótides em diferentes estádios de desenvolvimento. A conformação destas estruturas é útil na classificação taxonómica destes parasitas. Não apresentam sistema gastrointestinal e a absorção de nutrientes é efetuada através do tegumento (Jacobson, 2007).

Os cestodes infectam principalmente animais selvagens ou criados em quintas ao ar livre.

Estes parasitas têm a capacidade de sobreviver largos períodos de tempo dentro do hospedeiro e, por vezes, podem surgir casos clínicos associados em animais mantidos em cativeiro (Schneller & Pantchev, 2008).

A maior parte das espécies de cestodes parasitas de répteis pertencem à ordem Proteocephalidea (Wilson & Carpenter, 1996).

Os gêneros mais importantes são *Ophiotaenia*, *Crepidobothrium*, *Acanthotaenia* e *Proteocephalus* (Greiner & Mader, 2006; Jacobson, 2007).

Têm um ciclo de vida indireto utilizando artrópodes copépodes como hospedeiros intermediários que ingerem os ovos. No HI os ovos desenvolvem-se até o estágio de larva procercóide que é a forma infectante para o HD. Uma vez dentro do HD a larva procercóide desenvolve-se em pleurocercóide já no interior de órgãos sólidos como o fígado. Neste estágio o parasita circula livremente pelo hospedeiro e apenas se desenvolve ao entrar no lúmen do intestino delgado, onde se fixa (Greiner & Mader, 2006; Jacobson, 2007).

Os girinos, rãs e peixes podem servir de hospedeiros paratênicos (Jacobson, 2007).

Como estes cestodes vivem no intestino delgado e competem pelos nutrientes do seu hospedeiro, infecções massivas podem causar anorexia, emaciação, obstrução intestinal e possivelmente a morte (Wilson & Carpenter, 1996); Jacobson, 2007).

Outra ordem com grande relevância é a ordem Cyclophyllidea, sendo que os gêneros *Mesocestoides* (Mesocestoididae) e *Oochoristica* (Linstowiidae) são os seus representantes mais importantes.

O gênero *Mesocestoides* necessita de três hospedeiros para completar o seu ciclo. Artrópodes são utilizados como primeiro hospedeiro intermediário, onde as oncosferas se desenvolvem numa larva cisticercoide. Esta larva entra no segundo HI por ingestão do primeiro HI. Os répteis entram nesta fase do ciclo servindo de segundo HI. Neste momento as larvas chamadas de tetratirídio enquistam em pequenos nódulos que se podem encontrar em vários órgãos. O hospedeiro definitivo são aves ou mamíferos que por ingestão do segundo HI se infectam e completam o ciclo (Jacobson, 2007).

No gênero *Oochoristica* os répteis servem de HD. As espécies pertencentes a este gênero necessitam apenas de um HI que geralmente é um inseto coleóptero (Tenebrionidae). Todas as espécies desenvolvem uma cápsula uterina especializada no proglótide grávido cada uma contendo um ovo. Os coleópteros ingerem os ovos e o parasita desenvolve-se no hemocélio. Depois de ingerido o parasita estabelece-se no intestino delgado onde se desenvolve até adulto e se reproduz (Conn, 1985).

Apesar de a resposta inflamatória ao enquistamento das larvas de *Mesocestoides* ser discreta, a ocupação de uma porção significativa do órgão pode causar uma diminuição da sua função (Jacobson, 2007)

Os adultos de *Oochoristica* competem pelos nutrientes do hospedeiro e podem causar perda de peso.

As ordens Bothriocephalidea e Diphyllbothriidea, antigamente consideradas duas famílias da ordem Pseudophyllea (Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008) são o outro grupo de parasitas que merece ser referido.

São cestodes de grandes dimensões podendo medir de 10 a 80 cm de comprimento e até 8 mm de largura (Wilson & Carpenter, 1996).

Os gêneros mais importantes são *Bothridium*, *Duthiersia*, *Spirometra* e *Scyphocephalus* (Diphyllobothriidea) e *Bothriocephalus* (Bothriocephalidea) (Greiner & Mader, 2006; Jacobson, 2007).

Todos os parasitas têm ciclo de vida indireto com interveniência de dois HI, primeiro um crustáceo aquático e depois um vertebrado (Greiner & Mader, 2006).

Os ovos saem através do poro uterino de um proglótide maduro para o trato gastrointestinal do HD. Têm parede espessa, opérculo e são acastanhados contendo um coracídio ciliado que emerge depois de incubado. Este desenvolve-se em procercóide no interior do primeiro HI. Os segundos HI, geralmente peixes, anfíbios ou répteis, ingerem os artrópodes e depois de se libertar, o procercóide, migra para o músculo e aí desenvolve-se em plerocercóide. É neste estágio que o HD se infeta por predação do segundo HI (Bowman & Georgi, 2009).

As larvas podem encontrar-se em tecidos subcutâneos, músculos intercostais, na cavidade celômica ou nas membranas serosas. Quando se encontram no músculo podem causar edema e hemorragia (Wilson & Carpenter, 1996). No caso de larvas encontradas no tecido subcutâneo podem ser observados inchaços de consistência diminuída (Jacobson, 2007). Em cativeiro, animais com infecções graves podem causar anorexia e perda de peso.

Os adultos competem pelos nutrientes do HD e em grande número podem causar regurgitação, debilidade e emaciação. Além deste efeito direto, a local de preensão ao HD pode servir de porta de entrada de bactérias patogénicas (Wilson & Carpenter, 1996).

2.2.3.6.2 Classe Trematoda

Várias espécies de trematodes foram reportadas como parasitas de todos os grupos de répteis, sendo especialmente prevalentes em tartarugas marinhas (Jacobson, 2007). Alguns possuem ciclo de vida direto (Monogenea e alguns Aspidogastrea) enquanto outros necessitam de pelo menos um HI (Digenea) (Greiner & Mader, 2006).

Os parasitas da subclasse Digenea são os mais frequentemente detetados em animais mantidos em cativeiro, encontrando-se em virtualmente todos os tecidos, mas a maioria aparece no trato gastrointestinal. Todas as espécies necessitam de pelo menos um HI, podendo ter dois ou mais (Greiner & Mader, 2006).

Trematodes dos géneros *Dasymetra*, *Lechiorchis*, *Zeugorchis* e *Ochestosoma* (Ochetosomidae) e o género *Stomatrema* (Plagiorchiidae) encontram-se no trato gastrointestinal superior de serpentes (Jacobson, 2007).

Os anfíbios são os HI mas, mesmo em animais mantidos em cativeiro, quando são eliminados da dieta, a infeção pode persistir durante longos períodos de tempo. Isto deve-se, provavelmente, ao longo tempo de maturação das larvas no trato gastrointestinal ou à longevidade dos adultos (Jacobson, 2007).

Como os trematodes adultos fazem migração desde a cavidade oral, através da glote, até ao pulmão, podem causar dispneia, perda de peso, anorexia (Wilson & Carpenter, 1996; Mitchell, 2007) e algumas lesões focais no epitélio pulmonar que podem predispor a infecções bacterianas secundárias (Jacobson, 2007).

2.2.3.7 Filo Arthropoda - Subclasse Pentastomida

Os parasitas pertencentes a esta subordem são especialmente prevalentes em répteis apanhados da natureza.

Os espécimes adultos destes parasitas podem atingir grandes dimensões (0,8-20cm) e encontram-se principalmente nos pulmões (Greiner & Mader, 2006).

Os género mais importantes são *Raillietiella* (em sáurios e ofídios), *Kiricephalus*, *Porocephalus* e *Armillifer* (em ofídios), *Sebekia* (em crocodilos) e *Diesingia* (quelónios). Todos necessitam de HI e os répteis são os HD. As larvas ingeridas migram através do trato gastrointestinal e podem fazer migrações viscerais antes de atingirem a maturidade nos pulmões ou sacos aéreos. As lesões associadas à infeção por pentastomídeos são principalmente pulmonares pela acção direta do parasita. Pneumonia com infeção bacteriana secundária pode estar presente (Jacobson, 2007).

2.2.3.8 Filo Acanthocephala

Este filo é um dos menos conhecido em répteis e, à semelhança de cestodes, trematodes e pentastomídeos que têm ciclo indireto, aparece principalmente em répteis recolhidos diretamente da natureza. O HI são artrópodes e os répteis são, normalmente, os HD.

São parasitas que se caracterizam pela presença de um probóscide retráctil coberto de ganchos. Os adultos encontram-se no trato gastrointestinal (principalmente no intestino delgado) de serpentes e tartarugas aquáticas, enquanto as formas imaturas fazem migrações extensas. Estas formas podem ser encontradas na serosa dos órgãos gastrointestinais ou agarrados às cápsulas viscerais de alguns órgãos.

A infeção por parasitas deste filo é geralmente assintomática, mas a presença de imaturos ou ovos agarrados à serosa ou à cápsula visceral dos órgãos, pode resultar numa reação inflamatória moderada (Wilson & Carpenter, 1996; Jacobson, 2007)

2.2.4 Diagnóstico de parasitas gastrointestinais

2.2.4.1 *Ante mortem*

Na maioria das vezes, o diagnóstico de infeção parasitária é efetuado num animal vivo e, no caso dos parasitas gastrointestinais a análise coprológica é o único meio possível.

Esta análise começa com a observação macroscópica das fezes. Por vezes, parasitas adultos ou cápsulas ovígeras podem estar presentes e ser recolhidos.

A técnica coprológica mais comum é a flutuação e pode ser realizada utilizando várias soluções, sendo útil, principalmente, na deteção os de ovos/larvas de nematodes, ovos de cestodes (se libertados dos proglótides), ovos de pentastomídeos, ovos de acantocéfalos, oocistos de coccídeos e trofozoítos e/ou quistos de protozoários ciliados (Greiner & Mader, 2006).

No caso das coccídeos se o objectivo for a observação com a objectiva de imersão deverá usar-se a solução de Sheather (solução saturada de açúcar em água) visto que apresenta maior viscosidade e permite a observação sem que a pressão causada pela objectiva desloque a lamela (Greiner, 2003).

Os esfregaços diretos a fresco são particularmente úteis no estudo de protozoários (principalmente flagelados e amebas) e em animais de dimensões reduzidas já que podem ser efetuados com uma pequena quantidade de fezes.

O diagnóstico de flagelados implica algum treino por parte do observador (Klingenberg, 2007b). Em preparações a fresco com solução salina a 0.9% podem ser observados os movimentos e algumas características morfológicas (Scullion & Scullion, 2009).

A adição de Solutio de Lugol à preparação pode ajudar no diagnóstico de protozoários flagelados e amebas (Scullion & Scullion, 2009).

Outra técnica coprológica é a sedimentação. Esta técnica é utilizada, principalmente, para detetar ovos de trematodes (Greiner & Mader, 2006).

Acoloração de esfregaços fecais também pode ser útil na detecção de parasitas gastrointestinais. Esfregaços fecais corados pela técnica de Ziehl-Neelsen ou Kinyoun podem ser utilizados no diagnóstico de *Cryptosporidium* sp., em que os oocistos aparecem corados de rosa/vermelho sobre um fundo verde/azul.

A coloração de Giemsa pode ser utilizada no diagnóstico de protozoários flagelados. Esta técnica evidencia estruturas morfológicas úteis na classificação destes parasitas (Scullion & Scullion, 2009)

2.2.4.2 *Post mortem*

A necrópsia é de extrema importância no diagnóstico e identificação de parasitas.

Além de ser um recurso que implica a morte do animal em questão, em situações em que este pertença a uma coleção ou esteja em contacto com outros animais, pode servir para tratar outros. Adicionalmente, qualquer esforço que implique a identificação de um parasita implica sempre o aumento do conhecimento sobre esta temática.

No caso de parasitas macroscópicos, estes podem ser recolhidos, identificados e permitir a identificação de lesões, localização do parasita e determinar a presença de parasitas microscópicos (Terrel & Stacey, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem da amostra

3.1.1 Amostras utilizadas no rastreio Parasitológico

Para este rastreio parasitológico colheram-se amostras fecais de 82 répteis que pertenciam a uma coleção presente na loja de animais “Welcome to the Jungle”.

Foram colhidas amostras de 33 sáurios, 46 ofídios e três quelónios.

3.1.2 Amostras colhidas durante as necrópsias

Colheram-se amostras biológicas *post mortem* em 41 cadáveres de répteis com três origens distintas. Uma iguana verde (*Iguana iguana*) era proveniente da Quinta dos Plátanos em Abrantes. Um varano do Nilo (*Varanus niloticus*) e uma iguana verde tiveram origem no Jardim Zoológico de Lisboa.

Os restantes 38 animais pertenciam à mesma loja de animais onde foram colhidas as amostras coprológicas.

Este grupo de 41 répteis continha 19 sáurios, 19 ofídios e três quelónios.

A classificação taxonómica e o número de indivíduos utilizados neste estudo estão esquematizados no Anexo 1.

3.2 Colheita e conservação das amostras

Foi atribuído a todos os animais um código de identificação (CI) utilizado para catalogar as amostras colhidas e respectivos relatórios.

3.2.1 Rastreio parasitológico

Os terrários e caixas onde se encontravam alojados os animais foram inspecionados frequentemente. Sempre que foi detetado material fecal fresco foi colhido para um frasco de plástico.

Analisou-se parte de cada amostra *in loco* imediatamente após a sua colheita (ponto x) e a restante foi refrigerada num frigorífico doméstico (entre 4 e 7 °C) e analisada no laboratório do Serviço de Parasitologia da FMV-ULisboa no próprio dia ou no dia seguinte.

Sempre que se detetou, macroscopicamente, a presença de algum parasita este foi preservado em etanol a 70% para posterior observação e identificação.

3.2.2 Amostras colhidas *post mortem*

3.2.2.1 Acondicionamento dos cadáveres

Dos 38 répteis que morreram na loja de animais, 26 foram congelados pelo proprietário no congelador de um frigorífico doméstico e 12 foram refrigerados a 4-7 °C.

Os animais que se encontravam conservados por congelação na loja foram transferidos para a arca congeladora da sala de necrópsias do Serviço de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa. Aos répteis mantidos por refrigeração foi efetuada a necrópsia no dia da morte ou no dia seguinte.

Os 3 animais que não provieram da loja foram congelados e deram entrada nos Serviços de rotina de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa.

3.2.2.2 Técnica de necrópsia

A técnica de necrópsia adotada foi baseada na descrita por Terrel e Stacey (2007) e Garner (2006). Tendo em conta existem particularidades da técnica de necrópsia específicas para quelónios, sáurios e ofídios a sua descrição seria extensa. Desta forma optou-se por não descrever as técnicas de necrópsia efetuadas.

3.2.2.3 Tecidos biológicos para análise histopatológica

A grande maioria dos cadáveres aos quais foi efetuada a necrópsia eram de pequenas dimensões, como tal, alguns órgãos foram colhidos inteiros. Colheram-se sistematicamente fragmentos ou a totalidade do rim, fígado, pulmão e secções do trato gastrointestinal. Tentou-se sempre que o material colhido não tivesse uma espessura superior a 5mm.

O material colhido foi preservado e fixado numa solução de formol a 10%.

Os frascos de plástico contendo estas amostras, além do código CI específico foram identificados com o número interno do Serviço de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa no exterior do frasco com marcador e no interior através de uma etiqueta com o número escrito a lápis de grafite.

As amostras foram deixadas a fixar pelo menos durante 48 horas.

3.2.2.4 Amostras coprológicas e gastrointestinais

Sempre que possível colheram-se fezes da cloaca e/ou intestino para um frasco de plástico para posterior análise. Os testes coprológicos de material colhido durante a necrópsia foram executados no próprio dia ou no seguinte, sendo a amostra refrigerada.

Não existindo conteúdo fecal suficiente para executar técnicas coprológicas de flutuação foi efetuado, sempre que possível, um esfregaço a fresco misturando uma pequena quantidade de fezes com uma gota de soro fisiológico *in loco*.

A todos os animais com suspeita de infeção por *Cryptosporidium* fizeram-se esfregaços do conteúdo gástrico para posterior coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen.

3.2.2.5 Parasitas macroscópicos

À semelhança do que aconteceu para as amostras coprológicas frescas os parasitas macroscópicos encontrados durante a necropsia foram colocados numa solução de etanol a 70%. Por vezes, dada a grande quantidade de parasitas, era guardado todo o conteúdo do órgão, sendo a separação e limpeza dos parasitas efetuada posteriormente no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias.

3.3 Processamento das amostras

3.3.1 Técnicas coprológicas

3.3.1.1 Esfregaço direto

O esfregaço direto foi efetuado colocando uma pequena porção de fezes numa lâmina de vidro à qual foram adicionadas duas a três gotas de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) ou de soluto de Lugol. As duas partes foram misturadas com a ajuda de um palito de madeira e com o auxílio de uma lamela arrastaram-se os detritos maiores para a extremidade da lâmina. Colocou-se a lamela sobre o líquido, limpam-se os detritos com papel e observou-se a preparação ao microscópio (Greiner & Mader, 2006).

3.3.1.2 Flutuação simples

Colocou-se a amostra num copo de plástico e homogenizou-se com a solução de flutuação utilizando uma vareta de vidro. A mistura foi filtrada para um tubo de ensaio de 10 ml até ao topo e se formar um menisco convexo. Colocou-se uma lamela de vidro sobre o menisco e deixou-se a repousar durante 10-15 mins.

Após repousar, a lamela foi retirada na vertical e colocada numa lâmina de vidro para posterior observação ao microscópio (Taylor, Coop & Wall, 2015).

Como meio de flutuação usou-se uma solução saturada de açúcar (preparação da solução no Anexo 4) e uma solução de ZnSO₄ a uma concentração de 33% (preparação da solução no Anexo 4).

3.3.1.3 Coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen

Para proceder a esta coloração foi estendida sobre uma lâmina, com auxílio de uma vareta ou lâmina de vidro, uma pequena porção de fezes ou conteúdo gástrico de modo a obter uma camada fina e uniforme sobre a lâmina. O esfregaço foi deixado a secar ao ar durante cerca de 2 horas.

Antes de proceder à coloração, o esfregaço foi fixado com metanol durante 1min.

Em seguida colocou-se o corante fucsina durante 10 min e lavou-se com água corrente.

Voltou a lavar-se a lâmina com solução de álcool-ácido clorídrico a 3% seguida de nova lavagem com água corrente.

Por fim corou-se com verde malaquite a 0,4 %.

Voltou a lavar-se abundantemente em água corrente e deixou-se secar antes de a preparação ser observada ao microscópio com a objectiva de imersão de $\times 100$ (Taylor et al., 2015).

3.3.2 Técnicas de histopatologia

3.3.2.1 Preparação e processamento dos fragmentos

Após a fixação os fragmentos ou órgãos foram colocados em cassetes de plástico para processamento.

Posteriormente, foram processados pela equipa técnica do Serviço de Anatomia Patológica com o auxílio do processador automático de tecidos Leica TP 1020 (protocolo no Anexo 5). Após a inclusão em parafina foram efetuados os cortes dos blocos num micrótomo rotativo Leica RM 2135. Os cortes, com 3 μm de espessura, foram posteriormente desparafinados, hidratados e corados com hematoxilina e eosina (H&E), cujo protocolo está disponível no Anexo 5. Adicionalmente foram realizadas colorações específicas, como a coloração de ácido periódico de Schiff (protocolo no Anexo 5) para coloração de amebas e Ziehl-Neelsen (protocolo no Anexo 5) para *Cryptosporidium* spp.

Por último, foram observados ao microscópio ótico composto e os resultados registados em relatório interno de análise histopatológica (QVet) e na ficha individual de cada animal.

3.4 Preparação de parasitas macroscópicos para identificação

Quando colhidos juntamente com o conteúdo intestinal, os parasitas foram colocados numa placa de Petri e, utilizando uma lupa estereoscópica, foi efetuada a separação entre os parasitas e os detritos com o auxílio de uma pinça. Após várias lavagens com etanol a 70% os parasitas foram preservados num frasco de plástico identificado com o código CI do animal. Depois de limpos os parasitas foram montados entre lâmina e lamela com esclarecedor Lactofenol de D'Amann (Taylor et al., 2015).

3.5 Registo fotográfico e processamento das imagens

As formas parasitárias encontradas em esfregaços fecais realizados na loja de animais foram registadas com recurso a máquinas fotográficas Canon® 450D e 600D acopladas a um adaptador AmScope® próprio para o efeito inserido num microscópio óptico binocular Olympus® CH30.

As imagens de formas parasitárias encontradas durante as análises efetuadas nos laboratórios de Parasitologia e Anatomia Patológica foram obtidas através da câmara fotográfica e controlador Olympus® DP21 acoplados ao microscópio Olympus® BX51.

A edição das fotografias obtidas, a elaboração de fotocomposições de preparações histológicas e parasitas foram realizadas recorrendo ao programa Adobe® Photoshop® CC.

3.6 Medição de parasitas

A medição de todas as formas parasitárias foi feita utilizando o programa ImageJ, versão 1.48h3 de 2015 (disponível em "<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>").

3.7 Registo dos dados obtidos

Na ficha individual foi registada a temperatura ambiente, tipo de alimentação, higienização do terrário/caixa, número de animais em contacto direto e presença de sinais clínicos foram registados em todos os animais vivos aos quais foi colhida amostra fresca, ou animais que morreram na loja e se conhecia a sua história de manutenção.

Adicionalmente à ficha de identificação e condições de manejo, foram efetuados os relatórios dos exames coprológicos e histopatológicos.

Um exemplar tipo destas fichas está no Anexo 6.

Além destas fichas foi criada uma base de dados em Microsoft® Office Excel com toda a informação dos testes efetuados, resultados e condições de manejo de cada animal.

3.8 Análise estatística

3.8.1 Software

Todos os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando a interface RStudio versão 1.0.44 de 2016 (disponível em "<https://www.rstudio.com/>") do programa R versão 3.3.2 de 2016 (disponível em "<https://cran.r-project.org/>").

3.8.2 Cálculos estatísticos

Antes de proceder aos cálculos estatísticos foi necessário definir o conceito do que era considerado um animal positivo e a forma como foram atribuídos valores às variáveis.

3.8.2.1 Animal positivo

Foram considerados positivos os animais em que num dos testes coprológicos e/ou necrópsia e/ou exame histopatológico apresentassem pelo menos uma das seguintes estruturas:

- Um ovo, adulto ou larva de Nematoda;
- Um ovo, adulto ou larva de Platyhelminthes;
- Um oocisto de Apicomplexa;
- Um quisto/trofozoíto de Ciliophora;
- Vinte trofozoítos/ quistos de Metamonada num campo com ampliação de 100X (Oc. 10X*Obj. 10X);
- Um quisto/trofozoíto de Amoebozoa;

excluindo todas as formas parasitárias consideradas pseudoparasitas.

Optou-se por colocar um limite mais elevado no filo Metamonada pelo fato de a presença de um pequeno número de flagelados ser considerado normal no trato gastrointestinal de répteis.

Este valor foi definido para este trabalho de modo a evitar que se considerassem animais positivos cuja amostra tivesse apenas pequenas quantidades de flagelados. Tendo em conta que não existe um valor de referência, optou-se por definir um valor de “20”.

3.8.2.2 Atribuição da classificação das condições de manejo

De forma a determinar consistentemente se um animal era mantido em condições adequadas, foi criado um sistema de classificação das condições de manejo. Para isso foram selecionadas cinco condições de manejo com importância elevada.

Foi atribuído um valor de “1” se a condição definida para essa variável fosse considerada como adequada e um valor de “0” se fosse considerada não adequada. As variáveis consideradas foram:

- Temperatura - intervalo de temperatura e necessidade de ponto quente;
- Água - Humidade relativa e disponibilidade de água;
- Alimentação - disponibilidade de alimentação consoante dieta;
- Limpeza - limpeza regular do terrário ;
- Iluminação - espectro de UV;

A soma do valor atribuído a cada variável correspondia ao valor da variável “Condições”. Se este valor \geq “3” era atribuído o valor “1” e considerava-se que o animal era mantido em boas condições, se a soma fosse $<$ “3” era atribuído um valor de “0” e considerava-se que o animal era mantido em “más condições”.

As condições de manejo de cada espécie utilizadas para definir o score de algumas variáveis estão esquematizadas no Anexo 2.

3.8.2.3 Outras variáveis

Terrário: M = minimalista (um terrário/caixa foi considerado minimalista se o substrato fosse papel e/ou aparas de madeira e não estivessem presentes elementos decorativos; N = pseudonaturalista (um terrário/caixa foi considerado pseudonaturalista se o substrato fosse de terra, húmus ou areia e estivessem presentes 1 ou mais elementos decorativos;

Conjunto: “1” = mais do que um animal no mesmo terrário/caixa, “0” = animal mantido sozinho-

Parasitas: “1” = animal positivo; “0” = animal negativo;

Sinais clínicos: “1” = animal com sinais clínicos gastrointestinais (anorexia, caquécia, polifagia, picacismo, prolapso, regurgitação, diarreia, obstipação, letargia, perda de peso, vômito e regurgitação) ; “0” = sem sinais clínicos gastrointestinais.

3.8.2.4 Cálculo da prevalência

As prevalências absoluta, média e com intervalo de confiança de 95% foram calculadas usando o pacote “prevalence”, versão 0.4.0 (2015) criado por Brecht Devleeschauwer. Disponível em <https://cran.r-project.org/web/packages/prevalence/index.html> .

A função utilizada foi a “truePrev” usando um intervalo de confiança de 95% e uma sensibilidade e especificidade igual a 1, já que não são conhecidos os seus valores para os testes e espécies envolvidos neste estudo.

Para o cálculo da prevalência foram utilizados apenas os resultados dos testes coprológicos efetuados com amostras frescas às quais se tenham realizado, numa única amostra, os quatro testes coprológicos (esfregaços diretos com soro fisiológico e com soluto de Lugol e flutuações com solução de ZnSO₄ e solução saturada de açúcar).

De forma a uniformizar os resultados foi calculada a prevalência de parasitas por filo em hospedeiros por sub-ordem assim como os totais.

3.8.2.5 Associação estatística entre variáveis

Utilizando o teste exato de Fisher (função `fisher.test`) foi determinado se existia uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis “Temperatura”, “Água”, “Alimentação”, “Limpeza”, “Iluminação”, “Condições”, “Terrário”, “Conjunto” e a variável “Parasitas” de modo a tentar determinar se estas variáveis podem estar associadas à presença de parasitas.

Através do mesmo teste tentou determinar-se se existe uma associação estatisticamente significativa entre a presença de “Parasitas” e a manifestação de “Sinais clínicos”.

Considerou-se um intervalo de confiança de 95 %, sendo que o nível de significância estatística foi definido para $p < 0.05$.

Foram calculadas as associações estatísticas entre as variáveis referidas para quatro grupos distintos de animais:

GRUPO 1 - Todos os animais que entraram no rastreio parasitológico (n=82).

GRUPO 2 - Todos os animais dos quais se conhecia a história de manutenção e aos quais foi realizado pelo menos um exame coprológico *ante* ou *post mortem* (n=95).

GRUPO 3 - Todos os lagartos que entraram no rastreio parasitológico (n=33).

GRUPO 4 - Todos os lagartos dos quais se conhecia a história de manutenção e aos quais foi realizado pelo menos um exame coprológico *ante* ou *post mortem* (n=38).

Não se realizou o cálculo das associações estatísticas para a sub-ordem Cryptodira pois só foram analisados 5 animais com história conhecida e não se fez o cálculo para a sub-ordem Serpentes porque existia pouca variabilidade nas suas condições de manejo e poucos animais positivos o que se refletia por algumas tabelas de contingência com mais do que uma célula de valor “0”.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rastreamento parasitológico

A prevalência média global de endoparasitas encontrados em amostras coprológicas dos 82 répteis incluídos neste trabalho foi de 40,5%, representando 33 animais positivos. As prevalências médias estimadas dos vários filos de parasitas nas diferentes sub-ordens de répteis estão representadas no gráfico 1.

Papini, Manetti & Mancianti (2011) referiram uma prevalência global de 57,4% num estudo que englobou 324 animais e Rataj et al. (2011) uma prevalência de 81,7% em 949 répteis.

No único estudo do género efetuado em Portugal por Bernardino (2014) a autora descreveu uma prevalência de 67,2% em 77 animais.

A diferença entre as prevalências registadas nos vários estudos pode dever-se a alguns fatores relacionados com a amostra, nomeadamente, a proporção de amostras colhidas de cada grupo de répteis (ofídios, quelónios e sáurios), o tipo de análise coprológica, o número de amostras colhido por cada indivíduo e a origem dos animais (quintas de criação de répteis em sistema semi-extensivo, criação em cativeiro ou recolhido da natureza).

A baixa prevalência parasitária encontrada neste trabalho pode ser explicada em parte pelo grande número de ofídios que constituem a amostra e que apresentaram a prevalência mais baixa de todos os grupos de répteis. Nos trabalhos de Rataj et al. (2011), Pasmans et al. (2008) e Bernardino (2014) as serpentes apresentaram prevalências mais baixas do que os outros dois grupos. Papini et al. (2011) descreveram uma prevalência superior em serpentes do que em quelónios, sendo a exceção.

O filo de parasitas com maior prevalência foi o Nematoda, estando presente em 22 dos 82 répteis correspondendo a uma prevalência de 27,4% que está de acordo com todos os estudos supracitados.

O filo Metamonada foi encontrado em 15 dos 82 animais sendo o grupo de parasitas com a segunda maior prevalência, 19,1%. Este grupo de parasitas foi também detetado com frequência nos trabalhos de Pasmans et al. (2008) e Papini et al. (2011). Sendo referido com menos frequência nos trabalhos de Rataj et al. (2011) e Bernardino (2014).

O filo Amoebozoa apresentou uma prevalência de 15,5% aparecendo em 12 dos 82 animais testados. Apesar de não existir referência a estes parasitas nos trabalhos de Rataj et al. (2011) e Papini et al. (2011), é reportado com alguma frequência no trabalho de Pasmans et al. (2008).

Os protozoários ciliados (filo Ciliophora) foram detetados em 11 das 82 amostras representando uma prevalência global de 14,3 % sendo o 4º filo mais prevalente. Nos trabalhos de Pasmans et al. (2008), Rataj et al. (2011) e Bernardino (2014) este filo também aparece descrito frequentemente, não havendo referência a nenhum animal positivo no estudo de Papini et al. (2011).

O filo Apicomplexa foi encontrado em 8 dos 82 répteis representando uma prevalência de 10,7%. Este resultado está em consonância com os estudos supracitados exceptuando o trabalho de Bernardino (2014) onde não foram detetadas formas parasitárias de coccídeas.

O filo Platyhelminthes foi o menos prevalente neste trabalho. Apenas 1 dos 82 animais, correspondendo a uma prevalência de 2,4%, foram positivos.

Este é o filo que apresenta mais discrepância entre o presente trabalho e o realizado por Rataj et al. (2011) e Pasmans et al. (2008). Nos trabalhos de Papini et al. (2011) e Bernardino (2014) não há referência de animais positivos com parasitas deste filo.

Como se pode verificar na tabela 1, dos 33 animais positivos em 16 detectou-se 1 filo de parasitas, em 5 detectaram-se 2 filios, 4 tinham 3 filios e em 8 foram identificados 4 filios.

Gráfico 1 - Prevalência média estimada (%) dos filios de parasitas encontrados nas diferentes Sub-Ordens de répteis.

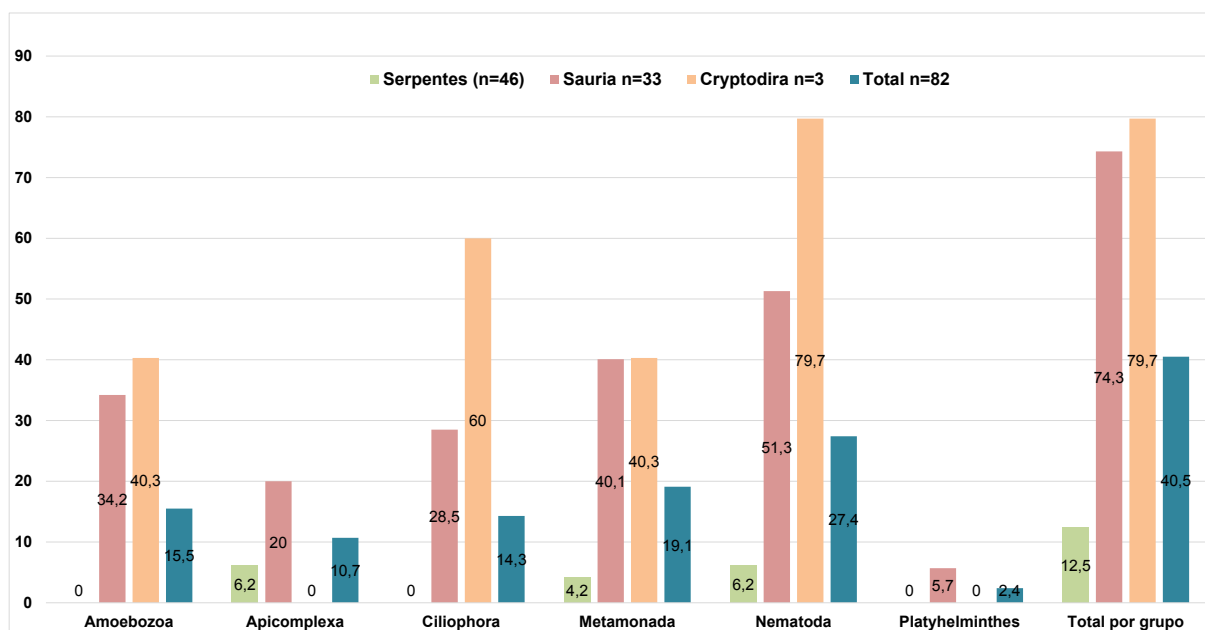


Tabela 1 - Filios encontrados durante os exames coprológicos e respectivas associações (n= nº de animais positivos).

1 filo (n=16)	2 filios (n=6)	3 filios (n=3)	4 filios (n=8)
Nematoda (n=9)	Apicomplexa +	Amoebozoa +	Amoebozoa + Ciliophora
Apicomplexa (n=4)	Metamonada (n=2)	Metamonada + Nematoda	+ Metamonada +
Amoebozoa (n=1)	Amoebozoa +	(n=2)	Nematoda (n=8)
Metamonada (n=1)	Metamonada (n=1)	Apicomplexa + Ciliophora	
Platyhelminthes (n=1)	Apicomplexa + Ciliophora	+ Nematoda (n=1)	
	(n=1)		
	Ciliophora + Nematoda		
	(n=1)		
	Metamonada + Nematoda		
	(n=1)		

4.1.1 Sub-ordem Serpentes

A prevalência parasitária em serpentes foi de 12,5% correspondendo a 5 animais positivos dos 46 que foram testados. Todos os animais parasitados apresentaram apenas um filo de parasitas.

Este valor é substancialmente inferior ao encontrado por Rataj et al. (2011), que descreveu uma prevalência média de 47,3% (26 animais positivos de 55 testados). Esta diferença de valores pode justificar-se em parte pela origem dos animais e pelo tipo de amostragem efetuada. No presente estudo a maioria dos animais testados provieram de criadores especializados e alguns de criação do proprietário da loja enquanto que as cobras utilizadas por Rataj et al. (2011) eram provenientes de quintas de criação ou autóctones. No que se refere à amostragem, no seu trabalho, Rataj et al. (2011) efetuaram necrópsias a todos os animais, recolheram conteúdo intestinal e coprológico diretamente do cadáver e realizaram testes adicionais específicos a animais que apresentavam sinais clínicos suspeitos de parasitismo. Este tipo de metodologia permite a detecção de alguns parasitas que podem passar despercebidos às flutuações e esfregaços podendo justificar parte da diferença nos valores de prevalência.

O facto de a maioria das cobras utilizadas neste trabalho estar alojada individualmente em caixas com decoração minimalista e serem limpas regularmente pode contribuir para a diminuição da incidência de parasitas, já que más condições de manejo são um fator de maior importância que predispõe ao aparecimento de parasitas.

Papini et al. (2011) referiram uma prevalência de 56,8% (41 serpentes positivas de 74 testadas). Apesar de estes autores incluírem animais apanhados diretamente da natureza não discriminam se os animais criados em cativeiro eram provenientes de criadores especializados, particulares ou quintas de criação. A principal diferença entre o trabalho realizado por Papini et al. (2011) e o presente estudo é o tipo de amostragem. Papini et al. (2011) recolheram duas amostras consecutivas de cada animal o que aumentou a probabilidade de detecção de parasitas.

Apesar de a prevalência descrita por Pasmans et al. (2008) ser superior à encontrada no presente estudo a origem dos animais e o tipo de testes efetuados não são descritos pelo que não é possível saber se a diferença de prevalência é devida à origem dos animais ou derivada do tipo de testes efetuados.

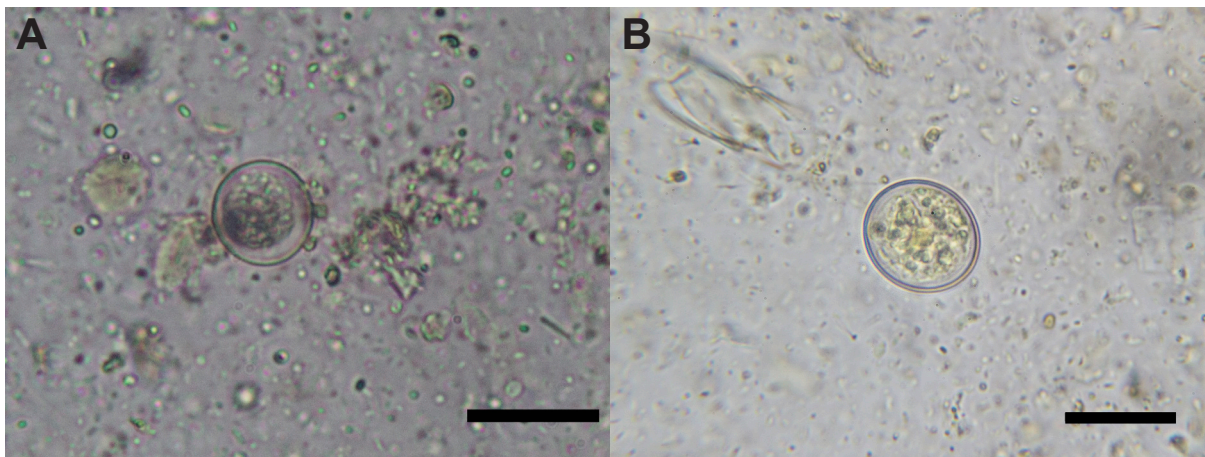
Em termos de prevalência parasitária média o trabalho realizado por Okulewicz, Kazmierczak & Zdrzalik (2014) é o que apresenta um valor mais aproximado ao presente estudo. A prevalência encontrada por estes autores foi de 13,7% (7 serpentes positivas de 51 testadas). No trabalho de Bernardino (2014) não foram detetadas quaisquer formas parasitárias nas 8 serpentes testadas.

Apesar de na loja de animais não existir um protocolo sistemático de desparasitação, antes do período de emparelhamento para reprodução, era feita terapêutica anti-helmintica com Febendazol (Panacur®) à maioria das serpentes. A administração deste composto pode ser uma das razões para a baixa prevalência global de parasitas, tendo em conta que o filo mais prevalente em cobras é o Nematoda (Rataj et al., 2011; Papini et al., 2011; Okulewicz et al., 2014; Pasmans et al., 2008).

4.1.1.1 Filo Apicomplexa - família Eimeriidae

A prevalência desta família de protozoários em serpentes foi de 6,2% tendo sido detetados oocistos em 2 dos 46 ofídios. Nos dois ofídios, uma pitão real e uma pitão de Ramsay (*Aspidites ramsayi*), os oocistos (figura 1) não estavam esporulados não sendo possível identificar o género.

Figura 1 - Oocistos de coccídias de género desconhecido em análise coprológica de cobras. **A**- Oocistos em amostra coprológica de uma pitão real (*Python regius*). **B**- Oocisto encontrado em amostra coprológica de pitão de Ramsay (*Aspidites ramsayi*). **Escala** - 20 µm. Imagens originais.



Descrição dos oocistos:

Oocisto encontrado em amostra de pitão real - oocisto sub-esférico, com parede lisa e aparentemente singular, não estavam visíveis estruturas como grânulo polar ou micrópilo. Média 16,232 µm de eixo maior e 15,705 µm de eixo menor.

Oocisto encontrado em amostra de pitão de Ramsay - oocisto sub-esférico, com parede lisa e dupla, não estavam visíveis estruturas como grânulo polar ou micrópilo. Média 21,916 µm de eixo maior e 19,810 µm de eixo menor.

A prevalência encontrada no presente estudo é a mais elevada quando comparada com os 2,2% (6 animais positivos de 311 testados) reportados por Pasmans et al. (2008), os 1,9% (1 animal positivo de 55 testados) descritos por Rataj et al. (2011) e os 3,8% (1 animal positivo de 51 testados) encontrados por Okulewicz et al. (2015). Nos estudos feitos por Papini et al. (2011) e Bernardino (2014) não foram encontradas quaisquer formas parasitárias desta família em ofídios.

Apesar da baixa prevalência reportada nestes estudos estão descritas cerca de 200 espécies de coccídeas da família Eimeriidae parasitas de serpentes distribuídas pelos géneros *Caryospora*, *Cyclospora*, *Eimeria* e *Isospora* (Duszynski, Upton & Couch, 2008).

São parasitas com um ciclo de vida direto que raramente causam doença em animais de vida livre mas que associados ao stress de cativeiro, más condições de higiene e outras doenças concomitantes, podem atingir cargas parasitárias elevadas e, conseqüentemente, provocar sinais clínicos.

A forma de transmissão destes protozoários é através de contaminação fecal da água, comida e outros objetos e substratos presentes no terrário entrando no hospedeiro por via oral (Klingenberg, 2007b).

A maioria dos casos de animais que apresentaram sinais clínicos descritos na literatura são referentes a coccídeas parasitas de lagartos. Em ofídios os casos de doença provocada por coccídeas da família Eimeriidae são escassos. Foram descritos alguns casos de colecistite e enterite associados à presença de *Eimeria* sp. (Jacobson, 2007).

Nenhum dos 2 animais encontrados positivos neste trabalho apresentava sinais clínicos.

Sendo parasitas com um ciclo de vida direto, a limpeza regular das instalações onde se encontram os animais assim como a quarentena de animais recém chegados é de extrema importância no controlo de coccídeas (Klingenberg, 2007).

4.1.1.2 Filo Metamonada

Foram encontrados protozoários flagelados em apenas uma cobra (*Lampropeltis getula nigrilus*) correspondendo a uma prevalência média de 4,2%.

Esta prevalência está de acordo com a reportada por Rataj et al. (2011) que no seu trabalho encontrou flagelados em 1,8% (1 serpente positiva das 55 testadas) dos animais.

No entanto, este valor é significativamente inferior aos 12,1% (37 serpentes positivas das 311 testadas) referidos por Pasmans et al. (2008) e também inferior aos 36,9% (27 serpentes positivas das 74 testadas) registados no trabalho de Papini et al. (2011).

A principal diferença entre o presente trabalho para os reportados por Pasmans et al. (2008) e Papini et al. (2011) pode estar relacionada com o facto de estes autores considerarem positivos todos os animais que apresentassem pelo menos uma forma parasitária e enquanto que neste estudo foram considerados positivos apenas os animais cujas amostras tivessem pelo menos 10 trofozoítos/quistos deste filo durante a realização dos esfregaços a fresco.

Os protozoários flagelados são considerados maioritariamente comensais do trato gastrointestinal dos répteis. Têm um ciclo de vida direto e infectam o hospedeiro por via oral através da contaminação fecal da comida, água e ambiente. Não apresentam reprodução sexuada multiplicando-se por fissão binária. Alguns grupos de flagelados têm a capacidade de produzir quistos que também são infetantes. Quando estes parasitas causam doença geralmente estão associadas condições incorretas de manejo. O stress, humidade relativa elevada, temperaturas baixas, infecções concomitantes e falhas na limpeza das instalações podem predispor à multiplicação excessiva destes parasitas e à susceptibilidade do hospedeiro de combater a infeção, surgindo sinais clínicos. Em serpentes, o género *Monocercomonas* foi associado a colecistite numa Pitão-Diamante (*Morelia spilota spilota*) e está descrita a presença de diarreia catarral e hemorrágica, gastrite, anorexia e pneumonia (Frank, 1984; Greiner & Mader, 2006; Scullion & Scullion, 2009; Jacobson, 2007, Klingenberg, 2007b).

Também os géneros *Spironucleus*, *Hypotrichomonas*, *Monocercomonas*, *Tetratrichomonas* e *Tritrichomonas* foram associados à presença de enterite em cobras (Barnard & Upton, 1994).

O diagnóstico destes parasitas pode ser feito através de esfregaços diretos com soro fisiológico em que é possível observar o padrão de movimentação que pode ser útil na identificação (Greiner & Mader, 2006).

Os estudos morfológicos com o objectivo de classificar até à espécie os protozoários flagelados devem incluir colorações como a de Giemsa e impregnações com sais de prata (Scullion & Scullion, 2009).

O tratamento de animais infectados com protozoários flagelados deve ser considerado apenas em casos de animais que apresentem sinais clínicos associados a um número elevado de parasitas. A terapêutica antiparasitária pode ser realizada com metronidazol 20-50 mg/kg PO em dose única, com novas administrações a cada 48h se necessário (Klingenberg, 2007b) ou 50-100mg/kg PO durante 7-10 dias (Mitchell, 2007). Alternativamente pode ser utilizado Ronidazole 10mg/kg PO a cada 8-10 dias (Greiner & Mader, 2006).

4.1.1.3 Filo Nematoda

Foram detetados ovos de nematodes em 2 cobras do milho representando uma prevalência média estimada de 6,2%. Ambas as cobras apresentavam diarreia catarral como único sinal clínico.

Foram encontrados ovos de 3 tipos diferentes, (figura 2). Um ovo (figura 2.A) media 87,322 µm de eixo maior e 36,117 µm de eixo menor. Apresentava uma parede com 2,271 µm de espessura e aparentemente uma larva em desenvolvimento no seu interior. Os ovos dos géneros *Rhabdias* e *Strongyloides* apresentam algumas características similares a este ovo (forma elipsoide e larva no interior), no entanto são de menores dimensões (60x35µm (Jacobson, 2007) e com parede mais fina. Não foram encontrados na literatura ovos semelhantes que permitissem classificar o ovo detetado no presente trabalho até à família/género.

Os géneros *Rhabdias/Strongyloides* são dos nematodes mais frequentes em serpentes. Rataj et al. (2011) referiram uma prevalência de 5,6 % (3 animais positivos de 55 testados) e Pasmans et al. (2008) uma prevalência de 5,8% (17 animais positivos de 311 testados). Desta forma, se este ovo pertencesse a um destes géneros seria um achado esperado e considerado normal.

Outro ovo (figura 2.B) media 88,054 µm de eixo maior e 38,302 µm de eixo menor e apresentava características da ordem Oxyurida. Os parasitas desta ordem são incomuns em serpentes, Rataj et al. (2011) referiram uma prevalência de 1,9% (1 animal positivo de 55 testados) e Pasmans et al. (2008) referiram também uma prevalência de 1,9% mas com 5 animais positivos em 311 testados sendo em ambos os estudos os nematodes com menor prevalência. O único estudo encontrado em que foi disponibilizada uma imagem de um ovo desta ordem foi o de Oxulewicz et al. (2014) em que referiram uma prevalência de 3,8% (1 animal positivo de 55 testados). Esse ovo diferia do encontrado no presente estudo por apresentar uma das faces achatadas ao invés de oval.

Estes dois tipos de ovos foram encontrados no mesmo animal.

O último tipo de ovo encontrado (figura 2.C) media 106.391 µm de eixo maior por 70.776 µm de eixo menor.

O comprimento do eixo maior, a parede fina e o facto de se apresentar embrionado são características compatíveis com a ordem Strongylida, sendo o género *Kalicephalus* o mais comum em serpentes. Na generalidade os ovos de *Kalicephalus* medem de 70-100µm de eixo maior e 40-50µm de eixo menor (Jacobson, 2007).

O ovo encontrado no presente estudo era menos alongado e não apresentava a mórula típica deste género preferindo-se, por precaução, não classificá-lo quanto ao género.

Rataj et al. (2011) referiram uma prevalência de 20,4% (11 animais positivos de 55 testados) da ordem Strongylida (principalmente *Kalicephalus* sp.) sendo o parasita mais prevalente. Papini et al. (2011) referiram uma prevalência de 19,7% (14 animais positivos de 74 testados) da ordem Strongylida enquanto Pasmans et al. (2008) referem uma prevalência de 5,8% (17 animais positivos de 311 testados) do género *Kalicephalus*.

Estes resultados sugerem que o ovo encontrado no presente estudo, dadas as suas características morfológicas, poderia pertencer a esta ordem, possivelmente ao género *Kalicephalus*.

Figura 2 - Ovos de género desconhecido em amostras de *Pantherophis guttatus*.

Escalas - 50 µm. Imagens originais.



Os parasitas da superfamília Rhabditoidea, à qual pertencem o géneros *Rhabdias* (família Rhabdiasidae) e *Strongyloides* (família Strongyloididae) apresentam no seu ciclo de vida uma fase homogónica com a presença de fêmeas partenogénicas e uma fase de vida livre, heterogónica. Ambos os géneros têm um ciclo de vida directo e as larvas infetantes podem entrar no hospedeiro por via transcutânea e fazer migrações até ao local/orgão onde se desenvolvem até parasitas adultos. Os adultos de *Rhabdias* sp. encontram-se nos pulmões onde em algumas ocasiões podem originar produção excessiva de muco, pneumonia e insuficiência respiratória. Condições de má higienização aliadas a uma temperatura e humidade elevadas, que propiciam o desenvolvimento anormal das formas de vida livre e larvas infectantes que podem ser fatais (Greiner & Mader, 2006; Jacobson, 2007). Os adultos de *Strongyloides* encontram-se no intestino delgado. Os sinais clínicos associados com a presença de *Strongyloides* incluem anorexia, diarreia e a infeção pode ser fatal.

Os relatos de sinais clínicos provocados pela ordem Oxyurida em serpentes são escassos, incompletos e não possuem referências bibliográficas que permitam confirmar com certeza o efeito patogénico destes parasitas em cobras (Jacobson, 2007)

O género *Kalicephalus* (família Diaphanocephalidae) também tem um ciclo de vida direto. As fêmeas depositam ovos em estado avançado de mórula e, no exterior, eclodem larvas L1 que se desenvolvem até L3 que são a forma infectante. A via de infeção é oral, sendo que existe a possibilidade de infeção transcutânea que não está devidamente comprovada. Os adultos encontram-se sobretudo no intestino delgado onde se fixam à mucosa e se alimentam de sangue (Anderson, 2000). Os sinais clínicos atribuídos à presença de um número anormal de parasitas deste género incluem letargia, debilidade e diarreia.

Histologicamente pode verificar-se gastritoenterite ulcerativa e hemorragia.

Pode existir complicação por infecção de bactérias Gram- nas úlceras provocadas pela acção erosiva destes parasitas (Jacobson, 2007)

O diagnóstico em vida dos nematodes referidos acima pode ser feito através de exames coprológicos de flutuação onde se encontram os ovos tipo já descritos.

O tratamento é recomendado nos casos de infecções pelos géneros *Rhabdias*, *Strongyloides* e *Kalicephalus* e a terapêutica antiparasitária deve ser feita com Febendazol 25-100 mg/Kg PO SID em duas tomas separadas por 10-14 dias (Mitchell, 2007) ou alternativamente 25-50mg/Kg PO SID durante 3 dias consecutivos e se necessário nova dose em 10 dias após o primeiro tratamento (Klingenberg, 2007b).

4.1.2 Sub-ordem Sauria

A prevalência parasitária média total em lagartos foi de 74,3% correspondendo a 25 animais positivos dos 33 testados.

Este resultado é aproximado ao reportado por Rataj et al. (2011) cuja prevalência estimada foi de 76,1% (252 animais positivos de 331 testados). Em comparação com as prevalências descritas por Papini et al. (2011) e Okulewicz, Kazmierczak, Hildebrand & Adamczyk (2015) a prevalência média estimada no presente trabalho é superior aos 62,5% (120 animais positivos de 192 testados) referidos no primeiro estudo e aos 42,35% (71 positivos de 168 estudados) no segundo.

A alta prevalência parasitária pode ser justificada por alguns destes animais serem alojados em conjunto e a maioria dos parasitas encontrados apresentarem um ciclo de vida direto.

4.1.2.1 Filo Amoebozoa - *Entamoeba* sp. Casagrandi & Barbagallo, 1895

Foram detetados quistos do género *Entamoeba* sp. (figura 3) em 11 dos 33 lagartos testados (34,2% de prevalência média estimada). Dos animais positivos seis eram iguanas verdes, três dragões barbudos e dois geckos leopardo.

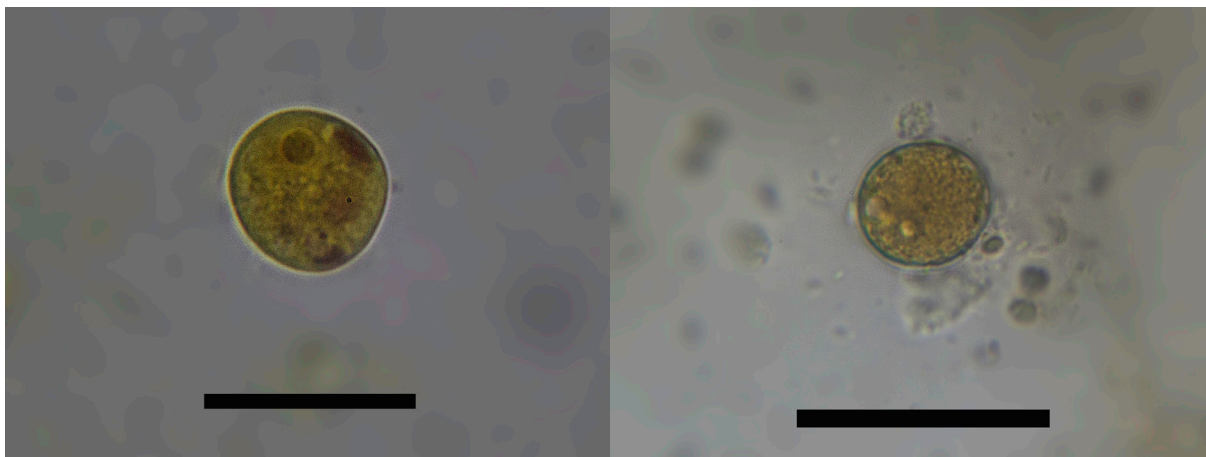
Nos trabalhos de Bernardino (2014), Papini et al. (2011), Rataj et al. (2011) e Okulewicz et al. (2015) não foram encontrados casos de sáurios positivos à presença de amebas. A não detecção de formas parasitárias deste filo pode dever-se ao facto de apenas terem sido efetuados esfregaços diretos sem adição de nenhum corante o que pode dificultar a detecção de trofozoítos e quistos. No trabalho de Pasmans et al. (2008) a prevalência de amebas foi de 6,4% correspondendo a 38 animais positivos dos 605 estudados. Dos 38 animais positivos apenas quatro foram definidos como estando parasitados com amebas do género *Entamoeba*. Os restantes 34 eram maioritariamente positivos a *Naegleria* sp. que apresenta quistos de dimensões significativamente inferiores aos de *Entamoeba* sp.. Esta diferença de prevalência pode ser justificada pelo tamanho da amostra já que um animal positivo no presente estudo tem maior influência no valor de prevalência estimada. Outro fator adjuvante ao valor elevado de prevalência de amebas encontrado neste estudo é o facto de as seis iguanas verdes estarem alojadas em conjunto assim como dois dos dragões barbudos e este ser um parasita de ciclo de vida direto sendo expectável que todos os animais desse grupo se encontrem parasitados.

Descrição dos quistos:

Quisto encontrado em amostra de iguana verde - Quisto sub-esférico, com forma algo irregular, parede fina e lisa. Apenas com um núcleo presente medindo cerca de 3,2 µm de diâmetro. Media 15,781 µm de eixo maior e 14,934 µm de eixo menor.

Quisto encontrado em amostra de dragão barbudo - Quisto sub-esférico, com parede fina e lisa. Nenhum núcleo estava visível. Media 11,314 µm de eixo maior e 9,857 µm de eixo menor.

Figura 3 - Quistos de *Entamoeba* sp. encontrados em amostras fecais de lagartos. **A** - Quisto de *Entamoeba* sp. em fezes de *Iguana iguana*; **B** - Quisto de *Entamoeba* sp. em fezes de *Pogona vitticeps*. **Escala** - 20 µm. Imagens originais.



Existem poucos dados em relação às espécies de *Entamoeba* parasitas de répteis. Em lagartos são aceites atualmente 4 espécies, *E. cuautlae* (Poss. syn. *E. invadens*), *E. invadens*, *E. lacerticoli* e *E. varani* (Ponce-Gordo & Martínez-Díaz, 2010). De todas as espécies descritas em répteis a que tem recebido mais atenção pela sua patogenicidade é *E. invadens*. Descoberta por Rodhain (1934) o seu ciclo de vida foi descrito em serpentes por Geimen & Ratcliffe em 1936 (Jacobson, 2007). O ciclo de vida deste protozoário é direto. Os animais são infectados através da ingestão de quistos quadrinucleados. Cada quisto dá origem a uma ameba quadrinucleada metacística que por sua vez origina 8 amebas, a saída das amebas do interior do quisto acontece no jejuno e íleo (Geimen & Ratcliffe, 1936). Os sinais clínicos são inespecíficos, os animais podem apresentar-se letárgicos, anoréticos e com diarreia mucohemorrágica. As lesões descritas incluem úlceras no estômago, cólon e fígado (onde as amebas chegam por via hematogena), colite e enterite. No exame histopatológico podem ser encontrados trofozoítos do protozoário nas lesões ulcerativas, forte reação inflamatória com infiltração leucocitária nas zonas mais afetadas (Ratcliffe & Geiman, 1934; Geimen & Ratcliffe, 1936; Jacobson, 2007).

Mais recentemente foi descrito um caso de amebíase muscular causada por *E. invadens* num Varano-Malaio (*Varanus salvator*) que foi encontrado morto com lesões cutâneas ulcerativas. Fora encontrados vários focos caseosos no músculo esquelético e fígado. A mucosa do intestino delgado encontrava-se espessada, vermelha e continha várias úlceras. Microscopicamente foram observadas lesões de necrose, miosite granulomatosa, hepatite e enterite com formas parasitárias intralesionais (Chia et al., 2009).

O diagnóstico de amebíase em vida pode ser efetuado através de esfregaços coprológicos a fresco com observação dos trofozoítos e em esfregaços a fresco corados com Solutio de Lugol ou tricrómio onde se observam melhor os quistos e as suas estruturas. As características morfológicas dos quistos (tamanho, nº de núcleos, etc) são importantes na tentativa de determinar a espécie de ameba. Atualmente favorece-se o diagnóstico conjugado entre a caracterização morfológica dos quistos e técnicas moleculares de sequenciação de rRNA através de PCR que permite uma melhor caracterização filogenética das espécies (Ponce-Gordo & Martínez-Díaz, 2010).

Nem todas as espécies de *Entamoeba* foram consideradas patogénicas, pelo que o tratamento só é aconselhado em casos de detecção de formas parasitárias de *Entamoeba* sp. associadas à presença de sinais clínicos.

A amebíase é uma doença de progressão rápida e de difícil tratamento. O Metronidazol é a substância de primeira escolha a uma dose de 20-50 mg/Kg PO SID durante 3 dias e depois cada 48 horas durante 5-10 doses totais (Klingenberg, 2007b) ou alternativamente 100mg/Kg PO em dose única repetida após 15 dias; 40-60mg/Kg PO cada 7 dias durante 2-3 tomas (Scullion & Scullion, 2009), a administração de gentamicina 2,2-4,4 mg/kg a cada 72 horas até 5 doses pode ser benéfica já que pode ocorrer infeção nas zonas de úlceras por bactérias Gram- (Mitchell, 2007).

Também deve ser equacionada terapia de suporte com alimentação assistida, fluídoterapia (subcutânea ou intracelómica) e suplementação vitamínica (Scullion & Scullion, 2009).

A temperatura ambiente desempenha um papel muito importante nesta doença, em serpentes, os animais experimentalmente inoculados desenvolviam sistematicamente sinais clínicos seguidos de morte quando mantidos a uma temperatura de 25°C e a maioria mantida a menos de 13 °C e a mais de 33°C não desenvolvia sinais clínicos (Barrow & Stockton, 1960). Apesar de esta dinâmica não estar descrita em lagartos o ajuste da temperatura deve ser equacionado em animais com amebíase ativa (Scullion & Scullion, 2009).

4.1.2.2 Filo Apicomplexa

A prevalência média estimada do filo Apicomplexa foi de 20,0% correspondendo a seis animais positivos dos 33 testados. Um dragão barbudo, um gecko diurno de Madagáscar (*Phelsuma madagascariensis*), um Lagarto de cauda espinhosa (*Cordylus tropidosternum*) e um lagarto de gola (*Chlamydosaurus kingii*) foram positivos para oocistos de um género de coccídea enquanto dois dragões barbudos apresentavam uma infeção mista de dois géneros.

Este valor de prevalência é significativamente superior aos 2,6 % (oito animais positivos de 331 testados) reportados por Rataj et al. (2011) e aos 2,9 % (quatro animais positivos de 168 testados) no trabalho de Okulewicz et al. (2015). Por outro lado no trabalho de Papini et al. (2011) foram encontrados 63 animais positivos em 192 testados. Nesse trabalho a prevalência média estimada de coccídeas foi de 33% sendo superior à reportada neste estudo.

4.1.2.2.1 *Isospora amphiboluri* Cannon, 1967

Foram encontrados oocistos de *Isospora amphiboluri* em dois dragões barbudos e um lagarto de gola (figura 4).

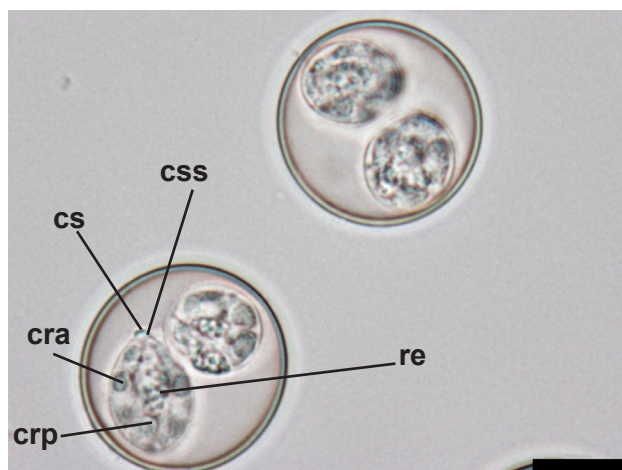
Até à data esta espécie de coccídea é a única do gênero *Isospora* reportada para estes dois hospedeiros e, além destes, foi também reportada em dragão barbudo oriental (*Pogona barbata*) por Cannon (1967) quando descreveu a espécie.

McAllister, Upton, Jacobson & Kopit (1995) referiram uma prevalência de 32% (16 animais positivos dos 50 testados) em Dragões barbudos de cativeiro. Noutro estudo a prevalência de oocistos de *I. amphiboluri* em duas populações distintas de dragões barbudos mantidos em cativeiro foi de 23,2% (26 animais positivos em 112 testados) e 71,8% (46 animais positivos de 64 testados) respetivamente (Walden, 2009).

Tendo em conta as prevalências descritas nos trabalhos citados a presença deste parasita era esperada.

Além do fator hospedeiro, os oocistos encontrados durante o presente trabalho apresentaram características coincidentes com as descritas por Cannon (1967), McAllister et al. (1995) e Walden (2009). Os oocistos eram esféricos a sub-esféricos, com dupla parede lisa e não apresentavam micrópilo, resíduo, nem grânulo polar. Os esporocistos eram ovais com uma única parede lisa e apresentavam corpo de stieda e substieda. Os esporozoítos eram alongados e apresentavam corpos refráteis anterior e posterior (Cannon, 1967; McAllister et al., 1995; Walden, 2009). Dada a grande quantidade de oocistos encontrados no lagarto de gola as medições dos oocistos e suas estruturas foram efetuadas apenas para este hospedeiro. Além de terem sido encontrados em menor quantidade alguns dos oocistos presentes nas amostras de dragões barbudos apresentavam deterioração não permitindo a medição sistemática de todas as estruturas. No entanto as características morfológicas (tamanho e rácio comprimento/largura dos oocistos, tipo de parede, presença de corpo de stieda e substieda) são compatíveis com *I. amphiboluri*.

Figura 4 - Oocistos de *Isospora amphiboluri* em exame coprológico de *Chlamydosaurus kingii*; **Legenda:** **cs** - corpo de stieda; **css** - corpo de substieda; **re** - resíduo do esporocisto; **cra** - corpo refrátil anterior; **crp** - corpo refrátil posterior. **Escala** - 10 µm. Imagem original.



Oocistos encontrados em *Chlamydosaurus kingii* [média (min-máx)]:

Tamanho do ocisto (n=20) - 23,846 x 23,718 (21,903-25,239 x 22,196-24,964);

Rácio (c/l) (n=20) - 1,006 (0,969-1,051);

Tamanho do esporocisto (n=10) - 14,829 x 9,827 (13,742-15,992 x 9,329-10,139);

Rácio (c/l) (n=10) - 1,509 (1,434-1,616)

Tamanho do esporozoíto (n=10) - 14,068 x 2,882 (12,08-17,207 x 2,472-3,394)

O ciclo de vida é direto e compreende uma fase exógena (esporogonia) e uma endógena. O oocisto é a forma infectante e após ingestão por parte do hospedeiro os oocistos esporulam no lúmen intestinal. Após a esporulação os esporozoítos são libertados dos esporocistos e oocistos. Os esporozoítos entram em seguida nas células do epitélio intestinal. Cannon (1967) quando descreveu a espécie referiu que o jejuno era a zona mais afetada. Nesta altura os esporozoítos desenvolvem-se em trofozoítos e através de reprodução assexuada iniciam a merogonia. O resultado da merogonia é um conjunto de merozoítos dentro de um esquizonte maduro. Após a ruptura do esquizonte e libertação dos merozoítos (com morte da célula hospedeira) estes vão entrar de novo nas células do epitélio intestinal. As primeiras gerações de merozoítos vão dar origem a sucessivas merogonias. Quando ocorre a merogonia final e os últimos merozoítos entram nas células epiteliais vão formar gametócitos. Se o gametócito for feminino (macrogametócito) apenas se desenvolve um gâmeta. Se for masculino (microgametócito) formam-se vários microgametas. Os gametas masculinos rebentam a parede celular e são libertados. Quando encontram uma célula com um gameta feminino dão origem ao oocisto não esporulado que é libertado nas fezes dando origem a um novo ciclo (Greiner, 2003; Cannon, 1967; McAllister et al., 1995).

Os dois dragões barbudos apresentavam caquexia e diarreia. Ambos eram positivos para outros parasitas e foram detetados poucos oocistos de *I. amphiboluri* o que torna impossível uma atribuição de causa-efeito entre a presença deste parasita e os sinais clínicos. O lagarto de gola apresentava também diarreia e caquexia e as amostras foram positivas apenas para *I. amphiboluri* tendo sido detetada uma grande quantidade de oocistos. Este animal morreu poucos dias depois do diagnóstico, sendo mais provável que esta coccídea tenha sido a causa do quadro clínico e morte.

4.1.2.2.2 *Choleoeimeria* spp. Paperna, 1989

O género *Eimeria* Schneider 1875 tem sido utilizado para classificar oocistos de coccídeas de vertebrados que contêm quatro esporocistos com dois esporozoítos cada.

Paperna & Landsberg (1989) propuseram dois novos géneros *Choleoeimeria* e *Acroeimeria* para espécies de coccídeas parasitas de répteis com 4 esporocistos com 2 esporozoítos que têm o seu desenvolvimento endógeno nas células hipertrofiadas da vesícula biliar e na zona de microvilosidades do epitélio intestinal, respectivamente.

Os oocistos do género *Choleoeimeria* apresentam também uma morfologia característica, são alongados (rácio comprimento largura > 1,4), os esporocistos são bivalvulados, sem corpo de stieda e têm esporulação endógena (Paperna & Landsber, 1989).

Jirků, Modrý, Šlapeta, Koudela & Lukeš (2002) e mais recentemente Megía-Palma et al. (2015) identificaram características filogenéticas e morfológicas que suportam a validação dos gêneros *Acrooimeria* e *Choleoimeria*, diferenciando-os filogeneticamente do gênero *Eimeria* que parasita mamíferos e aves.

Desta forma, no presente estudo, os oocistos com forma cilíndrica e um rácio comprimento/largura > 1,4 contendo 4 esporocistos sem corpo de stieda ou substieda foram classificados como pertencendo ao gênero *Choleoimeria*.

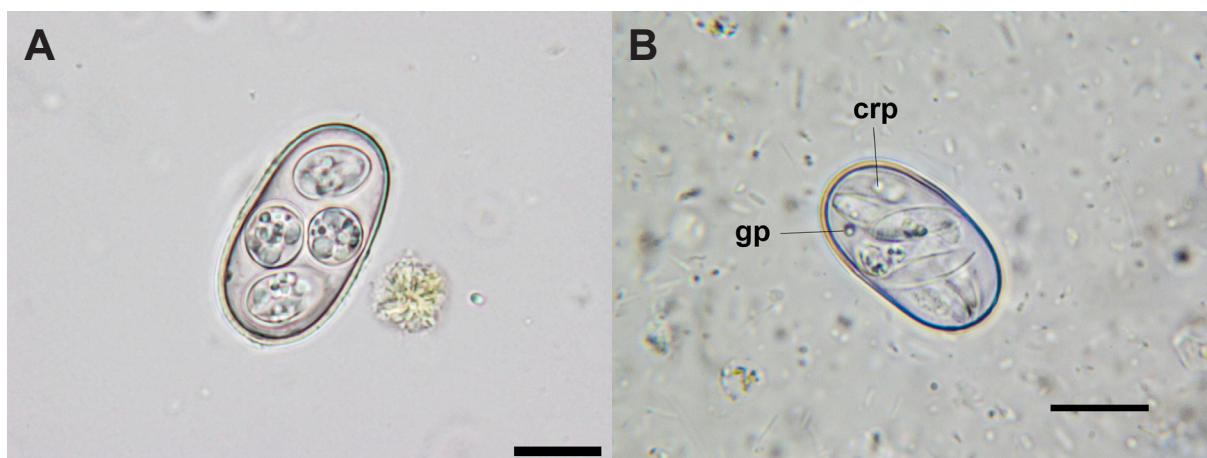
4.1.2.2.1 *Choleoimeria (Eimeria) pogonae* Walden, 2009

Oocistos deste parasita foram encontrados em dois dragões barbudos.

A espécie foi descrita pela primeira vez por Walden (2009) e classificada como *Eimeria pogonae*. Em 2015, Szczepaniak, Tomczuk, Lojszczyk-Szczepaniak, & Lopuszynski, reclassificaram a espécie em *Choleoimeria pogonae* baseando-se nos trabalhos de Paperna & Landsber (1989) e Jirku et al. (2002).

Esta é a única espécie de *Eimeria/Choleoimeria* descrita neste hospedeiro e as características dos oocistos (tamanho e rácio comprimento/largura do oocisto e esporocisto, ausência de micrópilo e presença de grânulo polar em alguns oocistos) encontrados neste estudo são coincidentes com as descritas por Walden (2009) e Szczepaniak et al. (2015) (figura 5).

Figura 5 - Oocistos de *Choleoimeria pogonae* em exame coprológico de *Pogona vitticeps*. **Legenda:** gp - grânulo polar; crp - corpo refrátil posterior. **Escala** - 10 µm. Imagens originais.



Oocistos encontrados em *Pogona vitticeps* [média (min-máx):

Tamanho do oocisto (n=6) - 26,012 x 14,873 (24,952-27,263 x13,972-15,387);

Rácio (c/l) (n=6) - 1,749 (1,692-1,823);

Tamanho do esporocisto (n=6) - 10,472 x 6,844 (9,476-10,954 x 6,203-7,426);

Rácio (c/l) (n=6) - 1,534 (1,451-1,712)

As fases do ciclo de vida deste parasita são as mesmas das outras coccídeas apesar de se caracterizarem por uma fase endógena situada no epitélio da vesícula biliar. As células do epitélio dos ductos e vesícula biliar infetadas apresentam-se deslocadas para o lúmen, mantendo-se ligadas à membrana basal por uma pequena porção de citoplasma.

Em algumas regiões encontra-se pseudoestratificação focal, hipertrofia e degenerescência celular (Szczepaniak et al., 2015).

Os sinais clínicos incluem emaciação, desidratação e caquexia (Szczepaniak et al., 2015). No presente estudo os animais positivos a este parasita apresentavam diarreia (num caso com presença de sangue) e condição corporal diminuída.

A identificação foi confirmada como altamente provável pelo próprio Dr. Szczepaniak (comunicação pessoal, 2017).

4.1.2.2.2 *Choleoeimeria* sp. Paperna, 1989

Foram encontrados oocistos de *Choleoeimeria* sp. (figura 6) em amostra coprológica de um lagarto de cauda espinhosa.

Existem duas espécies de coccídea descritas que parasitam lagartos da família Cordylidae. *Eimeria murphyi* reportada em *Cordylus cataphractus* por Upton, McAllister & Garrett (1993) e *Eimeria foulshami* descrita por Daszak & Ball (2001) num lagarto do Sudão (*Gerrhosaurus major*). Os oocistos encontrados no presente estudo distingue-se do encontrado por Upton et al. (1993) pelo tamanho, que é significativamente menor, os esporocistos eram, igualmente, de tamanho inferior assim como o rácio comprimento/largura que era menor. Distinguem-se dos oocistos encontrados por Daszak & Ball (2001) pela presença de grânulo polar num dos oocistos, maior comprimento e rácio comprimento/largura do oocisto e pela maior largura dos esporocistos e respectivo rácio comprimento/largura. Desta forma, esta poderia ser uma nova espécie de *Choleoeimeria*, mas optou-se por não se classificar pelo facto de a sua caracterização morfológica não obedecer aos critérios e princípios descritos por Duszynski & Wilber (1997) e o local de desenvolvimento endógeno ser desconhecido.

Ainda assim deve ser referido que de acordo com a bibliografia consultada este será o primeiro registo de uma coccídea deste género neste hospedeiro.

Figura 6 - Oocistos de *Choleoeimeria* sp. em exame coprológico de *Cordylus tropidosternum*. Escalas - 20 µm. Imagens originais.



Oocistos encontrados em *Cordylus tropidosternum* [média (min-máx)]:

Tamanho do ocisto (n=3) - 15,470 x 30,583 (14,894-15,88 x 29,281-31,791);

Rácio (c/l) (n=3) - 1,98 (1,932-2,033); **Parede total (n=3)** - 0,851 (0,762-0,974);

Grânulo polar (n=1) - 1,279 x 1,260;

Tamanho do esporocisto (n=12) - 8,644 x 7,957 (7,899-9,705 x 7,244-8,237);

Rácio (c/l) (n=12) - 1,087 (0,999-1,211);

Resíduo do esporocisto (n=3) - 4,521 x 3,994 (4,484-4,586 x 3,795-4,143).

O lagarto apresentava diarreia e caquexia. Este foi o único parasita encontrado nos exames coprológicos deste lagarto, sendo um possível causador dos sinais clínicos.

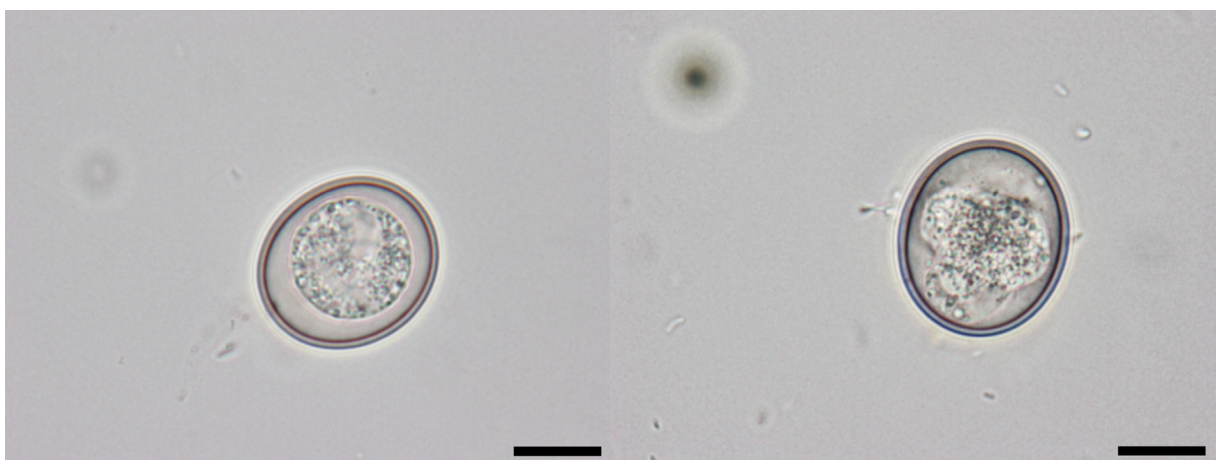
4.1.2.2.3 Oocistos de género não identificado

Durante o exame coprológico de um gecko diurno de Madagascar foram encontrados oocistos de uma coccídea. Nenhum dos oocistos estava esporulado e por isso a identificação do género não foi possível e não se efetuaram medições.

Na literatura consultada encontram-se descritas 3 espécies de coccídias neste hospedeiro: *Eimeria brygooi* e *Isospora gekkonis*, ambas descritas por Upton & Barnard (1987) e *Choleoeimeria phesumae* por Daszak & Ball (1991). A última poderá ser excluída pois os seus oocistos são cilíndricos e os encontrados no presente estudo são esféricos/sub-esféricos (figura 7).

O lagarto apresentava condição corporal diminuída e fezes de consistência branda e acinzentadas. Sendo este o único parasita encontrado nas amostras coprológicas deste lagarto poderá ter sido a causa dos sinais clínicos.

Figura 7 - Oocistos de coccídea de género desconhecido em análise coprológica de *Phelsuma madagascariensis*. **Escala** - 10 µm. Imagens originais.



4.1.2.3 Filo Ciliophora

Foram encontradas formas parasitárias (quistos e/ou trofozoítos) de protozoários ciliados em nove dos 33 lagartos testados, correspondendo a uma prevalência média estimada de 28,5%. Seis iguanas verdes, dois dragões barbudos e um gecko leopardo foram os sáurios com amostras positivas.

Esta prevalência é superior à encontrada por Rataj et al. (2011), que referiram uma prevalência de 12,6% (41 lagartos positivos de 331 testados) e superior também aos 4,7% (sete lagartos positivos de 168 testados) encontrados por Okulewicz et al. (2015).

Por sua vez, no trabalho de Papini et al., 2011 não foi encontrada nenhuma forma parasitária deste filo. No trabalho de Bernadino (2014) 11 dos 49 geckos leopardo e 1 dragão barbudo dos quatro lagartos de proprietários particulares apresentavam quistos de ciliados correspondendo a uma prevalência média estimada de 23,5%.

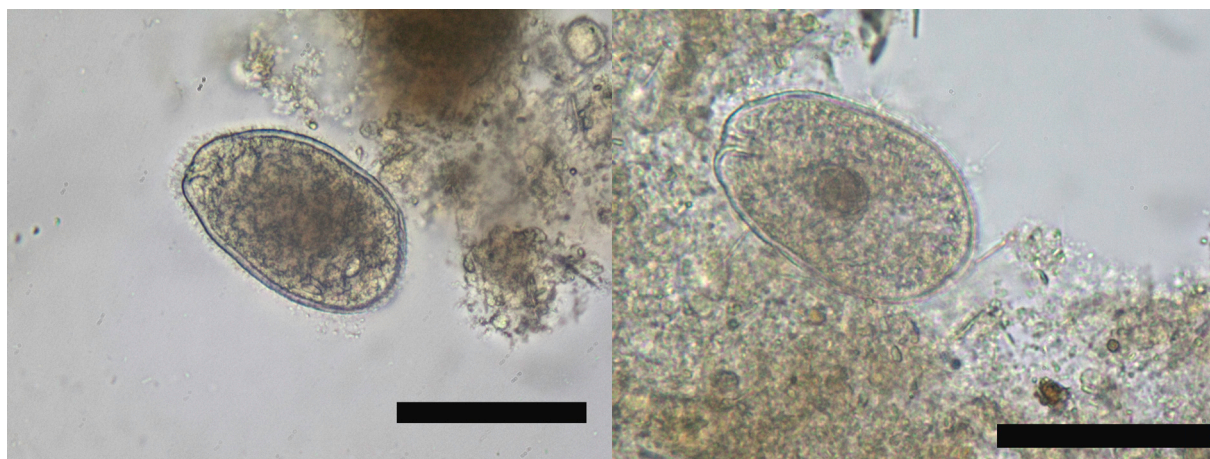
O facto de seis dos nove sáurios positivos no presente trabalho estarem alojados em conjunto pode ser um fator que contribuiu para que a prevalência deste parasita seja mais elevada do que nos estudos mencionados.

4.1.2.3.1 *Balantidium* sp. Claparède & Lachmann 1858

Dos nove sáurios em que foram detetadas formas parasitárias do filo Ciliophora (figura 8), as seis iguanas verdes apresentavam trofozoítos de *Balantidium* sp.

No trabalho de Rataj et al. (2011) dos oito animais positivos para *Balantidium* sp. quatro eram *Iguana iguana*, por sua vez, Okulewicz et al. (2015) encontraram este género em duas *Iguana iguana* que foram os únicos lagartos positivos para *Balantidium* e Pasmans et al. (2008) no seu trabalho referem que dos 10 animais positivos para *Balantidium* sp. nove pertenciam à família Iguanidae. Tendo em conta a prevalência nos outros estudos a presença deste parasita em iguanas era esperada. Adicionalmente, os indivíduos estavam alojados em conjunto sendo previsível que todos fossem positivos.

Figura 8 - Trofozoítos de *Balantidium* sp. em exame coprológico de *Iguana iguana*. Escalas - 50 µm. Imagens originais.



A identificação ao nível de espécie não foi possível uma vez que não existem descrições de espécies neste hospedeiro, apesar de já terem sido reportados casos, como os supracitados, em que este género de parasita está presente. Atualmente a identificação definitiva das espécies deste género é feita, à semelhança das amebas, com a conjugação de estudos de caracterização morfológica através de colorações específicas e de estudos moleculares e genéticos (Ponce-Gordo, comunicação pessoal, 2017).

Os trofozoítos encontrados neste estudo eram elipsóides, cobertos regularmente por cílios, a abertura oral situada medianamente na extremidade anterior e mediam entre 61,980 a 63,140 µm de eixo maior e 39,754 a 40,173 µm de eixo menor. Em nenhum dos trofozoítos foi possível identificar o macronúcleo.

Em grandes quantidades ou em associação com outros parasitas estes ciliados podem ser patogénicos, causando colite (Barnard & Upton, 1994).

As iguanas positivas para *Balantidium* sp. encontravam-se caquéticas e morreram durante o presente estudo. Não se pode atribuir uma relação causa-efeito entre a presença deste parasita e os sinais clínicos pois todas eram positivas a quatro filões de parasitas diferentes.

4.1.2.3.2 *Nyctotherus* sp. Leidy 1849

O género *Nyctotherus* foi encontrado sob a forma de quistos em dois dragões barbudos e num gecko leopardo. Num dos dragões barbudos foram encontrados, além de quistos, trofozoítos. Foram encontrados três tipos de quistos que serão identificados de ora em diante Tipo A, Tipo B e Tipo C. A amostra de um dragão barbudo apenas continha quistos de Tipo A, a do segundo dragão barbudo tinha quisto Tipo A e Tipo B e o gecko leopardo quisto de Tipo C. O facto de um animal conter dois tipos de quistos e simultaneamente trofozoítos morfológicamente distintos (Tipo 1 e Tipo 2) sugere que poderiam existir duas espécies de *Nyctotherus* a parasitar o dragão barbudo.

A prevalência reportada por Rataj et al. (2011) foi de 10% (30 lagartos positivos de 331 testados). Pasmans et al. (2008) reportaram uma prevalência de 13,9 % em lagartos da família Agamidae e 14,7 % em lagartos da família Gekkonidae. Estas são as famílias de dragões barbudos e geckos leopardo respectivamente. Por sua vez, Okulewicz et al. (2015) referiram uma prevalência de 3% (5 animais positivos de 168 testados).

Bernardino (2014) refere uma prevalência de 22,4% (49 animais testados) de quistos de *Nyctotherus* em gecko leopardo. Refere também a presença de quistos deste género num dragão barbudo de dois animais testados.

Na literatura consultada existe referência a nove espécies de *Nyctotherus* parasitas de lagartos, *N. haranti* Grassé 1928, *N. trachysauri* Johnston 1932, *N. kypodes* Geimen & Wichtermann 1937, *N. beltrani* Hegner 1940, *N. skiloffi* Shouten 1940, *N. woodi* Amrein 1952, *N. hardwickii* Janakidevi 1961, *N. gerrhosauri* Albaret 1975, *N. earlensis* e *N. jimenezis* Garza & Hernández 1986 (Garza & Hernández, 1986).

Não foi feita uma tentativa de identificação à espécie dos trofozoítos encontrados dada a confusão que existe na taxonomia deste género e a falta de estudos mais atualizados a incidir sobre as espécies presentes em répteis. Adicionalmente, não tendo sido feitas colorações específicas, as características morfológicas não foram definidas de forma sistemática e satisfatória para separar ou inserir estes trofozoítos nas espécies descritas em répteis.

À semelhança do que acontece com o género *Balantidium* a identificação do género *Nyctotherus* deverá ser feita através de estudos moleculares e genéticos complementados com estudos morfológicos através de colorações específicas, especialmente com saís de prata, existindo a possibilidade de alguma sinonímia entre as espécies já descritas (Ponce-Gordo, comunicação pessoal, 2017).

Não existem casos reportados na literatura de efeitos patogénicos atribuídos à presença de *Nyctotherus* sp. Os dragões barbudos apresentavam caquexia e diarreia, no entanto, não foi possível associar a presença deste ciliado aos sinais clínicos já que ambos apresentavam outros filões de parasitas. O dragão barbudo com diarreia catarral tinha um número de trofozoítos muito superior (figura 9.C). O gecko leopardo, apesar de se encontrar parasitado com outros filões de parasitas (Amoebozoa, Metamonada e Nematoda) não apresentava nenhum sinal clínico o que evidencia o carácter comensal deste parasita.

Descrição dos trofozoítos:

Tipo 1 (figura 9.A): Movimento progressivo retilíneo pausado, manteve sempre a forma do trofozoíto estável e rígida entrando em movimentos circulares quando encontrava obstáculos à sua passagem. Forma quase elipsóide sendo ligeiramente mais largo na porção posterior, coberto denso e uniformemente por cílios de tamanho regular.

Citostoma abria lateralmente no terço anterior a cerca de 30µm da extremidade anterior, apresentava cílios maiores que os que cobriam o trofozoíto, a citofaringe cruzava quase a totalidade do trofozoíto transversalmente terminando perto da linha média num vacúolo alimentar.

Macronúcleo colado à porção anterior da citofaringe e com conformação entre o reniforme e triangular. Acima do macronúcleo apresentava um aglomerado granular aparentemente contido dentro de uma cápsula.

Não foi possível identificar o micronúcleo em nenhum dos trofozoítos.

A abertura anal era terminal e corria perfeitamente paralela ao corpo do trofozoíto.

Medições (n=2) µm:

Comprimento - 155,73 - 130,064; **Largura** - 84,301 - 74,407;

Comprimento Macronúcleo - 16,062 - 20,347; **Largura Macronúcleo** - 27,232 - 28,836;

Abertura anal - 39,718 - 28,718; **Peristoma+Citofaringe** - 63,270 - 67,724;

Cílios Externos - 5,110 - 6,397; **Vacúolo alimentar** - 14,908x10,142 - 10,372x10,236; **Cílios do peristoma** - 12,355 - 14,394;

Tipo 2 (figura 9.B): Movimento progressivo retilíneo, ondulatório e rápido com grande plasticidade de forma à medida que encontrava obstáculos à sua passagem. Forma elipsóide mais arredondada que os trofozoítos de Tipo 1, coberto denso e uniformemente por cílios de tamanho regular. Porção posterior mais larga terminando numa espécie de cauda.

Peristoma com localização anterior e citofaringe prolongada até ao terço posterior do trofozoíto terminando num vacúolo alimentar.

Macronúcleo colado à porção anterior da citofaringe e com conformação muito variável entre reniforme, elíptica, achatada e triangular.

Acima do macronúcleo apresentava um aglomerado granular aparentemente contido dentro de uma cápsula.

Não foi possível identificar o micronúcleo em nenhum dos trofozoítos.

Posteriormente à porção terminal da citofaringe, em alguns trofozoítos, foi possível identificar variados vacúolos alimentares.

Abertura anal terminal, mais curta que no Tipo 1 e menos paralela ao corpo do trofozoíto e continha pelo menos um vacúolo contrátil/anal.

Medições [(n=nº de medições) média (min-máx) µm]:

Comprimento (n=14)- 158,682 (132,030-183,127); **Largura (n=14)** - 74,579 (64,030-88,698);

Comprimento Macronúcleo (n=13) - 18,099 (9,37-27,382);

Largura Macronúcleo (n=13) - 33,128 (23,288-39,634);

Abertura anal (n=8) - 19,375 (17,944-21,874); **Cílios Externos (n=10)** - 7,748 (6,857-9,093);

Vacúolo contrátil/anal (n=5) - 21,295x22,450 (16,452-28,447x16,962-25,557);

Descrição dos quistos:

Tipo A (figura 9.D) n=5:

Quistos ovais, extremidade anterior mamiliforme, operculados, com parede lisa e com macronúcleo posterior a um aglomerado granular.

Medições média(min-max) em µm:

Comprimento - 73,790 (68,432-78,266); **Largura** - 51,293 (47,888-57,247);

Macronúcleo - 15,347 x 23,716 (11,257-18,722 x 18,325-30,961);

Aglomerado granular - 22,010 x 25,786 (15,309-26,293 x 21,899-30,365);

Espessura da parede - 3,721 (3,227-3,976);

Tipo B (figura 9.E) n=1:

Quisto mais alongado que o de Tipo A, com extremidade anterior mamilada, sem opérculo aparente, parede lisa e com macronúcleo posterior a um aglomerado granular.

Medições em µm:

Comprimento - 83,548; **Largura** - 38,502; **Macronúcleo** - 17,817 x 21,491;

Aglomerado granular - 28,122 x 24,480; **Espessura da parede** - 3,610;

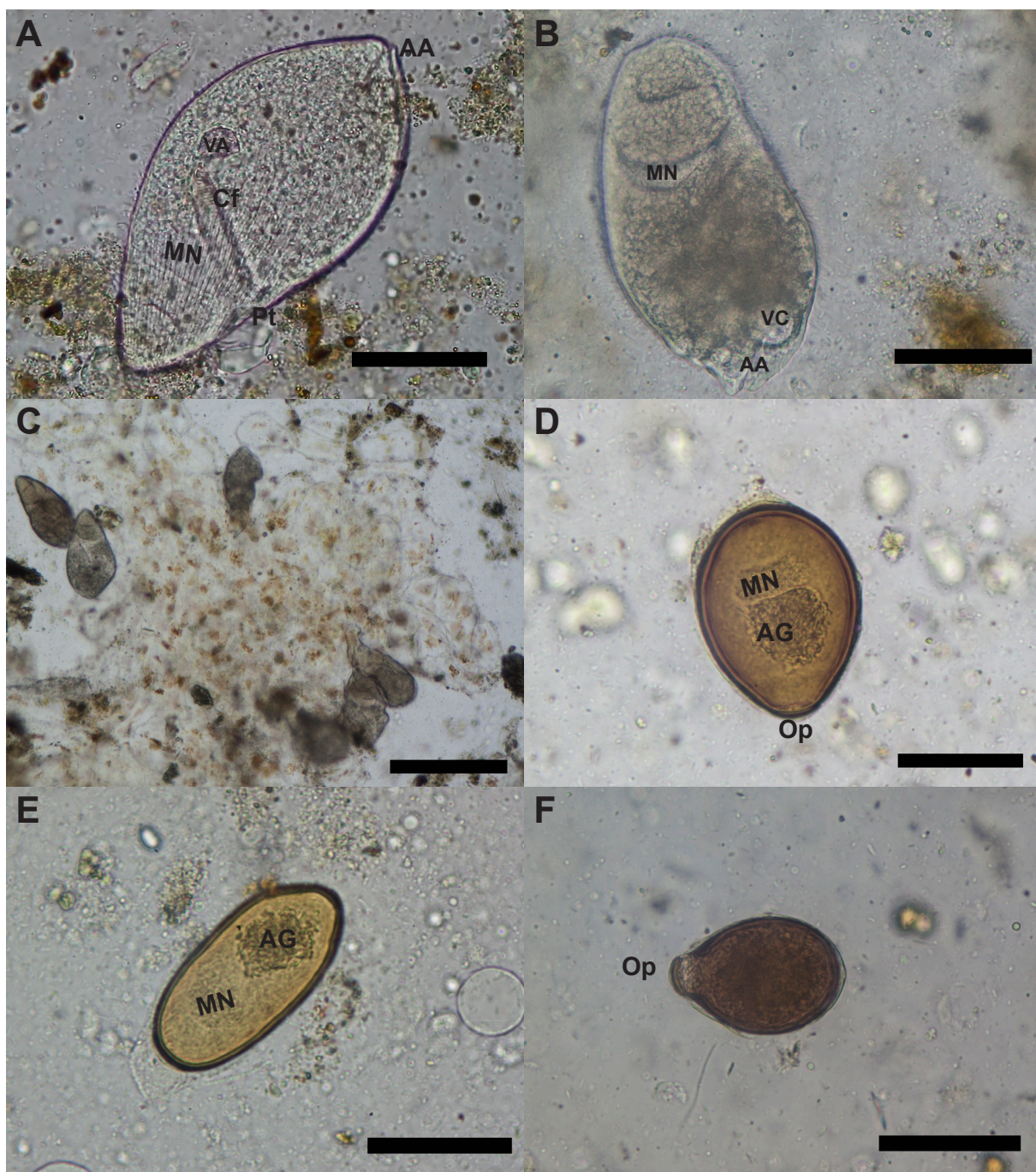
Tipo C (figura 9.F) n=1:

Quisto oval, extremidade anterior mamiliforme, com opérculo distinto, parede lisa, sem macronúcleo e aglomerado granular visível.

Medições em µm:

Comprimento - 60,593; **Largura** - 41,849; **Espessura da parede** - 3,017;

Figura 9 - Trofozoítos e quistos de *Nyctotherus* sp. encontrados ao exame coprológico de sáurios. **A** - Trofozoíto Tipo 1 em amostra de *Pogona vitticeps*. **Legenda:** AA - Abertura anal; Cf - Citofaringe; MN - Macronúcleo; Pt - Peristoma; VA - Vacúolo alimentar. **Escala** - 50 µm. **B** - Trofozoíto Tipo 2 em amostra de *Pogona vitticeps*. **Legenda:** AA - Abertura anal; MN - Macronúcleo; VC - Vacúolo contráctil/anal. **Escala** - 50 µm. **C** - Trofozoítos Tipo 2 em amostra de *Pogona vitticeps*. **Escala** - 200 µm. **D** - Quisto Tipo A em amostra de *Pogona vitticeps*. **Legenda:** AG - Aglomerado granular; MN - Macronúcleo; OP - Opérculo. **Escala** - 50µm. **E** - Quisto Tipo B em amostra de *Pogona vitticeps*. **AG** - Aglomerado granular; **MN** - Macronúcleo. **Escala** - 50 µm. **F** - Quisto Tipo C em amostra de *Eublepharis macularius*. **OP** - Opérculo. **Escala** - 50 µm. Imagens originais.



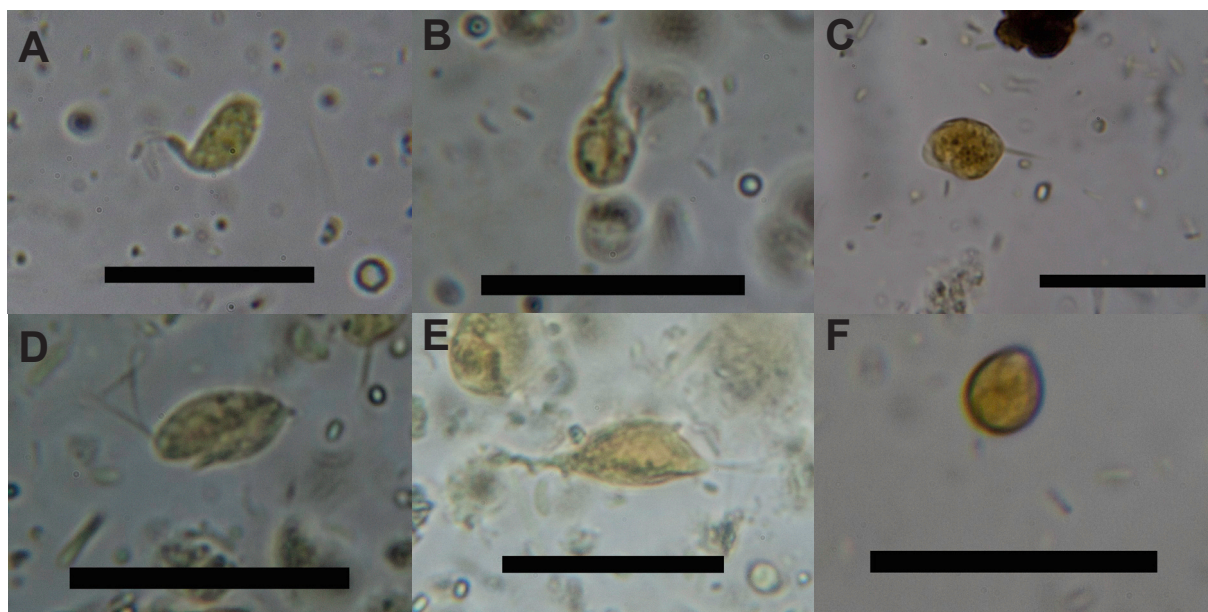
4.1.2.4 Filo Metamonada

A prevalência média estimada de protozoários flagelados (figura 10) em lagartos foi de 40,1% correspondendo a 13 animais positivos dos 33 testados. Os animais positivos incluíram seis iguanas verdes, três dragões barbudos, dois geckos leopardo, um lagarto de colar (*Crotaphytus collaris*) e um gecko diurno de Madagáscar.

Esta prevalência é consideravelmente superior aos 17,1% (103 lagartos positivos dos 605 testados) referidos no trabalho de Pasmans et al. (2008); aos 0,6% (dois animais positivos de 331 testados) descritos por Rataj et al. (2011); e aos 8,3% (15 animais positivos de 192 testados) referidos por Papini et al. (2011).

Além do tamanho inferior de amostra, a diferença de prevalências entre o presente estudo e os acima supracitados pode, à semelhança do que foi dito para os filis Ciliophora e Amoebozoa, dever-se ao facto de as seis Iguanas serem mantidas em conjunto e estas representarem quase metade dos animais positivos.

Figura 10 - Trofozoítos e quisto de Metamonada em exames coprológicos. **A** - Trofozoíto de Metamonada em exame coprológico de *Iguana iguana*. **B, C, D e E** - Trofozoíto de Metamonada em exame coprológico de *Pogona vitticeps*. **F** - Quisto de Metamonada (*Chilomastix* sp.) em exame coprológico de *Pogona vitticeps*. **Escala** - 20 µm. Imagens originais.



O ciclo de vida destes parasitas e o seu tratamento em lagartos é igual ao descrito para serpentes.

Além do género *Monocercomonas* que parasita cobras e lagartos e tem a mesma apresentação clínica, também o género *Leptomonas* foi associado com a presença de colite em camaleões (Frank, 1984) e os géneros *Hexamastix* (em lagartos do género *Uromastix*), *Spironucleus*, *Hypotrichomonas*, *Monocercomonas*, *Tetratrichomonas* e *Tritrichomonas* foram associados à presença de enterite em lagartos (Barnard & Upton, 1994).

À excepção de um gecko leopardo todos os animais apresentavam sinais clínicos, no entanto, além de parasitas deste filo eram positivos a outros parasitas. Um dragão barbudo e o gecko diurno de Madagáscar apresentavam diarreia enquanto os outros tinham caquexia.

4.1.2.5 Filo Nematoda

A prevalência média estimada do filo Nematoda em sáurios foi de 51,3% o que corresponde a 17 animais positivos dos 33 testados. Seis iguanas verdes, quatro dragões barbudos, dois geckos de crista (*Correlophus ciliatus*), dois lagartos de colar, um gecko leopardo, um lagarto cornudo gigante (*Phrynosoma asio*) e um lagarto cornudo do deserto (*Phrynosoma platyrhinos*) foram os animais positivos. À excepção do *Phrynosoma platyrhinos* em que foi detetado um adulto da família Physalopteridae todos os outros lagartos continham formas parasitárias da família Pharyngodonidae. Uma *Iguana iguana* além de amostras positivas para a família Pharyngodonidae apresentou, no esfregaço direto, dois adultos da família Atractidae. Dos 16 lagartos positivos para formas parasitárias da família Pharyngodonidae em todos foram detetados ovos desta família, num *Crotaphytus collaris* foi detetada adicionalmente uma larva de género desconhecido e numa *Iguana iguana* um adulto do género *Thelandros/Pharyngodon*.

O filo Nematoda foi também o mais prevalente nos trabalhos de Okulewicz et al. (2015), Papini et al. (2011) Pasmans et al. (2008), Rataj et al. (2011) e Bernardino (2014). Além deste filo ser o mais prevalente nestes estudos a família Pharyngodonidae foi a mais prevalente dentro dos nematodes e a sua prevalência será discutida com mais pormenor no ponto 4.1.2.5.2.

Se, por um lado, a elevada prevalência de nematodes da família Pharyngodonidae está de acordo com a literatura, por outro, a baixa prevalência de outros grupos de nematodes não era esperada. No trabalho de Rataj et al. (2011) os ovos de estrombilídeos apresentaram uma prevalência de 11,8% (38 animais positivos dos 311 analisados) e os ovos de ascarídeos 6,9% (23 animais positivos de 311 analisados). Por sua vez Papini et al. (2011) no seu trabalho também não encontraram lagartos com amostras positivas para ascarídeos mas 16 dos 198 sáurios (8,8%) tinham amostras positivas para estrombilídeos. Okulewicz et al. (2015) referiram uma prevalência de Ascarídeos de 14,3% (24 animais positivos de 168 testados). Tendo em conta estes valores, seria expectável que fossem encontradas formas parasitárias de algum destes grupos de nematodes. Em relação aos trabalhos de Rataj et al. (2011) e Okulewicz et al. (2015) esta diferença pode dever-se em parte ao facto de terem sido efectuadas necrópsias à grande maioria dos animais, aumentando a probabilidade de encontrar parasitas adultos, e estes resultados serem apresentados em conjunto com os dos exames coprológicos.

4.1.2.5.1 Família Atractidae

Foram encontrados dois espécimes desta família (figura 11) num esfregaço direto com gota soro fisiológico de uma Iguana verde.

Os espécimes correspondiam a um macho e uma fêmea.

O facto de serem nematodes de pequena dimensão, afunilando nas extremidades, presença de um esófago com uma porção muscular (anterior) e uma porção glandular (posterior), bulbo esofágico valvulado e poro excretor anterior ao bulbo esofágico permitiram identificar este parasita como pertencente à família Atractidae.

A porção muscular era mais comprida que a porção glandular em ambos os espécimes o que sugere que pertençam aos géneros *Cyrtosomum/Atractis*.

Durante os últimos anos estes dois géneros têm sido utilizados de forma indiferenciada. Atualmente é sugerido que os parasitas desta família cujos machos apresentem gubernáculo, duas espículas assimétricas, de tamanho diferente e sendo uma lanceolada e a outra lagenoide (em forma de garrafa) sejam inseridas no género *Atractis*, enquanto aqueles com duas espículas lanceoladas e sem gubernáculo sejam inseridas no género *Cyrtosomum* (Bursey & Flanagan, 2002). Desta forma o macho encontrado no presente estudo seria incluído no género *Cyrtosomum* e a fêmea ficaria sem classificação até ao género.

A identificação até à espécie é baseada no tamanho geral do parasita e, principalmente, nas estruturas caudais dos machos: tamanho, tipo e simetria das espículas e o número de papilas caudais (Bursey & Flanagan, 2002).

Estas estruturas não foram definidas com satisfação não tendo sido feita uma classificação ao nível da espécie.

O único registo encontrado até à data destes géneros a parasitar este hospedeiro foi feito por Teles et al. em 2016. No entanto não foram descritas características morfológicas nem foram disponibilizadas fotografias do parasita que permitissem uma comparação.

Figura 11 - Nematodes do género *Cyrtosomum* em exame coprológico de *Iguana iguana*.

A - ♂ - Escala - 500 µm; **B** - ♀ - Escala - 200 µm. Imagens originais.



Descrição dos espécimes encontrados durante este estudo (medidas em µm):

♀ - **Comprimento** - 1805,908; **Largura ao nível do bulbo esofágico** - 92,092;
Bulbo esofágico (CxL) - 67,241 x 71, 778; **Esófago s/ bulbo** - 372,727;
Parte muscular anterior do esófago - 285,323;
Parte glandular posterior do esófago - 88,916; **Vulva : Ânus** - 113,910;
Vulva : Extremidade posterior - 267,362; **Ânus : Extremidade posterior** - 157,078.

♂ - **Comprimento** - 4907,700; **Largura ao nível do bulbo esofágico** - 231,677;
Bulbo esofágico (CxL) - 184,675 x 182,425; **Esófago s/ bulbo** - 920,544;
Parte muscular anterior do esófago - 686,893;
Parte glandular posterior do esófago - 235,871; **Espícula maior (lanceolada)** - 453,369;
Espícula menor (lanceolada)- 285.864; **Gubernáculo** - ausente/não visível

Os nematodes da família Atractidae têm um ciclo de vida direto e são vivíparos. Os ovos eclodem e desenvolve-se uma larva L3 ainda *in utero* sendo auto-infetantes para o hospedeiro atingindo, desta forma, um grande número de parasitas (Jacobson, 2007).

Não existem casos reportados na bibliografia consultada de doença causada por este parasita em lagartos.

A iguana verde apresentava caquexia e fazia parte do grupo de 6 animais já mencionado nos filões Amoebozoa, Ciliophora e Metamonada. Apesar de este parasita ter um ciclo de vida direto, não foi encontrado em nenhuma amostra das restantes 5 do grupo.

4.1.2.5.2 Família Pharyngodonidae

Como referido anteriormente, foram encontradas formas parasitárias (ovos, uma larva e um adulto) desta família em 16 dos 33 lagartos testados, correspondendo a uma prevalência de 46,8%.

Esta família foi também a mais prevalente nos trabalhos de Rataj et al. (2011) com uma prevalência de 57,1% (189 animais positivos de 331 testados) e de Pasmans et al. (2008) que referiram uma prevalência de 51,5% (363 animais positivos de 705 testados). Estes dois trabalhos apresentaram a prevalência mais similar à do presente estudo.

Papini et al. (2011) referiram uma prevalência de 21,9% (42 animais positivos de 192 testados) e Okulewicz et al. (2015) uma prevalência de 18,4 % (31 animais positivos de 168 testados). Apesar destas prevalências serem inferiores à encontrada no presente estudo, esta família de parasitas foi a mais prevalente em ambos os estudos.

São nematodes com ciclo de vida direto. Vivem no colón e ceco principalmente de répteis herbívoros. As fêmeas produzem ovos com parede espessa e não embrionados. Geralmente são ovos alongados com um lado aplanado e um opérculo sub-polar pode ser encontrado na maioria (Anderson, 2000). A forma de infeção é principalmente fecal-oral (Klingenberg, 2007b). Os ovos dos diferentes géneros/espécies desta família não apresentam características morfológicas suficientes para a sua identificação (Greiner, 2015, comunicação pessoal).

São vermes esbranquiçados de pequena a média dimensão.

As fêmeas são similares nas diferentes espécies pelo que o diagnóstico ao nível de espécie é feito principalmente através das características da extremidade posterior do macho (Greiner, 2015, comunicação pessoal). Na generalidade são considerados organismos comensais e existem autores que afirmam que podem ajudar na digestão de alimentos de origem vegetal. No entanto, em casos de infecções por grandes números de parasitas podem provocar obstruções do trato gastrointestinal, prolapso cloacal e por vezes uma ligeira reação inflamatória local (Klingenberg, 2007b; Jacobson, 2007; Greiner e Mader, 2006).

4.1.2.5.2.1 Ovos

Foram detectados ovos desta família (figura 12-17) em 16 lagartos (46,8%). Foram observados tanto em esfregaços diretos como em flutuações.

Os ovos desta família apresentam muita variabilidade morfológica entre os géneros e espécies, no entanto a identificação definitiva só é possível analisando espécimes adultos, principalmente machos.

No seu trabalho, Rataj et al. (2011) identificaram um tipo de ovo encontrado num gecko leopardo como pertencendo ao género *Pharyngodon* no entanto não justificaram a identificação com características morfológicas. Bernardino (2014) classificou dois tipos de ovos, também em geckos leopardo como pertencendo aos géneros *Pharyngodon* e *Ozolaimus*. A autora também não apresentou as características morfológicas através das quais chegou à identificação. Não tendo sido disponibilizada por nenhum dos autores uma referência bibliográfica para as suas identificações e não tendo sido encontrada na literatura nenhuma referência à classificação de ovos de Pharyngodonidae através da sua morfologia estas identificações não serão consideradas como válidas para o presente trabalho.

Os ovos de *Iguana iguana*, a única espécie herbívora com amostras positivas a ovos de Pharyngodonidae, eram de maiores dimensões, ovais (figura 12.A) ou ligeiramente achatados num dos lados (figura 12.B), apresentavam uma parede lisa e fina. Em nenhum dos ovos se observou um opérculo polar. Foram sempre encontrados em estágio de mórula.

Medições (n=10) média (min-max) μm :

Comprimento - 127,414 (112,223-153,403) ; **Largura** - 67,606 (56,907-96,032);

Rácio c/l - 1,906 (1,597-2,189) ; **Espessura da parede** - 2,2611 (1,709-2,849).

Figura 12 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de *Iguana iguana*.

Escalas - 50 μm . Imagens originais.



Os ovos dos animais omnívoros, dragões barbudos e geckos de crista, tinham em comum apresentarem-se sempre no estágio de desenvolvimento de mórula. Eram ovos mais pequenos do que os de *Iguana iguana* e com parede mais grossa e aparentemente dupla.

Os ovos encontrados em *Pogona vitticeps* apresentavam sempre um opérculo polar evidente, eram ovais (figura 13.A) e, por vezes, com uma das faces achatadas (figura 13.B).

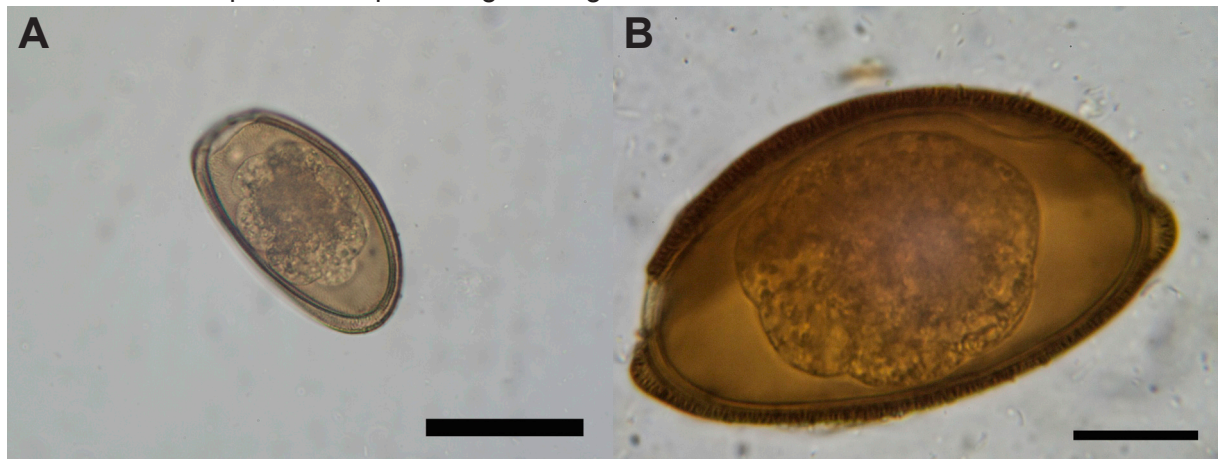
Medições (n=10) média (min-max) μm :

Comprimento - 87,603 (82,806-98,284); **Largura** - 46,404 (43,269-50,400);

Rácio c/l - 1,892 (1,750-2,098); **Espessura da parede** - 3,716 (2,638-4,622).

Figura 13 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de *Pogona vitticeps*.

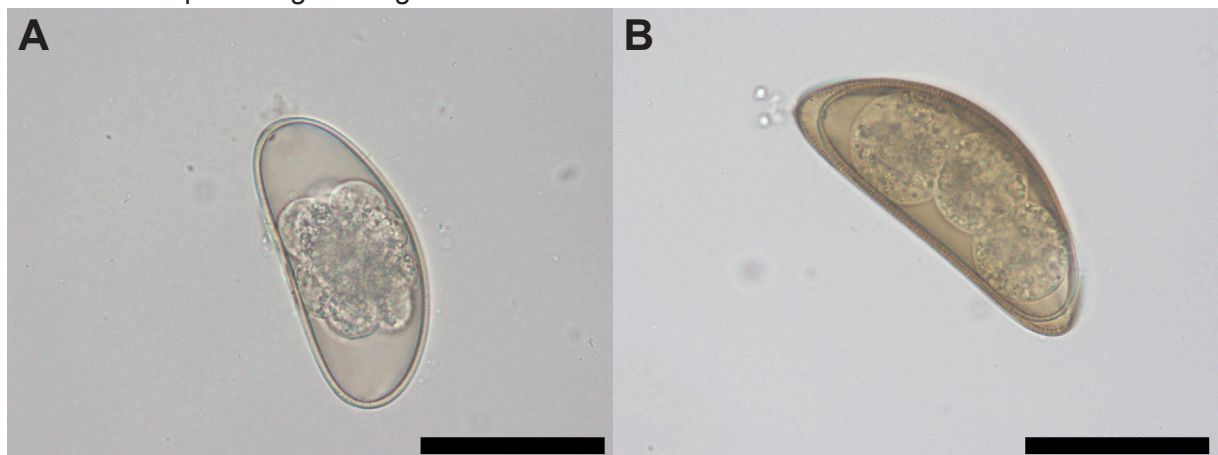
Escala : **A** - 50 μm ; **B** - 20 μm . Imagens originais.



Os ovos encontrados em *Correlophus ciliatus* apresentaram mais variabilidade. A maioria apresentava parede grossa e aparentemente dupla (figura 14.A), mas alguns tinham uma parede lisa e fina (figura 14.B). Alguns ovos eram ovais, outros afunilados nas extremidades ou com uma das faces aplanadas.

Figura 14 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de *Correlophus ciliatus*.

Escala - 50 μm . Imagens originais.



Medições (n=10) média (min-max) μm :

Comprimento - 88,579 (73,914-99,539); **Largura** - 42,580 (38,263-47,961);
Rácio c/l - 2,089 (1,787-2,517); **Espessura da parede** - 3,831 (1,649-6,358).

Os ovos encontrados em animais carnívoros eram morfologicamente parecidos com os encontrados em animais omnívoros, mas por vezes foi encontrado no seu interior uma larva. Sem se ter analisado uma fêmea adulta com ovos *in utero* foi impossível determinar se o seu desenvolvimento ocorreu no exterior do hospedeiro ou no parasita.

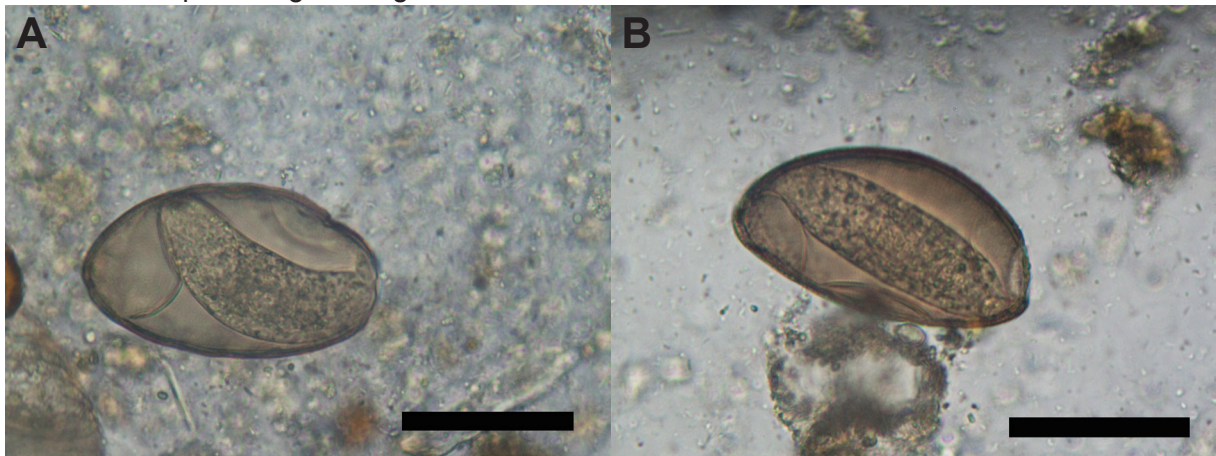
Os ovos encontrados em *Phrynosoma asio* eram, na sua maioria, ligeiramente afunilados nas extremidades e achatados numa das faces (figura 15.A e B). Apresentavam sempre opérculo evidente e uma larva no seu interior.

Medições (n=10) média (min-max) μm :

Comprimento - 85,725 (79,645-89,721); **Largura** - 45,883 (42,455-51,356);
Rácio c/l - 1,873 (1,684-2,007); **Espessura da parede** - 2,779 (2,025-3,761).

Figura 15 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de *Phrynosoma asio*.

Escalas - 50 μm . Imagens originais.



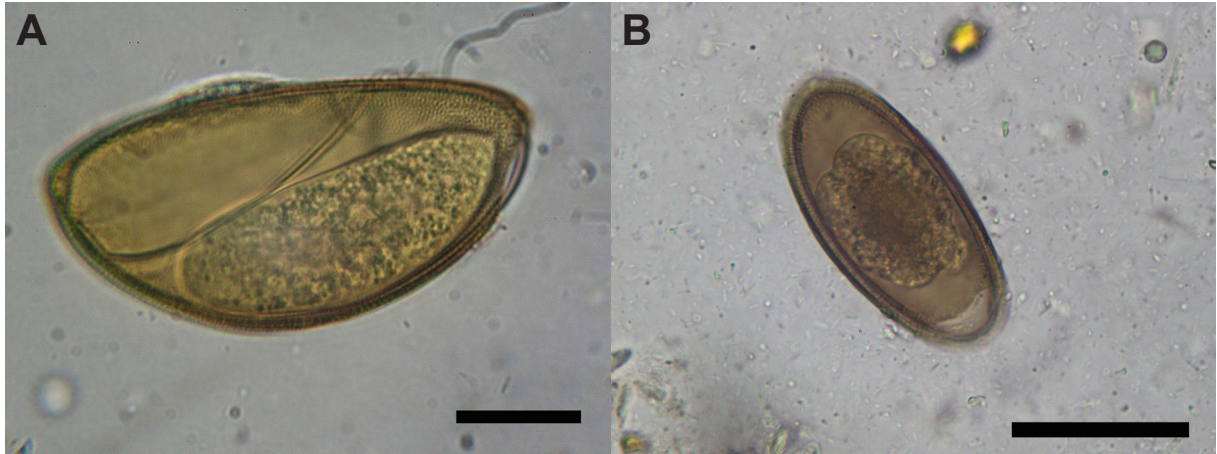
Em *Crotaphytus collaris* foram encontrados ovos com uma larva no seu interior (figura 16.A) ou em estágio de mórula (figura 16.B). Na sua maioria eram afunilados nas extremidades, com uma face aplanada e um opérculo polar muito evidente (figura 16.A). Menos frequentemente eram encontrados ovos com uma forma mais oval e com opérculo polar menos visível ou imperceptível (figura 16.B).

Medições (n=10) média (min-max) μm :

Comprimento - 81,858 (76,228-87,612); **Largura** - 39,366 (37,314-41,370);
Rácio c/l - 2,082 (1,894-2,255); **Espessura da parede** - 3,036 (2,151-4,116).

Figura 16 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de *Crotaphytus collaris*.

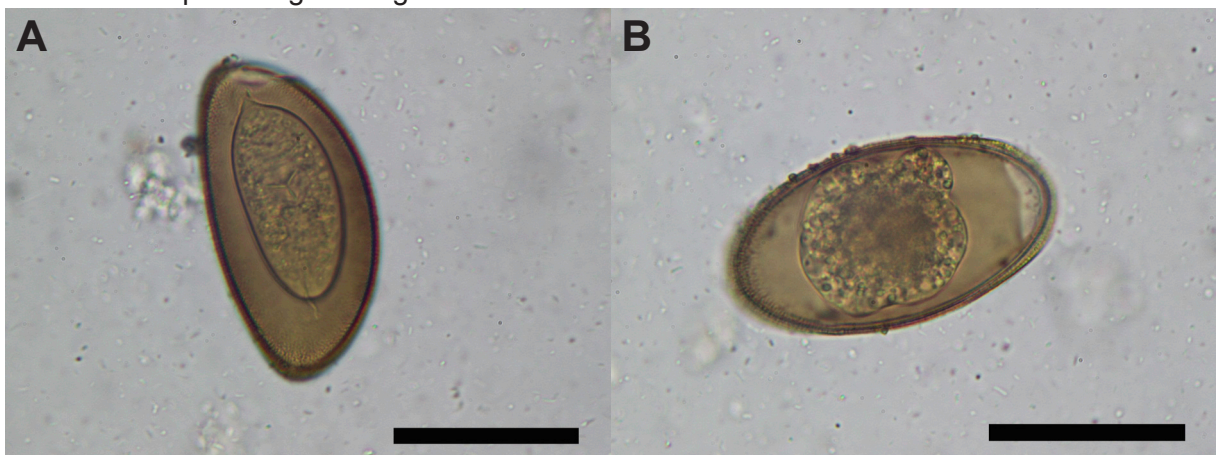
Escalas : **A** - 20 μm ; **B** - 50 μm . Imagens originais.



Os ovos encontrados em *Eublepharis macularius* (figura 17.A e B) eram similares aos encontrados em *Crotaphytus collaris*.

Figura 17 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostra de *Eublepharis macularius*.

Escalas - 50 μm . Imagens originais.



Dos animais com amostras positivas a ovos de Pharyngodonidae apenas o gecko leopardo não apresentava sinais clínicos. Todos os restantes apresentavam caquexia e, adicionalmente, um dragão barbudo apresentava diarreia, 1 gecko de crista apresentava anorexia e o lagarto cornudo gigante regurgitação intermitente.

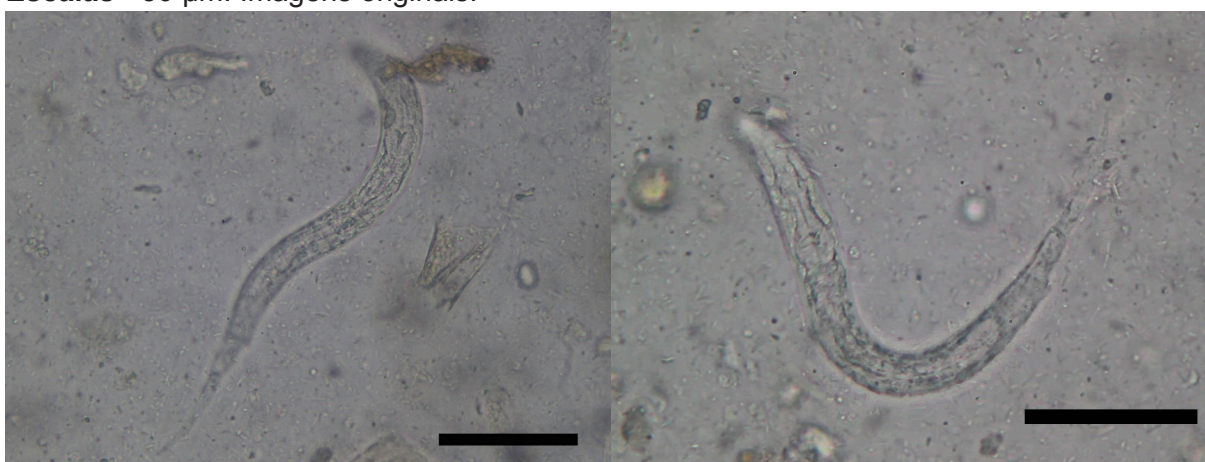
As amostras coprológicas dos dois geckos de crista, do lagarto cornudo gigante, de um lagarto de colar e de um dragão barbudo apenas foram positivas a esta família de parasitas.

4.1.2.5.2.2 Larva de género desconhecido

Num lagarto de colar, além de ovos, foi encontrada uma larva da família Pharyngodonidae (figura 18) no esfregaço a fresco. As larvas desta família caracterizam-se pela presença de um bulbo esofágico e uma cauda comprida, afunilada e pontiaguda. As larvas não apresentam características morfológicas que permitam identificar o género ou espécie a que pertencem. Na bibliografia consultada não foi encontrada referência relativa à presença desta família de parasitas neste hospedeiro. Esta ausência de casos reportados não significa que seja incomum a presença destes nematodes em lagarto de colar, mas provavelmente representa a falta de estudos da sua parasitofauna.

Figura 18 - Larva de género desconhecido em amostra de *Crotaphytus collaris*.

Escala - 50 µm. Imagens originais.



4.1.2.5.2.3 Adultos - *Parapharyngodon* sp. Chatterji, 1933

Apesar da separação dos géneros *Parapharyngodon* e *Thelandros* nem sempre ter sido consensual, atualmente é aceite a classificação separada destes géneros.

São ambos nematodes robustos com estriação marcada desde o final da abertura bucal até ao início da cauda. O género *Thelandros* apresenta cone genital, papilas pendulares fora do cone genital e cauda terminal direcionada posteriormente. O género *Parapharyngodon* apresenta papilas mamiliformes a rodear uma abertura anal terminal e a cauda é subterminal e direcionada dorsalmente (Burse & Goldberg, 2005).

Foi apenas encontrado um espécime (figura 19) correspondente a um macho. Algumas características (número de papilas anais, espícula e membrana alar) não foram possíveis de determinar. Desta forma, baseando a identificação na direcionalidade da cauda, a presença de um ânus terminal rodeado por papilas mamiliformes, este espécime pertencerá provavelmente ao género *Parapharyngodon*. Há que ter em conta que apenas se observou um espécime e sem possibilidade de avaliar fêmeas.

Parapharyngodon sp. macho parasita em *Iguana iguana* (medidas em μm): Nematode cilíndrico de pequenas dimensões. Apresentava estriação desde o final dos lábios até ao início da cauda. Cauda com duas papilas e direcionada dorsalmente.

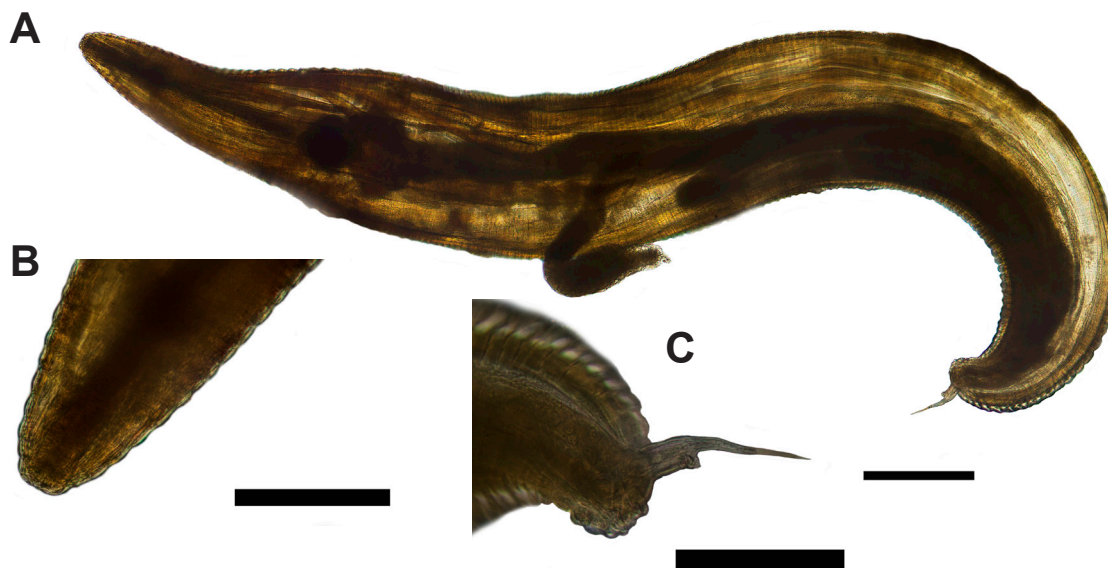
Medições (μm) ♂:

Comprimento total - 2444,114 ; **Espessura** - 290,693;

Comprimento do esófago - 429,644; **Bulbo esofágico (CxL)** - 95,899 X 98,570 ;

Cauda - 97,965; **Estrias** - 16,809.

Figura 19 - *Parapharyngodon* sp. em amostra coprológica de *Iguana iguana*. **A** - vista geral. Escala-200 μm ; **B** - Extremidade posterior. **C** - Extremidade anterior. Escalas -100 μm . Imagens originais.



Os géneros mais comuns a parasitar Iguanas são *Alaeuris*, *Ozolaimus* e *Tachygonetria* (Jacobson, 2007; Teles et al., 2016). Nenhuma das 56 espécies do género *Parapharyngodon* descritas e aceites até ao momento foi encontrada a parasitar este hospedeiro (Burse & Goldberg, 2014).

4.1.2.5.3 Família Physalopteridae

Foi encontrado apenas um espécime desta família pertencente à espécie *Skrjabinoptera phrynosoma* durante a análise de um esfregaço a fresco com soro fisiológico da amostra de um lagarto cornudo. Este parasita e o seu ciclo de vida serão abordados com maior pormenor no ponto 4.2.2.2.4 já que foram encontrados noutra lagarto da mesma espécie durante a realização da necrópsia.

4.1.2.6 Filo Platyhelminthes - *Oochoristica* sp. Luhe 1898

Foram encontrados ovos deste filo (figura 20) em apenas um lagarto de água chinês (*Physignathus cocincinus*) em esfregaços a fresco com NaCl e corado com Soluto de Lugol. Ovo tipo da família Linstowiidae com a presença de uma oncosfera com três pares de ganchos, envolvida por uma camada gelatinosa que corresponde à cápsula uterina .

O único género desta família encontrado na literatura que parasita lagartos é o *Oochoristica*, que ocorre principalmente em iguanídeos e agamídeos. Rataj et al. (2011) encontraram 10 lagartos positivos dos 331 testados. Pasmans et al. (2008) referiram uma prevalência deste género em iguanídeos de 11,6% (19 animais positivos de 164 testados).

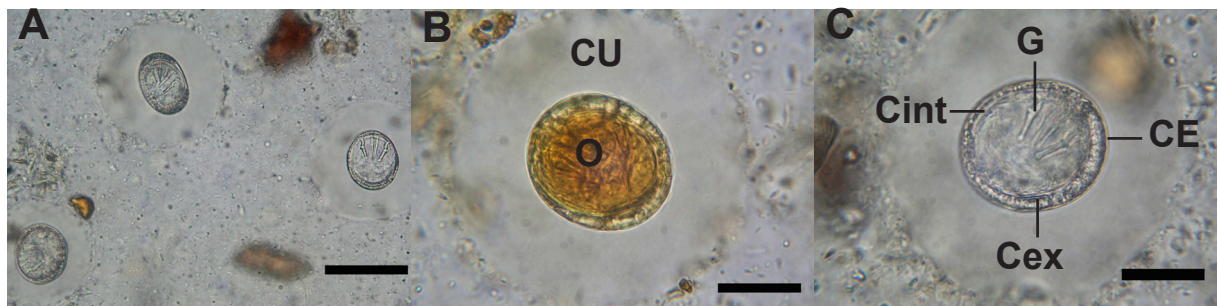
As espécies pertencentes a este género necessitam apenas de um HI que geralmente é um coleóptero (Tenebrionidae). Todas as espécies desenvolvem uma cápsula uterina especializada no proglótide grávido cada uma contendo um ovo. Os coleópteros ingerem os ovos e o parasita desenvolve-se no hemocélio. A forma larvar no HI e HD antes da formação dos proglótides é referida como metacestode. Depois de ingerido o parasita estabelece-se no intestino delgado onde se desenvolve até adulto e se reproduz (Conn, 1985).

Os ovos e os proglótides grávidos dos parasitas do género *Oochoristica* podem ser detectados em análises coprológicas de rotina.

Apesar de não terem sido encontrados estudos sobre os efeitos patogénicos deste género, pode assumir-se que os adultos de *Oochoristica* compitam pelos nutrientes do hospedeiro e podem causar perda de peso.

O tratamento pode ser feito com Praziquantel a 5-8 mg/Kg PO, SC ou IM em dose única, repetida em duas semanas (Klingenberg, 2007b).

Figura 20 - Ovos de *Oochoristica* sp. em amostra de *Physignathus cocincinus*. **A** - Escala - 50µm. **B** - **Legenda:** O - oncosfera; CU - cápsula uterina; corado com soluto de Lugol. **Escala** - 20µm. **C** - **Legenda:** CE - cápsula embrionária; Cex - envelope exterior; Cint - envelope interior; G - gancho; **Escala** - 20µm. Imagens originais.



4.1.3 Sub-ordem Cryptodira - Testudinidae

A prevalência parasitária média estimada em quelônios foi de 79,7%. Poucas conclusões podem ser retiradas desta prevalência já que foram testadas apenas três tartarugas e todas apresentaram pelo menos uma forma parasitária. Apesar deste valor ter que ser analisado com a devida precaução, está de acordo com o encontrado no trabalho de Rataj et al. (2011) que referiram uma prevalência de 88,5% (498 animais positivos de 563 testados). Já no trabalho de Papini et al. (2011) foi reportada uma prevalência de 43,1% (25 animais positivos de 58 testados). No único trabalho efetuado em Portugal, Bernardino (2014) é referida uma prevalência de 77,7% (13 animais positivos de 16 testados). Desta forma seria expectável que, mesmo testando um maior número de animais, a prevalência fosse elevada.

Todas as três tartarugas foram positivas para ovos de nematodes da família Pharyngodonidae. Uma tartaruga russa tinha apenas este tipo de forma parasitária, enquanto as duas tartarugas de esporas africanas apresentaram ambas trofozoítos de um protozoário ciliado. Uma das *Centrochelys sulcata* apresentou também protozoários flagelados, quistos de amebas e um nematode adulto e uma larva da mesma família que os ovos.

4.1.3.1 Filo Amoebozoa - *Entamoeba* sp. Casagrandi & Barbagallo, 1895

Foram detectados quistos de *Entamoeba* sp. numa tartaruga de esporas africana. Apesar de os quistos terem a forma esférica a sub-esférica, regular e de parede lisa característica do género, não foi possível observar o número de núcleos e não foram efetuadas medições para uma tentativa de classificação até à espécie.

Nos trabalhos publicados por Papini et al. (2011) e Rataj et al. (2011) não foram encontradas formas parasitárias deste filo. Pasmans et al. (2008) referiram uma prevalência de 4,3% de *Entamoeba* sp. (53 animais positivos de 1251 testados) e de 2,6% de prevalência de *Entamoeba invadens* (33 animais positivos de 1251 testados). No trabalho de Bernardino (2014) a prevalência apresentada foi de 27,8% (quatro animais positivos de 16 testados).

Em tartarugas estão descritas seis espécies de *Entamoeba*: *E. testudinis* (Hartmann, 1910); *E. terrapinae* (Sanders & Cleveland, 1930); *E. insolita* (Geiman & Wichterman, 1937); *E. invadens* (Rodhain, 1934); *E. knowlesi* (Rodhain & Hoof, 1947) com quistos maduros tetranucleados e *E. barreti* (Taliaferro & Holmes, 1924) sem quistos conhecidos (Ponce-Gordo & Martínez-Díaz, 2010).

Apesar de ser considerada comensal em tartarugas, a espécie *Entamoeba invadens* foi associada a um surto epizootico num grupo de 500 tartarugas de pés vermelhos (*Geochelone carbonaria*) recém importadas para os E.U.A. em 1980-1981. Durante um período de cerca de dois meses, 200 animais morreram. Apresentavam sinais inespecíficos como anorexia, apatia e diarreia. Durante a necrópsia encontrou-se espessamento do duodeno com necrose da mucosa e necrose multifocal dispersa no fígado. Histologicamente foram detetados trofozoítos nas lesões intestinais e hepáticas. A avaliação morfológica dos parasitas foi conclusiva na identificação de *E. invadens*. A dispersão dos trofozoítos até ao fígado poderá ter ocorrido através da via ducto biliar comum até à vesícula biliar e daí progredir para o parênquima hepático adjacente ou por via hematogénica chegando ao fígado pela sistema portal (Jacobson & Greiner, 1984).

Em tartarugas e, provavelmente, em lagartos herbívoros *E. invadens* geralmente chega ao intestino, onde enquista. Os quistos são excretados e são a forma infectante para outros hospedeiros. Existem três factores necessários ao enquistamento das amebas: Presença de partículas de polissacarídeos/mucopolissacarídeos que possam ser ingeridos e transformados em glicogénio pelas amebas; presença de factores produzidos por algumas bactérias; presença de factores intrínsecos produzidos pelos trofozoítos que estimulam o enquistamento em massa, dependentes da densidade de trofozoítos e que poderão resultar de um sobrecrescimento dessa população de parasitas. Para que o terceiro requisito aconteça é necessário que os dois primeiros sejam cumpridos anteriormente. A disponibilidade de polissacarídeos é alta em animais com dietas ricas em matéria vegetal, mas muito baixa ou inexistente em animais carnívoros, o que não permite o enquistamento dos trofozoítos. Quando os trofozoítos não têm substrato para a produção de glicogénio, como é o caso das cobras (maioritariamente carnívoras), alimentam-se da secreção mucosa do epitélio intestinal e eventualmente lesionam a camada protetora da mucosa ganhando acesso a tecidos mais internos. À medida que a mucosa se encontra mais exposta fica mais susceptível à ação de bactérias e autodigestão. Esta pode ser a causa das lesões histológicas observadas em serpentes (Meerovitch, 1958).

A dinâmica entre a alimentação das tartarugas e o ciclo de vida das amebas poderá ser a causa do surto referido por Jacobson e Greiner (1984).

No caso do animal no presente estudo, apesar de não se ter identificado a espécie de ameba, foram encontrados quistos, o animal era alimentado regularmente com matéria vegetal e mantido a temperaturas apropriadas, não apresentando sinais clínicos.

4.1.3.2 Filo Ciliophora - *Balantidium testudinis* Chagas, 1911

O género *Balantidium* foi detetado sob a forma de trofozoítos (figura 21) durante a realização de esfregaços diretos a fresco em duas tartarugas de esporas africanas.

Rataj et al. (2011) referiram uma prevalência do género *Balantidium* de 26,2 % (147 animais positivos de 563 testados) em tartarugas, todas pertencentes à família Testudinidae. Nos trabalhos de Papini et al. (2011), Pasmans et al. (2008) e Bernardino (2014) não foram encontradas formas parasitárias deste género em tartarugas.

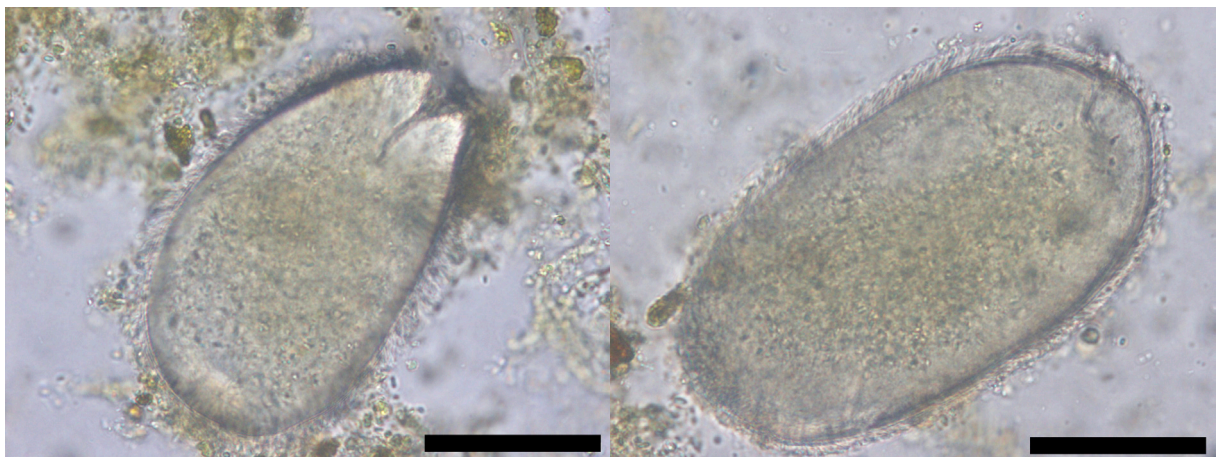
Os trofozoítos encontrados correspondiam a protozoários ciliados de grandes dimensões, móveis e muito ativos. Com forma alongada e cobertos uniformemente por cílios. O citostoma era terminal na porção anterior do trofozoíto e coberto por cílios de maiores dimensões do que aqueles que cobriam o corpo.

Os trofozoítos mediam entre 115.844 e 149.876 µm de eixo maior e entre 68.851 e 78.672 µm de eixo menor. Não foi possível avaliar as características do macronúcleo.

Apesar de as dimensões gerais dos trofozoítos serem superiores às descritas por Geiman e Wichterman (1937) a sua forma é coincidente. Esta é a única espécie aceite atualmente que parasita tartarugas (Ponce-Gordo, comunicação pessoal) e, por isso, optou-se por classificar os trofozoítos encontrados ao nível de espécie, sabendo de antemão que esta classificação poderá ser alterada com a descoberta de novas espécies.

A caracterização morfológica completa dos trofozoítos encontrados teria que ser feita através de colorações específicas com sais de prata. Adicionalmente seria de grande utilidade recorrer a testes moleculares para a sequenciação de rRNA através de PCR que permitiriam estabelecer uma relação filogenética entre os trofozoítos encontrados e os restantes protozoários ciliados (Lynn, 2010). Dada a abrangência do presente estudo, não foi possível realizar tais técnicas. Os protozoários do género *Balantidium* têm um ciclo de vida direto e a sua reprodução é feita através de divisão binária ou conjugação. Produzem quistos que são a forma infectante e entram no hospedeiro por via oral-fecal, através de comida ou água infectada (Scullion & Scullion, 2009). É considerado um parasita comensal do trato gastrointestinal de répteis e bastante prevalente em tartarugas (Greiner & Mader, 2006). Klingenberg (2007b) e Scullion e Scullion (2009) referem que a única espécie associada a casos em que há manifestação de doença é o *B. coli*. Se no primeiro livro não é dada uma referência bibliográfica para esta informação, no segundo trabalho é feita a referência ao livro publicado por Bernard e Upton (1994), "A veterinary guide to the parasites of Reptiles Vol. 1: Protozoa" no qual é referido que este género pode estar na origem de colite e é considerado patogénico em grandes números ou associado com outros parasitas/patógenos (Bernard e Upton, 1994) mas sem nunca referir a espécie *Balantidium coli*. Alterações na flora microbiana causadas por mudanças na dieta, administração de antibióticos e/ou stress podem aumentar a quantidade de ciliados e causar enterite localizada, anorexia e diarreia (Mitchell, 2007). O tratamento em casos de multiplicação excessiva destes protozoários com o aparecimento de sinais clínicos pode ser feito com Metronidazol a 20-50 mg/Kg PO. A dose pode ser repetida a cada 48 horas se necessário (Klingenberg, 2007b). Alternativamente pode administrar-se Metronidazol a 10-20 mg/Kg PO SID durante 7-10 dias (Mitchell, 2007). Nenhum dos animais testados no presente estudo apresentava sinais clínicos.

Figura 21 - Trofozoítos de *Balantidium testudinis* encontrados no exame coprológico de *Centrochelys sulcata*. Escala - 50 µm. Imagens originais.



4.1.3.3 Filo Metamonada

Ao esfregaço direto com soro fisiológico da amostra coprológica de uma tartaruga de esporas africana foram detetados vários trofozoítos de protozoários flagelados.

Pasmans et al. (2008) referiram uma prevalência de 18,6% (233 animais positivos de 1251 testados) de flagelados da ordem Trichomonadida e 3,4% (43 animais positivos de 1251 testados) do género *Hexamita* (Diplomonadida). Nos trabalhos de Papini et al. (2011) e Rataj et al. (2011) não foram detetadas formas deste filo em tartarugas.

Bernardino (2014) encontrou protozoários flagelados em amostras de três tartarugas das 16 testadas.

O ciclo de vida, a influência das condições ambientais e o tratamento deste filo é semelhante ao já descrito para lagartos e serpentes.

Em tartarugas o género *Hexamita* (syn. *Spironucleus*) já foi associado à presença de doença com sinais clínicos que incluíam letargia, anorexia e perda de peso. Este flagelado tem um tropismo particular pelo sistema urinário, mas pode afetar o intestino e por vezes o sistema cardiovascular (Zwart & Truyens, 1975).

Os géneros *Hexamastix* e *Hypotrichomonas* também são possivelmente patogénicos em tartarugas, provocando enterite (Barnard & Upton, 1994).

4.1.3.4 Filo Nematoda - Família Pharyngodonidae

Os nematodes da família Pharyngodonidae são os mais prevalentes em tartarugas, especialmente as que pertencem à família Testudinidae como as incluídas no presente estudo. As amostras das três tartarugas testadas eram positivas a formas parasitárias de Pharyngodonidae.

Rataj et al. (2011) referiram uma prevalência de 81,8% (459 tartarugas positivas de 563 testadas). Pasmans et al. (2008) descrevem uma prevalência mais baixa com 48,2% (603 animais positivos de 1251 testados) e Papini et al. (2011) referiu uma prevalência de 36,7% (21 animais positivos de 58 testados) sendo a menor prevalência de todos os estudos.

Bernardino (2014) referiu uma prevalência de 38,9% (6 animais positivos de 16 testados).

Além de serem bastante frequentes, é comum serem encontrados vários géneros e/ou espécies a parasitar um único animal (Greiner & Mader, 2006). Os géneros *Alaeuris*, *Mehdiella*, *Ortleppnema*, *Tachygonetria*, *Thaparia* e *Thelandros* já foram descritos em tartarugas da família Testudinidae (Bouamer & Morand, 2006).

4.1.3.4.1 Ovos

A identificação de ovos de Pharyngodonidae em tartarugas apresentam as mesmas limitações já referidas para lagartos.

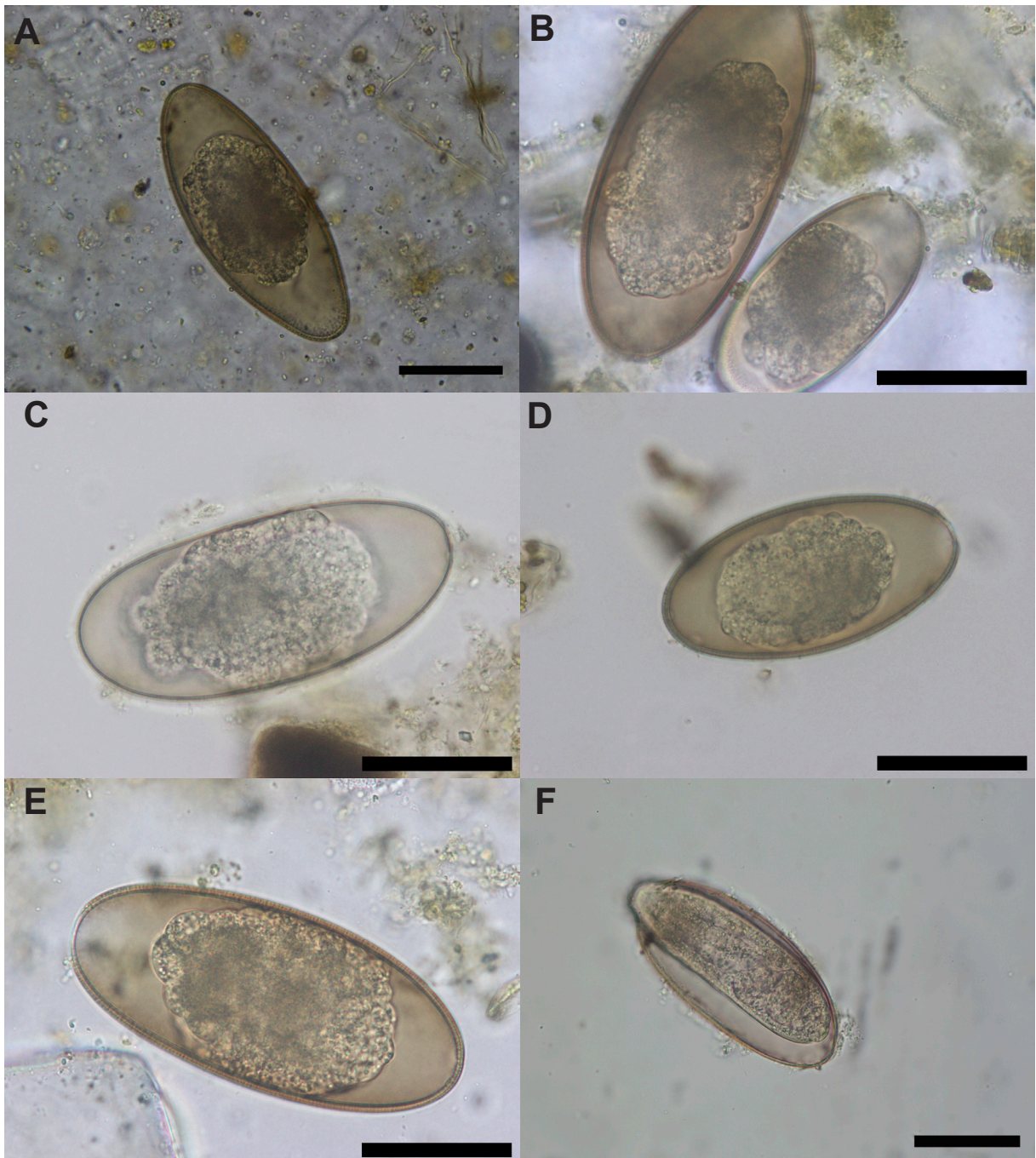
Sabendo que as tartarugas são normalmente parasitadas por mais do que uma espécie de Pharyngodonidae, não se tentou classificar os ovos encontrados.

A maioria tinha uma forma que variava de oval a elipsóide, com alguns mais afunilados nas extremidades (figura 22.A) e com tamanhos muito variáveis (figura 22.B).

Foram observados dois tipos de paredes, uma mais fina (figura 22.C e 22.F) e, mais frequentemente, uma mais grossa (as restantes figuras). Todos os ovos apresentavam um opérculo polar mais ou menos evidente. A maioria foi encontrada num estágio de desenvolvimento de mórula mas nas tartarugas de esporas africanas encontraram-se alguns com uma larva no seu interior (figura 22.F).

As tartarugas de esporas africanas estavam alojadas em conjunto e por isso seria de esperar que a sua população de Pharyngodonidae fosse semelhante já que são parasitas com ciclo de vida direto.

Figura 22 - Ovos de Pharyngodonidae encontrados em amostras de tartarugas de esporas africanas . **Escala** - 50 µm. Imagens originais.



4.1.3.4.2 Parasitas adultos - *Tachygonetria* sp. Wedl, 1862

Foi encontrado um espécime adulto (figura 23) pertencente a este género no esfregaço fresco de uma amostra fecal de tartaruga de esporas africana.

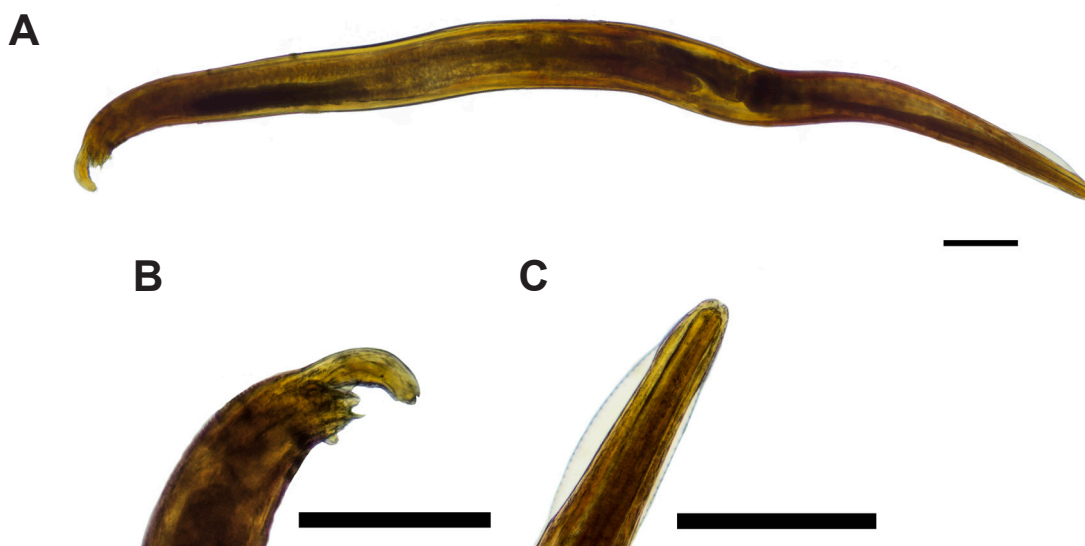
O género *Tachygonetria* é um dos mais comuns em tartarugas terrestres (Testudinidae) e tem uma distribuição global (Bouamer & Morand, 2005).

É um nematode com estriação transversa moderada, a extremidade posterior do macho é marcadamente truncada posteriormente ao último par de papilas caudais que está situado quase lateralmente (Hering-Hagenbeck, Petter & Boomker, 2002).

Medições de *Tachygonetria* sp. parasita de *Centrochelys sulcata* (medidas em μm): Nematode esbranquiçado de pequena/média dimensão. Cutícula moderadamente estriada. Cauda truncada.

♂- **Comprimento total** - 2917,914; **Bulbo esofágico (CxL)** - 96,833 x 117,517; **Comprimento total do esófago** - 881,292; **Cauda** - 120,523.

Figura 23 - Macho de *Tachygonetria* sp. em amostra coprológica de *Centrochelys sulcata*. **A** - vista geral. **B** - Extremidade posterior; **C** - Extremidade anterior. **Escala** - 200 μm . Imagens originais.



Este género foi identificado num caso clínico de uma Tartaruga-de-Herman (*Testudo hermanni*) que apresentava caquexia e desidratação (Silvestre, 2011). O animal do presente estudo não apresentava sinais clínicos.

No mesmo indivíduo foi encontrada uma larva da família Pharyngodonidae (figura 24). Como foi referido para lagartos, a identificação do género e/ou espécie não é possível através de larvas.

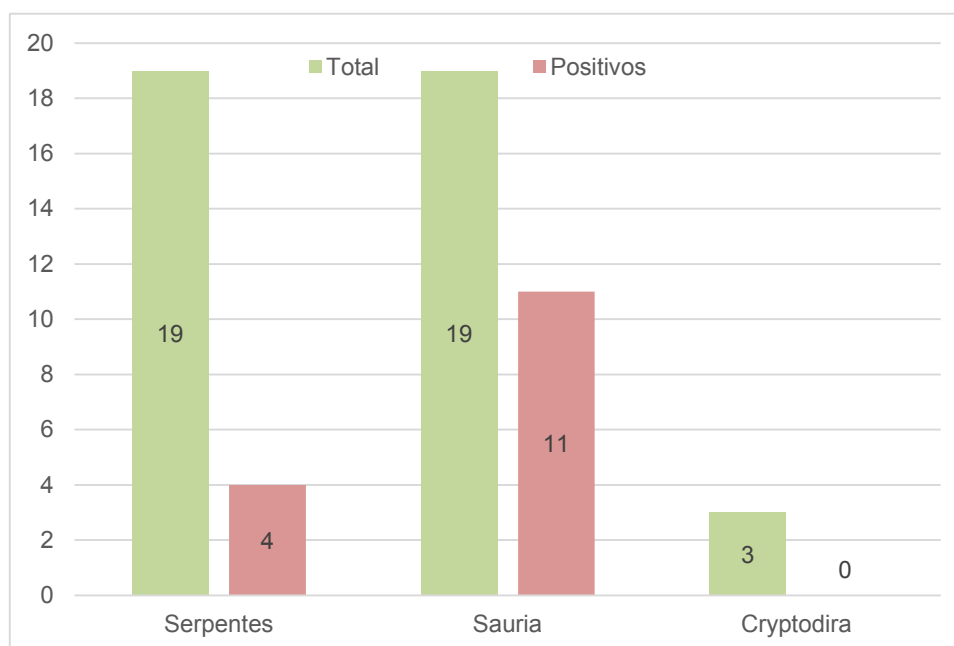
Figura 24 - Larva de Pharyngodonidae encontrada em amostra coprológica de *Centrochelys sulcata*. **Escala** - 50 µm. Imagem original.



4.2 Formas parasitárias encontradas *post mortem*.

Foram efetuadas 41 necrópsias durante o decorrer do presente trabalho e encontraram-se formas parasitárias em 15 animais correspondendo a 36,6% dos répteis testados. O número de animais positivos de cada sub-ordem de répteis está representado no gráfico 2. Não foi calculada a prevalência parasitária média estimada e com intervalo de confiança porque as análises coprológicas efetuadas não foram sistemáticas em todos os animais.

Gráfico 2 - Nº total de animais de cada sub-ordem e respetivo número de animais positivos aos quais foram realizadas as necrópsias.



4.2.1 Sub-ordem Serpentes

Como está demonstrado no gráfico 2 das 19 serpentes às quais foi realizada necrópsia foram detetadas formas parasitárias em 4 animais (20,05%).

Apesar do número de indivíduos ser inferior, a frequência relativa de animais positivos foi superior à prevalência média estimada no rastreio parasitológico.

4.2.1.1 Filo Amoebozoa

Foi detetada uma quantidade elevada de trofozoítos de amebas numa boa arco-íris (*Epicrates cenchria*) após o esfregaço direto com soro fisiológico de material colhido por raspagem do intestino.

Não foi possível identificar o género das amebas através dos trofozoítos e não existia conteúdo intestinal suficiente para executar técnicas de coloração específicas.

O animal fazia parte de um grupo de 13 serpentes recém-chegadas à loja após envio desde Espanha. A viagem prolongou-se por três a cinco dias e não se utilizaram fontes de aquecimento. Todos os indivíduos encontravam-se apáticos e alguns com dispneia. A cobra em questão morreu passado poucas horas da sua chegada.

A espécie do filo Amoebozoa com maior importância e potencial patogénico é *Entamoeba invadens* (Scullion & Scullion, 2009).

Os sinais clínicos associados com amebíase causada por este parasita incluem apatia, anorexia, diarreia catarral e/ou hemorrágica. Menos frequentemente pode surgir vômito, desidratação e polidipsia (Scullion & Scullion, 2009). Destes sinais clínicos, o único visível no animal em questão era a apatia. O curto espaço de tempo decorrido entre a chegada dos animais e a morte deste espécime não permitiu recolher informação sobre outros sinais clínicos que pudessem estar presentes.

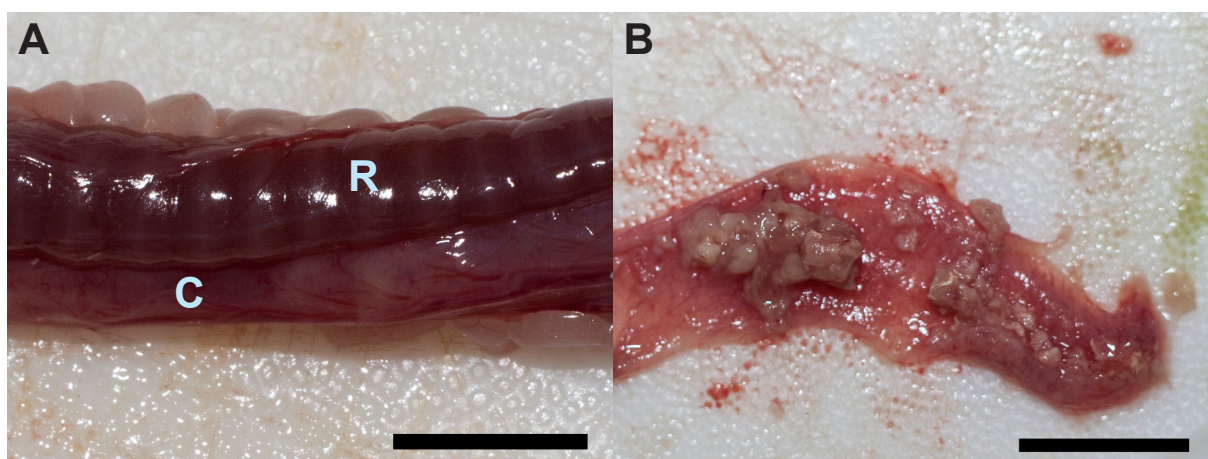
Durante o exame interno macroscópico algumas zonas do intestino apresentavam congestão, hiperémia (figura 25.A) e exsudado fibrinoso no lúmen (figura 25.B). Estas foram as únicas alterações encontradas no trato gastrointestinal e não foram observadas lesões no fígado.

No seu trabalho, Ratcliffe e Geiman (1934) observaram que as lesões macroscópicas mais graves de amebíase localizavam-se no cólon. Ao nível da mucosa e aderente à mesma, observaram a presença de um exsudado sanguinolento, friável e que ocupava parcial ou totalmente o lúmen intestinal. Este material era composto por membranas diféricas ou resíduos de necrose. Por vezes as lesões estendiam-se ao íleo (Ratcliffe & Geiman, 1934).

As lesões no intestino delgado eram menos graves e incluíam úlceras da mucosa rodeadas por zonas hiperémicas e zonas circunscritas de necrose. Em algumas situações todo o intestino se apresentava congestionado e com os vasos sanguíneos ingurgitados. Por vezes encontraram-se aderências da serosa ao rim ou à parede costal (Ratcliffe & Geiman, 1934).

As lesões gástricas são menos comuns e aparecem apenas sob a forma de pequenas úlceras circunscritas. O primeiro órgão extra-intestinal afetado é o fígado e podem aparecer abscessos múltiplos. Os rins podem apresentar petéquias ou sinais de nefrite (Ratcliffe & Geiman, 1934; Hill & Neal, 1954; Scullion & Scullion, 2009).

Figura 25 - Alterações macroscópicas encontradas durante a necrópsia de uma boa arco-íris (*Epicrates cenchria*). A - Congestão do cólon (C) e rim (R). Escala - 0,5 cm. B - Exsudado encontrado no lúmen intestinal. Escala - 1 cm. Imagens originais.



Ao exame microscópico encontraram-se lesões compatíveis com enterite catarral, necrosante e diférica com presença de exsudado fibrinoso no lúmen do intestino (figura 26) e de infiltrados inflamatórios por células mononucleadas na mucosa (figura 27.A), com localização perivascular na submucosa e infiltração leucocitária na mucosa e no lúmen (figura 27.B). Foram encontrados vários aglomerados bacterianos dispersos pelo órgão.

No fígado detetaram-se lesões degenerativas de tipo macrovacuolar e congestão. O rim apresentava congestão, degenerescência macrovacuolar e presença de algum material mucinoso no lúmen dos tubos. No pulmão observou-se atelectasia e congestão.

Figura 26 - Fotocomposição de um corte histológico do intestino da mesma boa arco-íris (*Epicrates cenchria*). É possível observar a acumulação de exsudado fibrinoso no centro do lúmen. **Escala** - 1000 µm. Imagem original.

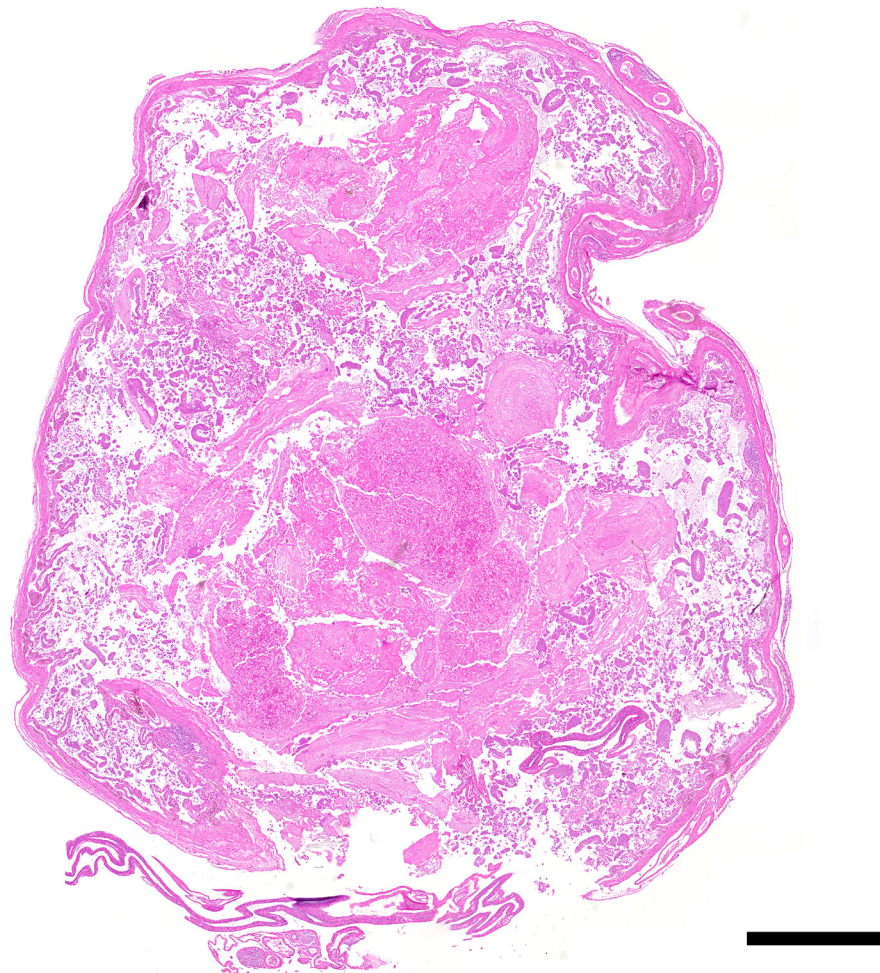
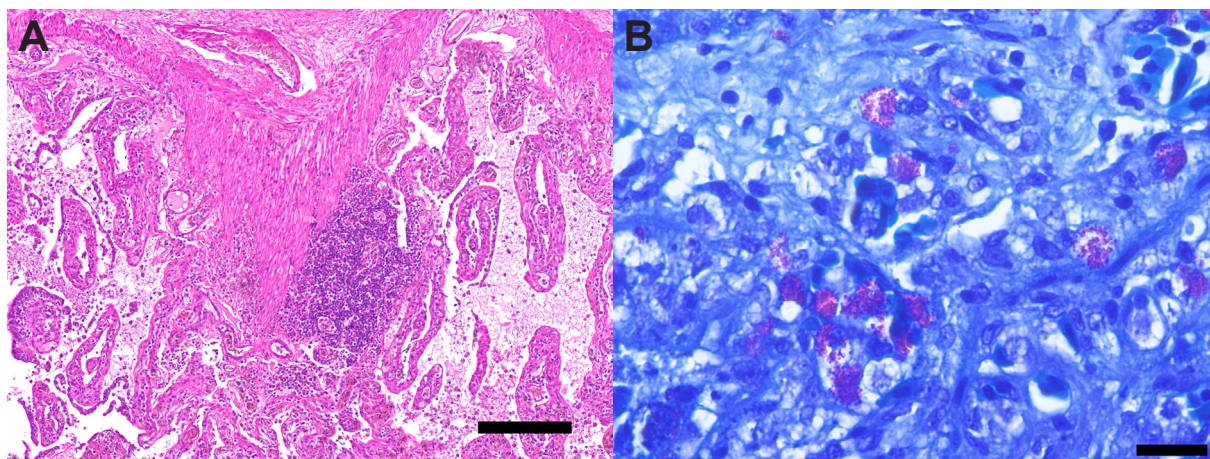


Figura 27 - Células inflamatórias na mucosa do intestino da mesma boa arco-íris (*Epicrates cenchria*). **A** - infiltrado de células mononucleadas. H&E. **Escala** - 200 µm. **B** - Heterófilos e/ou eosinófilos. GIEMSA. **Escala** - 20 µm. Imagens originais.



Microscopicamente as lesões de *Entamoeba invadens* caracterizam-se por uma extensa necrose superficial da mucosa do cólon podendo estender-se a camadas mais profundas.

As lesões de necrose no intestino delgado e estômago são mais circunscritas e encontram-se algumas úlceras na mucosa sendo mais raras no último. O infiltrado inflamatório leucocitário é mais evidente em zonas de lesões recentes do que em zonas de alterações mais antigas. No fígado as lesões microscópicas são caracterizadas pelo aparecimento de abscessos e de necrose extensa. Quer estas lesões envolvam apenas um ou vários lobos hepáticos, as lesões mais graves encontram-se na área centrolobular. Associados a todas estas lesões é possível encontrar trofozoítos do parasita. Nas lesões da parede intestinal as camadas mais profundas são as mais afetadas podendo haver invasão dos vasos linfáticos (Ratcliffe & Geiman, 1934; Hill & Neal, 1954; Jacobson, 2007; Scullion & Scullion, 2009).

Apesar de as lesões de enterite serem compatíveis com as alterações provocadas por *Entamoeba invadens* não foram encontrados trofozoítos nas lesões nem noutro órgão. Desta forma não foi possível determinar se as amebas foram causa das lesões encontradas, que permitiria uma infeção bacteriana secundária.

A informação sobre o ciclo de vida e tratamento foi abordada nos pontos 4.1.2.1 e 4.1.3.1.

4.2.1.2 Filo Apicomplexa - *Cryptosporidium* sp.

Foram efetuados esfregaços fecais/conteúdo gástrico corados com a técnica de Ziehl-Neelsen a todos os animais que apresentassem regurgitação pós-prandial.

Colheram-se amostras de quatro cobras do milho, um adulto e três juvenis, e uma cobra do leite Hondurenha (*Lampropeltis triangulum hondurensis*). A cobra do milho adulta e a cobra do leite Hondurenha apresentavam perda de peso progressiva e o proprietário da loja decidiu proceder à eutanásia dos animais. As três cobras do milho juvenis regurgitaram em duas ocasiões sucessivas e morreram no dia seguinte à segunda regurgitação.

Os esfregaços da cobra do milho adulta, de uma juvenil e da cobra do leite Hondurenha foram positivos, apresentando estruturas de forma circular coradas de rosa-carmim em fundo verde compatíveis com oocistos (figura 28).

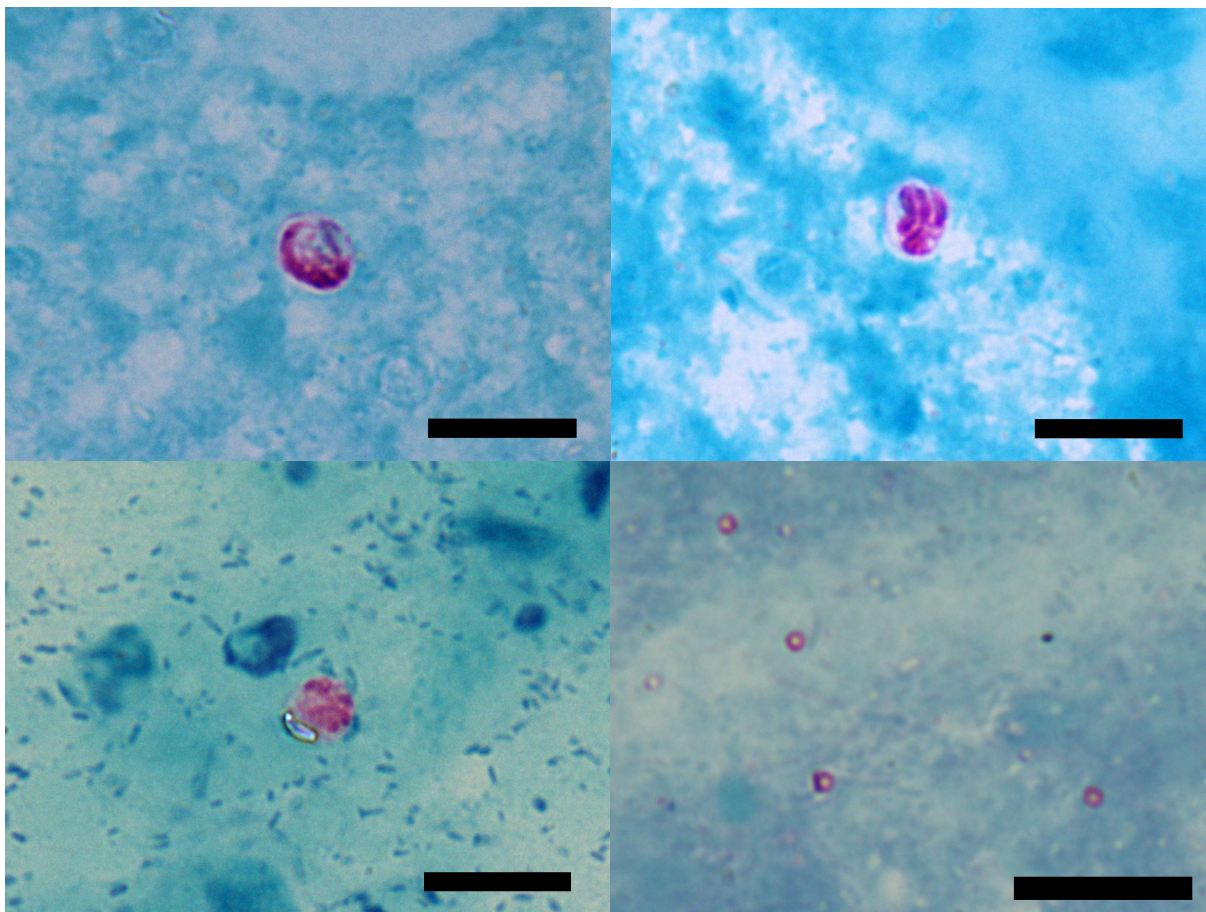
Atualmente são aceites pela maioria dos autores duas espécies de *Cryptosporidium* como verdadeiros parasitas em serpentes: *Cryptosporidium serpentis* e *Cryptosporidium saurophilum*. Ao contrário do que acontece em mamíferos, por exemplo, em que as infeções em indivíduos imunocompetentes são auto-limitantes, em ofídios a infeção por *Cryptosporidium* spp. é um processo insidioso com consequências graves que podem resultar na morte do animal (Xiao et al., 2004b).

Cryptosporidium serpentis é a espécie mais prevalente em cobras (Xiao et al., 2004b; Pedraza-Díaz, Ortega-Mora, Carrión, Navarro & Gómez-Bautista, 2009). Definida por Levine (1980) somente com base no trabalho de Brownstein et al. (1977) esta espécie está associada a regurgitação pós-prandial, perda progressiva de peso e, em casos graves, a uma distensão na zona média do corpo provocado por uma hipertrofia gástrica. O processo é, na maioria dos casos reportados, exclusivamente gástrico e histologicamente as lesões encontradas são de gastrite hipertrófica com atrofia das células granulosas, alterações quísticas das glândulas gástricas e necrose focal da mucosa (Brownstein et al., 1977).

Cryptosporidium saurophilum é uma espécie descrita por Koudela e Modrý (1998) que infecta o intestino e a cloaca de sáurios. Foi descrita posteriormente em serpentes.

É geralmente assintomática em lagartos, havendo no entanto alguns casos reportados de doença em geckos leopardo. Em serpentes o local de infecção desta espécie ainda não está definido podendo não ser restrito ao intestino (Xiao et al., 2004b; Xiao, Fayer, Ryan & Upton, 2004a; Pedraza-Díaz et al., 2009). Além destas duas espécies podem por vezes ser detetados, nas fezes de répteis, oocistos de espécies que parasitam as suas presas (principalmente roedores) (Xiao et al., 2004b).

Figura 28 - Oocistos de possível *Cryptosporidium* spp. em esfregaços fecais corados com a técnica de Ziehl-Neelsen. **A e B**- Amostra de *Pantherophis guttatus* adulta. **C** - Amostra de *Pantherophis guttatus* juvenil. **D** - Amostra de *Lampropeltis triangulum hondurensis*. **Escala** - 10 µm. Imagens originais.



Os três animais apresentavam particularidades quer no tamanho dos oocistos quer nas lesões histopatológicas e serão discutidos separadamente.

Cobra do milho adulta:

Medições dos oocistos (n=20) (média (min-max) µm):

5,566 x 4,838 (4,629-6,688 x 4,296-5,724);

Rácio c/l - 1,154 (1,028-1,329).

Os oocistos encontrados têm um tamanho aproximado aos oocistos de *C. serpentis* [6,2 x 5,3 (5,6-6,6 x 4,8-5,6)], *C. parvum* [5,2 x 4,6 (4,8-5,6 x 4,2-4,8)] descritos por Tilley, Upton e Freed (1990) e *C. Saurophilum* (5,0 x 4,7 (4,4-5,6 x 4,2-5,2) descritos por Koudela e Modrý (1998).

São consideravelmente menores que os oocistos de *C. muris* [7,4 x 5,6 (6,6-7,9 x 5,3-6,5)] (Upton e Current, 1995) e maiores do que *C. tyzzeri syn. Cryptosporidium "mouse type 1"* (4,64 x 4,19 (4,59-4,69 x 4,13-4,25)) (Ren et al., 2012).

Apesar de não ter sido possível encontrar uma espécie de *Cryptosporidium* com características morfológicas similares que permitissem uma identificação definitiva, não se podem excluir as espécies com um tamanho aproximado. Ao contrário do que aconteceu no presente estudo, em que as medições foram efetuadas em oocistos encontrados num esfregaço fecal corado com Ziehl-Neelsen, nos restantes estudos mediram-se oocistos a fresco.

Ao exame externo, durante a necrópsia, a serpente apresentava caquexia e as rugas longitudinais do estômago estavam moderadamente espessadas com presença de muco (Figura 29.A). Estas alterações no estômago são compatíveis com as encontradas em infecções por *C. serpentis* (Brownstein et al., 1977). Além destas alterações, o intestino apresentava congestão e o rim uma lesão focal de calcificação.

Microscopicamente observaram-se lesões de hiperplasia mucípara das glândulas da mucosa que se estendiam a partes mais profundas das glândulas gástricas, com infiltrado inflamatório de células mononucleadas na *lamina propria*, submucosa e presença de muco no epitélio (figura 30).

Estas lesões são similares às lesões menos graves descritas por Brownstein et al. (1977). No entanto, ao contrário de Brownstein et al., não se encontraram formas parasitárias no epitélio gástrico.

Foram detetadas estruturas suspeitas (figura 29.B), especialmente no interior das glândulas gástricas, com tamanho aproximado aos oocistos de *Cryptosporidium* encontrados nas fezes mas não foi possível confirmar com certeza se seriam parasitas. As espécies de *Cryptosporidium* encontram-se intimamente ligadas às microvilosidades do epitélio gástrico através de um vacúolo parasitóforo que consiste numa dupla membrana contígua à membrana plasmática do hospedeiro (Brownstein et al., 1977). Este animal apresentava ainda lesões de enterite linfoplasmocitária, pneumonia exsudativa com alveolite serofibrinosa, calcificação nos túbulos renais, degenerescência macrovacuolar e colestase hepáticas.

Tendo em conta a sintomatologia, as lesões gástricas macro e microscópicas, a infeção por *Cryptosporidium* (provavelmente *C. serpentis*) como agente etiológico é possível.

Figura 29 - Estômago da cobra do milho adulta. **A** - Hipertrofia e presença de muco detetadas durante a necrópsia. **B** - Estruturas suspeitas de *Cryptosporidium* sp. encontradas em preparação histológica corada com PAS. **Escala** - 20 μ m. Imagens originais.

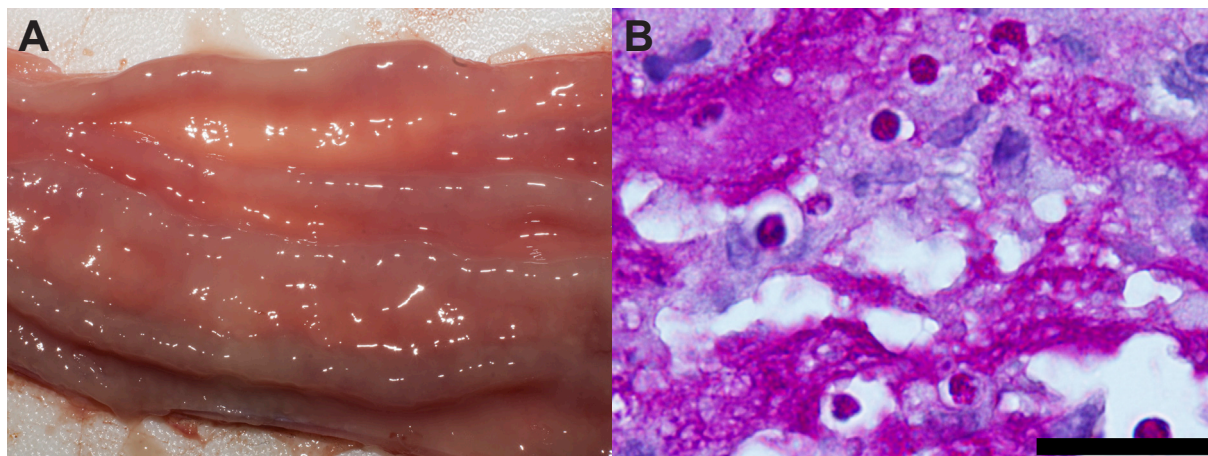
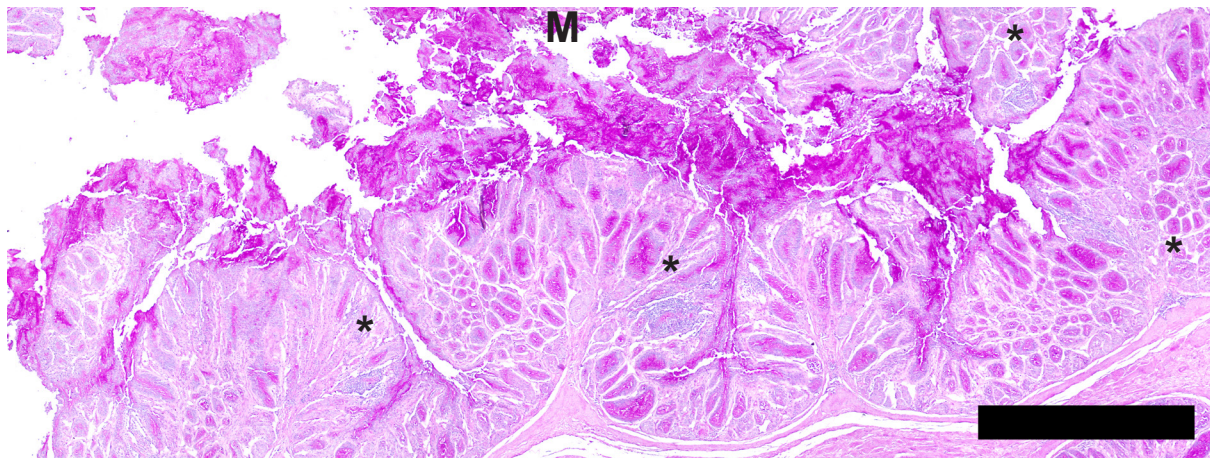


Figura 30 - Lesões microscópicas observadas no estômago da cobra do milho adulta em preparação histológica corada com PAS. De notar a acumulação de muco (M) no lúmen e algumas zonas com infiltrado inflamatório por células mononucleadas (*). **Escala** - 1000 µm. Imagem original.



Cobra do milho juvenil:

Medição dos oocistos (n=5) (média (min-max) µm): 4,568 x 3,983 (4,312-4,894 x 3,752-4,388;)

Rácio c/l - 1,147 (1,149-1,115).

Os oocistos encontrados têm um tamanho inferior a todas as espécie referidas anteriormente tendo dimensões mais aproximadas às de *C. tyzzeri syn. Cryptosporidium "mouse type 1"* (4,64 x 4,19 (4,59-4,69 x 4,13-4,25) (Ren et al., 2012).

Durante a necrópsia não foram detetadas alterações macroscópicas no aparelho gastrointestinal. A única lesão visível era a presença de acumulação de uratos visível no rim esquerdo.

Microscopicamente foram observadas lesões discretas de gastrite necrosante em algumas zonas do órgão, enterite necrosante (figura 31) com infiltrado de células mononucleadas (figura 32.A) e heterófilos, muco (figura 32.B) e congestão do intestino (figura 31), lesões de degenerescência macrovacuolar e congestão moderada no fígado e nefrite focal necrótica.

Figura 31 - Lesões microscópicas encontradas no intestino da cobra do milho juvenil em preparações histológicas coradas com H&E. **Escala** - 200 µm. Imagens originais.

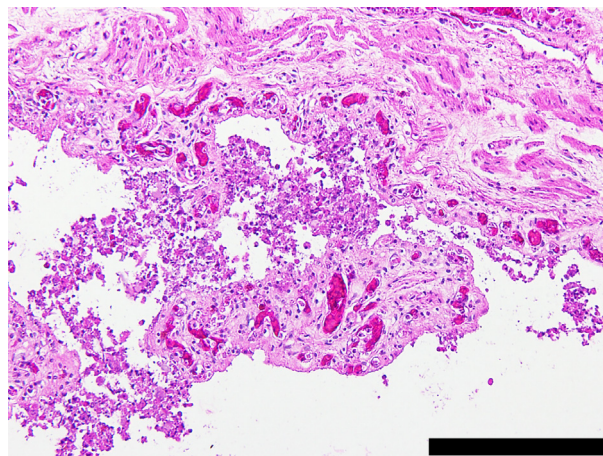
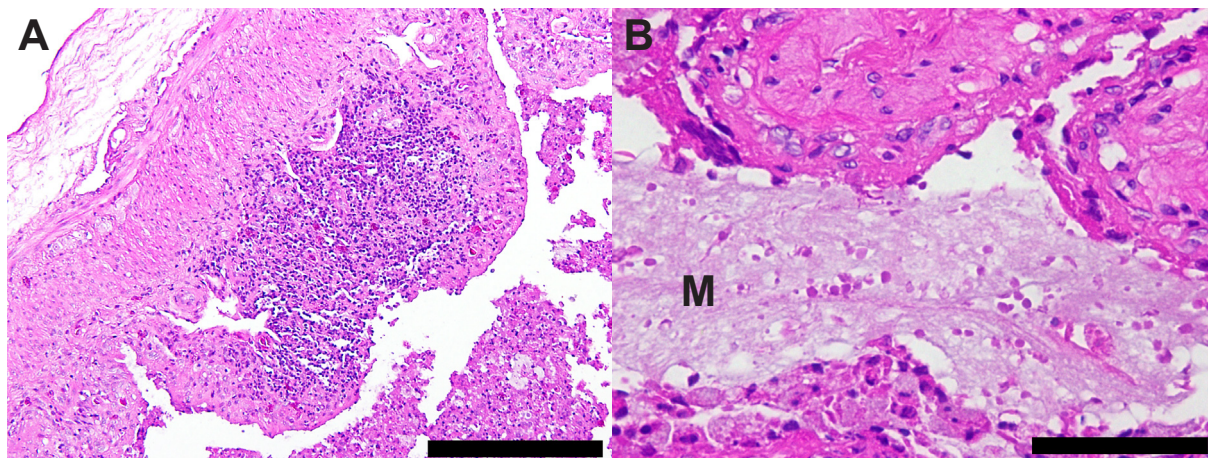


Figura 32 - Alterações microscópicas encontradas no intestino de cobra do milho juvenil em preparações histológicas coradas com H&E. **A** - Infiltrado inflamatório por células mononucleadas na mucosa. **Escala** - 200 μ m. **B** - Muco (M) presente no lúmen intestinal. **Escala** - 50 μ m. Imagens originais.



Os animais afetados por criptosporidiose são geralmente adultos (Jacobson, 2007), no entanto Brower e Cranfield (2001) descreveram um surto de criptosporidiose em cobras juvenis. Nesse caso todos os animais morreram subitamente e, durante a necrópsia, não se observaram alterações macroscópicas no estômago e apenas uma das oito cobras apresentava lesões de enterite. Microscopicamente as lesões descritas foram atrofia das vilosidades intestinais, necrose epitelial e inflamação da *lamina propria* predominantemente por heterófilos e ocasionalmente linfócitos e plasmócitos. Todas as serpentes tinham protozoários com 2-3 μ m distribuído entre o intestino delgado e início do cólon (Brower e Cranfield, 2001).

Apesar de ambos os casos apresentarem algumas semelhanças, como a idade, ausência de perda de peso e lesões mais graves no intestino, não foram encontradas formas parasitárias. Como no caso anterior não é possível confirmar nem excluir o papel dos oocistos encontrados no esfregaço fecal corado e o fator etiológico.

Cobra do leite Hondurenha:

Medição dos oocistos (média (min-max) μ m) (n=20): 1,274 x 1,116 (1,068-1,573 x 0,911-1,298);

Rácio c/l - 1,142 (1,172-1,212)

Os presumíveis oocistos encontrados no esfregaço fecal desta serpente apresentam dimensões muito inferiores a todas as espécies de *Cryptosporidium* descritas até à data.

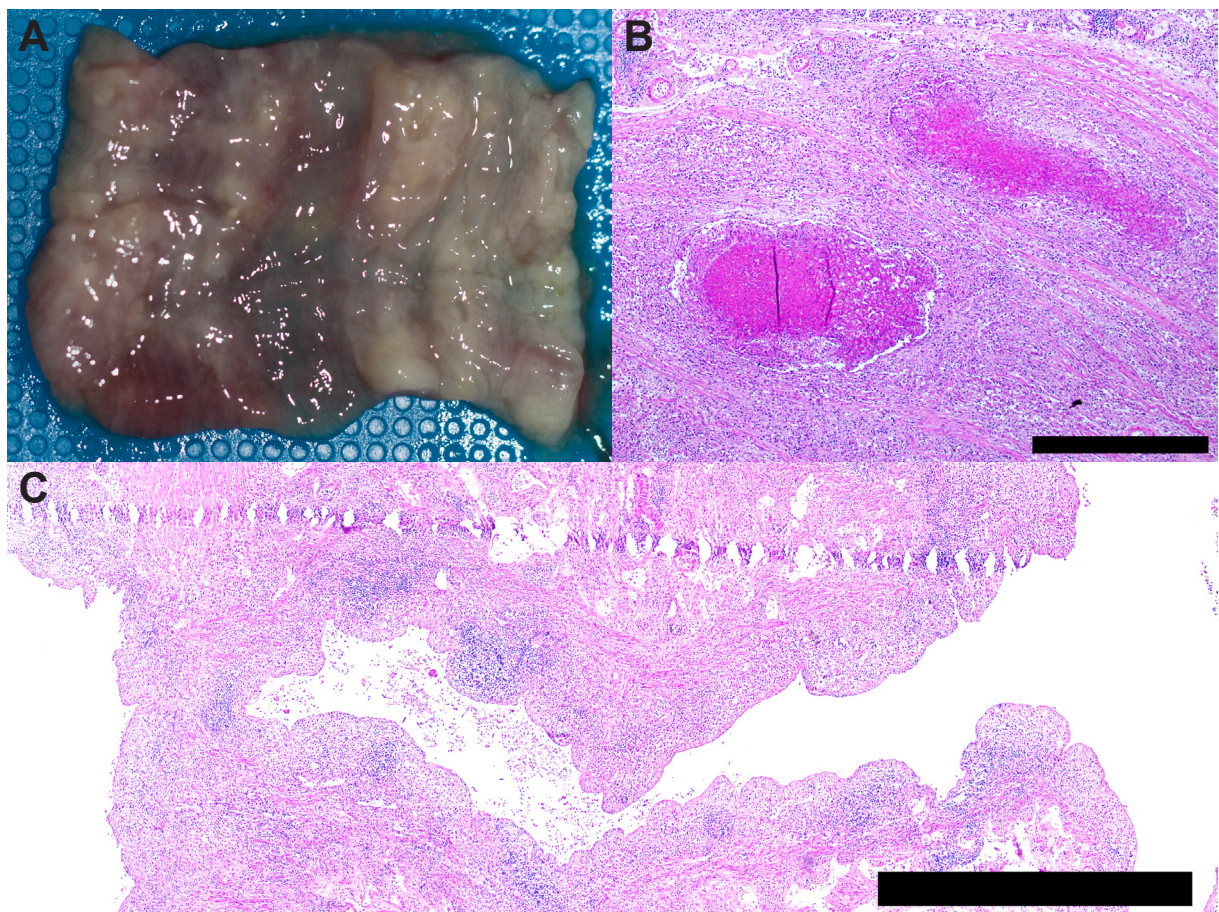
Apesar dos sinais clínicos serem compatíveis com a infecção por este género de coccídia e da coloração de Ziehl-Neelsen marcar positivamente estes oocistos, a diferença de tamanho não permite a classificação inequívoca do género *Cryptosporidium*. Apesar da identificação correta não ter sido possível, estes oocistos foram incluídos nesta secção devido aos sinais clínicos apresentados e ao resultado positivo pela coloração de Ziehl-Neelsen. Durante a necrópsia observou-se que a cobra apresentava caquexia grave, as rugas longitudinais do estômago apresentavam-se espessadas e havia presença de muco e zonas com congestão (figura 33.A), também se observou congestão e algum muco no intestino.

Microscopicamente identificou-se uma gastrite linfoplasmocitária transmural muito grave, com aparente perda da definição do tecido glandular (figura 33.C). Encontraram-se granulomas de dimensões variadas na submucosa e muscular (figura 33.B).

No intestino observaram-se lesões graves de enterite linfoplasmocitária transmural, de enterite catarral e de enterite necrosante. Observaram-se igualmente granulomas de dimensões variadas na submucosa e córion da mucosa com presença de células gigantes e cápsula de tecido fibroso. O pulmão apresentava alveolite serofibrinosa e o rim edema intersticial.

Não existem casos de infeção por *Cryptosporidium* na literatura em que o estômago e o intestino estejam igualmente afetados de forma grave. À semelhança das duas serpentes mencionadas anteriormente não foram encontradas formas parasitárias em nenhum dos órgãos durante o exame microscópico. O facto de ter sido colhido apenas um fragmento por órgão e de as duas serpentes adultas terem sido congeladas previamente à necropsia pode ter contribuído para a não detecção do parasita.

Figura 33 - Alterações gástricas encontradas numa cobra do leite Hondurenha. **A** - Lesões macroscópicas encontradas durante a necrópsia. **B** - Granulomas encontrados na submucosa em preparação histológica corada com H&E. **Escala** - 500 μ m. **C** - Estômago em preparação histológica corada com H&E. De notar o infiltrado presente desde a superfície até à camada muscular. **Escala** - 1000 μ m. Imagens originais.



4.2.1.3 Filo Metamonada

A mesma boa arco-íris, além dos trofozoítos do filo Amoebozoa, apresentava igualmente grande número de trofozoítos do filo Metamonada não identificados.

Grande parte da informação disponível na literatura das alterações fisiopatológicas associadas à infecção por protozoários flagelados é baseada nos trabalhos de Zwart, Teunis e Cornelissen (1984) sobre monocercomoníase e de Jakob e Wesemeier (1995) sobre doença provocada por flagelados de género desconhecido.

Como já foi referido para o filo Amoebozoa, não foi possível avaliar os sinais clínicos do animal em questão, além da apatia.

Este sinal clínico apesar de ser compatível com a infecção por flagelados é inespecífico, como a maioria daqueles associados a esta doença (perda de tonicidade muscular, dor abdominal, anorexia e por vezes diarreia catarral) (Zwart et al., 1984; Scullion e Scullion, 2009).

Os achados macroscópicos no intestino descritos anteriormente (enterite catarral, congestão e hiperémia) são compatíveis com as lesões descritas por Zwart et al. (1984).

Microscopicamente também se encontraram lesões compatíveis com as descritas em ambos os trabalhos, como descamação epitelial com acumulação de exsudado fibrinoso e restos celulares no lúmen do epitélio (figura 26), presença de células inflamatórias no lúmen, na *lamina propria* e submucosa (figura 27.A e B), resultando numa enterite diftérica e mucopurulenta.

A infecção por protozoários flagelados e por *Entamoeba* sp. resultam em sinais clínicos e lesões histopatológicas semelhantes e podem infetar simultaneamente o mesmo animal, sendo que as amebas afetam principalmente o cólon (Jakob e Wesemeier, 1995).

Ao contrário dos estudos e, à semelhança do que aconteceu para as amebas, não se detetaram formas parasitárias durante o exame histopatológico.

Para informação sobre o ciclo de vida, géneros com maior importância, diagnóstico e tratamento ver ponto 4.1.1.2.

Em conclusão, ambos parasitas proliferam em condições de stress para o hospedeiro ou em resultado de infecções bacterianas ou víricas. Tendo em conta o histórico do animal (recém chegado de uma viagem em condições não ideais) existe a possibilidade de ter ocorrido um desequilíbrio do número de um ou dos dois parasitas resultando em doença. No entanto a não detecção de parasitas nos tecidos afetados não permite estabelecer esta relação de forma definitiva.

4.2.1.4 Parasitas não gastrointestinais

Apesar da pesquisa de parasitas sanguíneos e ectoparasitas não fazer parte do objectivo do presente trabalho, tendo em conta que só foi encontrado um parasita de cada um destes grupos e no mesmo animal serão descritos nos próximos pontos.

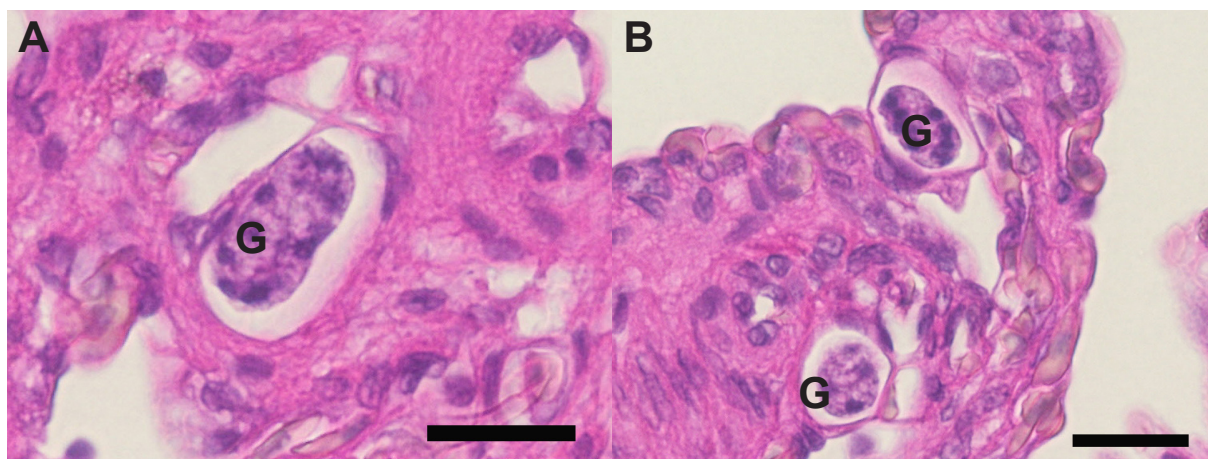
4.2.1.4.1 Filo Apicomplexa - *Hepatozoon* sp. Miller, 1908 (Hepatozoidae)

Durante a observação das lâminas de histopatologia de uma boa arco-íris, referida no ponto 4.2.1.1, foram encontrados gamontes de *Hepatozoon* sp. no pulmão (figura 34).

O parasita foi classificado neste gênero seguindo as indicações de Sidall (1995) que considerava que todas as hemogregarinas encontradas em répteis, sem possibilidade de avaliar o seu ciclo de vida completo, deveriam ser colocadas preventivamente no gênero *Hepatozoon*.

Sem conhecimento do seu ciclo de vida completo ou a sua análise genética não é possível identificar a espécie.

Figura 34 - A e B - Gamontes (G) de *Hepatozoon* sp. em preparação histológica do pulmão de uma boa arco-íris corada com H&E. **Escala** - 20µm . Imagens originais.



Hepatozoon é um parasita sanguíneo com um ciclo de vida heteroxeno em que é necessário um artrópode hematófago, onde ocorre a esporogonia e a formação dos oocistos, e um hospedeiro vertebrado, onde decorre a merogonia e o desenvolvimento de gamontes. Os últimos são a forma infetante para o artrópode. Os vertebrados infetam-se através da ingestão dos invertebrados.

No caso particular das serpentes, não tendo sido provada a transmissão do parasita através da picada do animal invertebrado, a infecção poderá ocorrer através da ingestão de um hospedeiro vertebrado infetado ou da ingestão acidental de um artrópode hematófago (estes não fazem parte da dieta da grande maioria dos ofídios) (Smith, 1996; Telford, 2009).

A formação de gamontes em serpentes acontece frequentemente no fígado ou pulmão. Por vezes pode envolver uma pequena reação leucocitária mas não é considerado patogénico (Jacobson, 2007).

O animal em questão estava também parasitado com ácaros do género *Ophionyssus* (ver ponto 4.2.1.4), um género de artrópodes associado à transmissão de *Hepatozoon* sp. em lagartos (Ramanandan Shanavas & Ramachandran, 1990), apesar de improvável, não poderá ser eliminada a possibilidade de ser um vetor neste caso.

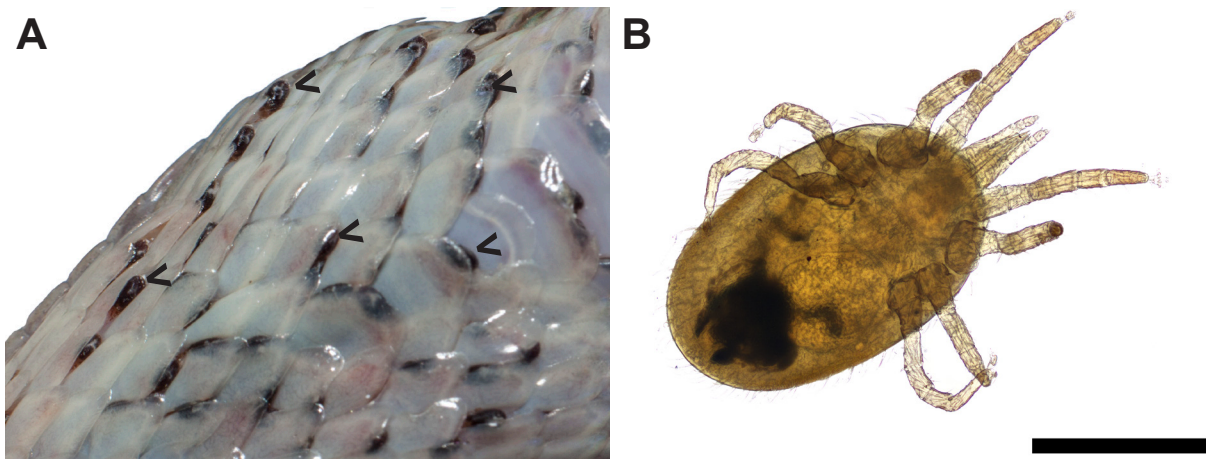
Considerando a fraca reação inflamatória associada aos gamontes/esquizontes no pulmão não parece provável que este parasita tenha influenciado de maneira significativa o quadro clínico do animal e o seu desfecho.

4.2.1.4.2 Filo Artropoda - *Ophionyssus natricis* Gervais, 1844 (Macronyssidae)

Durante a necrópsia, além do que já foi referido, encontrou-se um elevado número de ácaros que pertenciam à espécie *Ophionyssus natricis* (figura 35) que é o ácaro mais comum encontrado em serpentes (Fitzgerald & Vera, 2006).

Os machos medem cerca de 500 µm de comprimento por 200-250 µm e podem medir 300-350 µm de largura depois de efetuarem uma refeição (DeNardo & Wosniak, 1997).

Figura 35 - Ácaros (<) *Ophionyssus natricis* encontrados durante a necrópsia de uma Boa-Arco-Íris (*Epicrates cenchria*). **A** - Localizados zona intermandibular. **B** - Ácaro observado ao microscópio. Montagem com Lactofenol. **Escala** - 400 µm. Imagens originais.



As fêmeas não alimentadas medem cerca de 600 µm de comprimento por 300-400 µm de largura. Quando totalmente engorgitadas após uma refeição podem chegar a ter 1300 µm. É nesta altura que são mais facilmente detectáveis sendo globosas e aparecendo de cor vermelho-escuro ou preto (DeNardo & Wosniak, 1997)

O ciclo de vida demora entre 7-16 dias a completar-se e um fêmea pode depositar até 80 ovos o que contribui para infecções por um grande número de ácaros. Os ovos são depositados no ambiente, preferencialmente em ranhuras do próprio terrário ou esconderijos. Um ovo dá origem a uma larva que se transforma sucessivamente numa protoninfa, deutoninfa e num adulto. Apenas as protoninfas e os adultos são hematófagos. Os ovos fertilizados dão origem a fêmeas, enquanto os machos são obtidos por partenogénese. Geralmente os ácaros encontram-se na pele menos queratinizada entre as escamas tendo preferência pela zona inter-mandibular e entre a membrana ocular e as escamas perioculares.

A picada pode originar dermatite e prurido que é evidente pelo constante arrastar do corpo pelas superfícies laterais do terrário ou a submersão em água para aliviar o desconforto. Infecções graves podem causar letargia, irritabilidade, anemia, desidratação, edema da conjuntiva ocular e resultar na morte do animal. Durante o exame histopatológico podem ser encontradas células inflamatórias (heterófilos e linfócitos) no local da picada (DeNardo & Wosniak, 1997; Wosniak & DeNardo, 2000; Fitzgerald & Vera, 2006; Jacobson, 2007).

Além da sua ação espoliadora direta, estes ácaros podem ser vectores da bactéria *Aeromonas hydrophilus* que apresenta estirpes causadoras de septicémia hemorrágica em serpentes (Camin, 1948).

Adicionalmente, este ácaro tem algum potencial zoonótico, podendo causar lesões cutâneas vesículo-bulhosas (Schultz, 1975) ou papulares (Amanatfard, Youssefi e Barimani, 2014) em humanos.

Como já foi referido o animal em questão morreu no dia em que chegou. Foi possível observar algum eritema na região intermandibular (figura 35.A), sendo esta a zona que apresentava maior carga parasitária e não se detetaram outros sinais clínicos (p.ex. anemia).

4.2.2 Sub-ordem Sauria

Dos 19 lagartos aos quais foram efetuadas necrópsias em 11 (57,89%) detetaram-se formas parasitárias. A frequência relativa de formas parasitárias é inferior à prevalência média estimada no rastreio parasitológico. O fato de não ter sido possível colher amostra coprológica de todos os animais pode ter contribuído para esta diferença.

4.2.2.1 Filo Apicomplexa - *Isospora amphiboluri* Cannon, 1967

Ao exame coprológico de flutuação, foram positivos para oocistos de *I. amphiboluri* um dragão barbudo e um lagarto de gola. No caso de *C. kingii* os oocistos desta espécie já tinham sido detetados em vida (ver ponto 4.1.2.2.1). Os oocistos encontrados no dragão barbudo também apresentavam características morfológicas coincidentes com as descritas.

Ambos os animais eram juvenis e alimentados maioritariamente com larvas de tenébrio e esporadicamente com grilos. Ao dragão barbudo eram fornecidos vegetais como complemento alimentar. Ambos apresentavam um condição corporal diminuída.

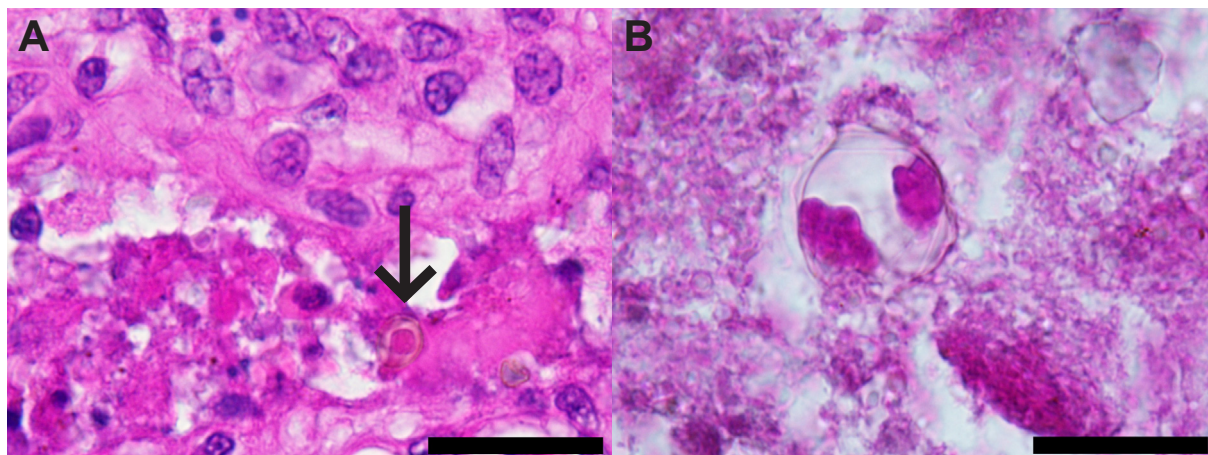
Durante a necrópsia não foram encontradas lesões externas e internas macroscópicas dignas de registo excepto no caso do lagarto de gola em que o intestino apresentava congestão.

Microscopicamente ambos apresentavam enterite catarral e lesões de degenerescência macrovacuolar no fígado. O intestino do lagarto de gola apresentava também necrose e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

As lesões provocadas pela infeção por *I. amphiboluri* incluem a vacuolização dos enterócitos com presença de uma inflamação desigual ao longo do epitélio intestinal. As células inflamatórias predominantes são as mononucleadas com menor número de heterófilos e eosinófilos. O resultado deste processo é a perda de organização dos enterócitos o que provoca um encurtamento e, por vezes, a fusão das vilosidades intestinais (Walden, 2009).

Além da presença das lesões no intestino foram encontradas formas de *I. amphiboluri*. No caso do lagarto de gola encontraram-se oocistos imaturos não esporulados (figura 36.A) e encontraram-se oocistos esporulados no interior do lúmen no dragão barbudo (figura 36.B).

Figura 36 - Formas parasitárias de *I. amphiboluri* encontradas em preparações histológicas do intestino coradas com H&E. **A** - Oocisto imaturo encontrado em lagarto de gola. **B** - Oocisto esporulado encontrado em dragão barbudo. **Escala** - 20 µm. Imagens originais.



4.2.2.2 Filo Nematoda

4.2.2.2.1 Família Atractidae - *Cyrtosomum (Atractis) penneri* Gambino, 1957

Durante a necropsia de um lagarto cornudo foram recolhidos vários nematodes (figura 37). Eram parasitas difíceis de detetar macroscopicamente, aparecendo como pequenos nematodes esbranquiçados entre o material arenoso contido no cólon.

O esófago dividido em duas partes (figura 37.A), o facto de os machos apresentarem espículas lanceoladas e desiguais (figura 37.B) e não apresentarem governáculo são características do género (Ver ponto 4.1.2.5.1). Dado que as espécies *C. readi* e *C. heynemani* foram consideradas sinónimos de *C. penneri*, esta é a única espécie com estas características descrita neste hospedeiro (Burseley & Flanagan, 2002).

Os parasitas desta família apresentam um ciclo de vida direto com a particularidade de que as larvas eclodem e desenvolvem-se até ao 3º estágio dentro do útero da fêmea. Esta L3 é autoinfectante para o hospedeiro (Anderson, 2000). Apesar do mecanismo de autoinfeção ser bem conhecido, a forma como acontece a transmissão entre hospedeiros merece mais discussão. Num trabalho realizado por Langford, Willobee e Isidoro (2013) foi sugerido que a transmissão de *Cyrtosomum (Atractis) penneri* pode ocorrer durante a cópula dos hospedeiros (Langford, Willobee & Isidoro, 2013).

Descrição dos espécimes encontrados durante este estudo (média (min-max) µm):

♀ adultas (n=3) - **Comprimento** - 1896,755 (1677,184-2165,202);

Largura ao nível do bulbo esofágico - 98,696 (88,029-115,497);

Bulbo esofágico (cxl) - 70,049 x 66,412 (65,773-74,544 x 57,407-78,573);

Esófago - 344,779 (293,517-397,500); **Parte muscular anterior do esófago** - 258,029 (220,092-292,959); **Parte glandular posterior do esófago** - 86,750 (73,425-104,541);

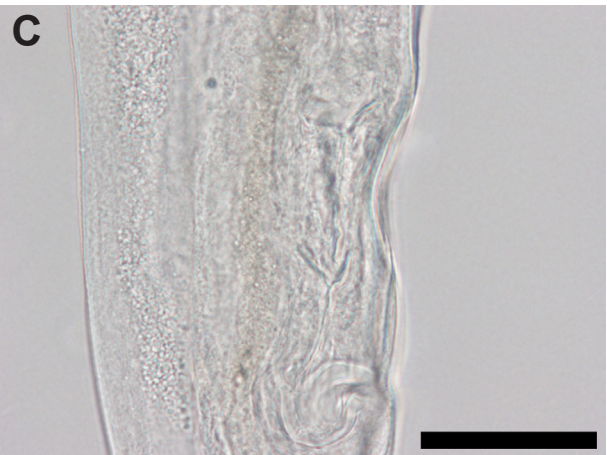
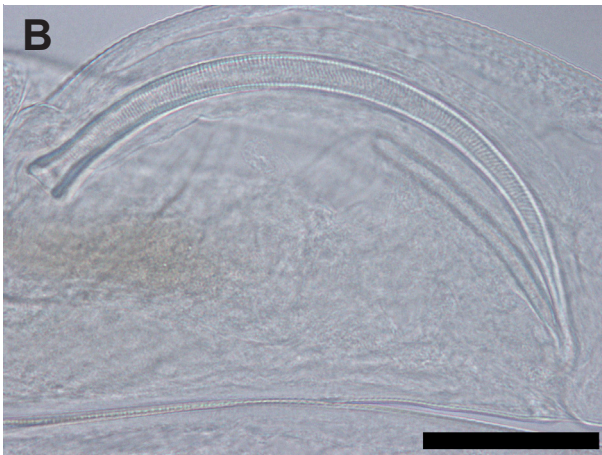
Ânus : Extremidade posterior - 137,094 (127,563-151,900).

♂ (n=3) - **Comprimento** - 2463,381 (2402,944-2553,564);

Largura ao nível do bulbo esofágico - 129,341(114,911-144,200);
Bulbo esofágico (cxl) - 91,327 x 89,914 (85,729-95,358 x 88,729-90,818);
Esófago - 426,191 (414,484-434,113);
Parte muscular anterior do esófago - 320,768 (315,965-324,422);
Parte glandular posterior do esófago - 105,423 (98,519-112,196);
Espícula maior (lanceolada) - 205,497 (177,305-223,29);
Espícula menor (lanceolada)- 88,011 (73,262-104,985); **Gubernáculo** - ausente/não visível

Figura 37 - Pormenores de características morfológicas de *Cyrtosomum penneri* encontrados durante a necrópsia. **A** - Extremidade anterior. De notar a divisão entre a porção muscular (anterior) e porção glandular (posterior) do esófago. **Escala** - 40 µm; **B**- Espículas. **Escala** - 50 µm; **C** - Vulva. **Escala** - 50 µm. Imagens originais.

A



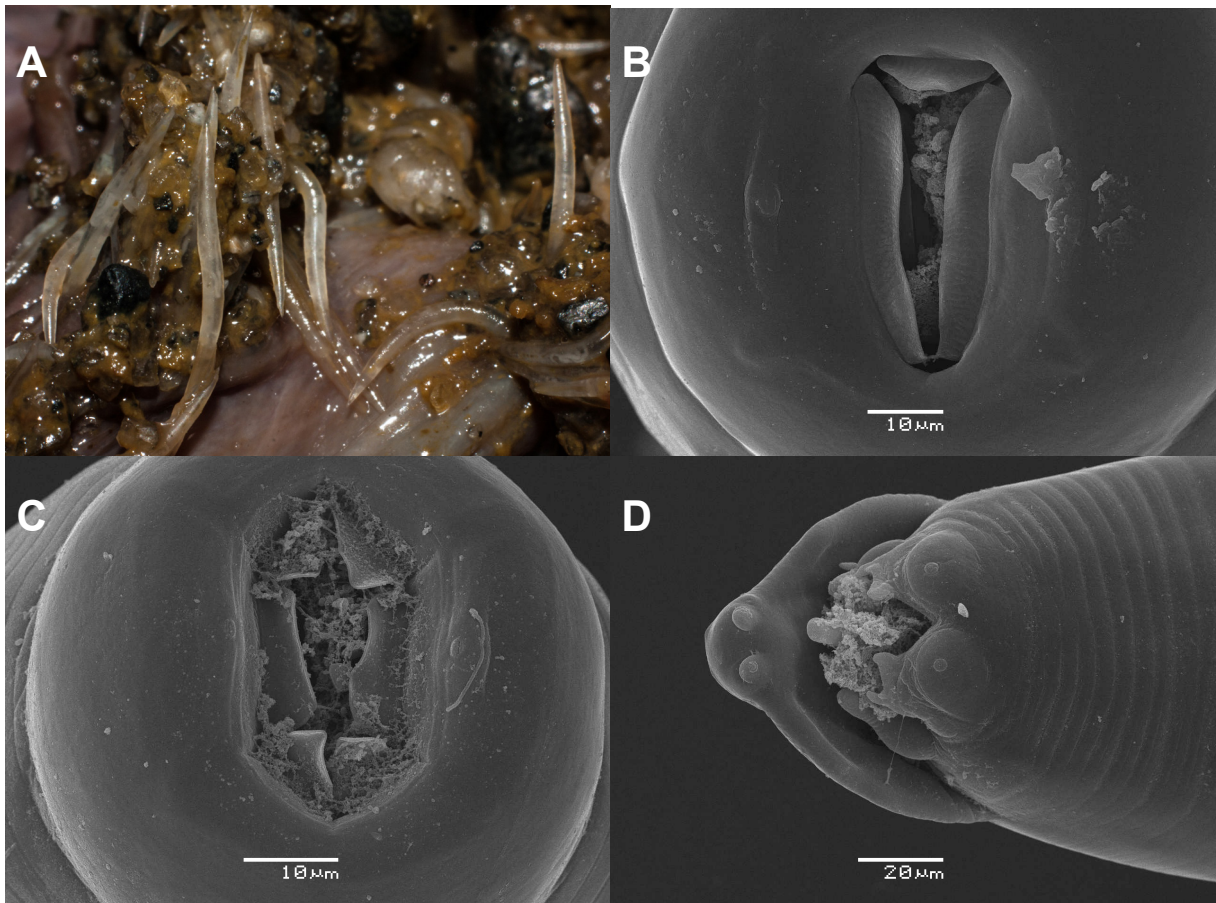
Na literatura consultada não existe nenhum caso descrito em que este parasita fosse considerado o agente etiológico, desta forma, o fato de não terem sido encontradas lesões intestinais que pudessem ser relacionadas com a presença de um número elevado de nematodes era expectável.

Foram recolhidos nematodes adultos do cólon de uma iguana verde que macroscopicamente eram de pequena/média dimensão e de cor esbranquiçada (figura 38 e 39).

Microscopicamente a morfologia era característica de dois géneros comuns em lagartos da família Iguanidae: *Alaeuris* e *Ozolaimus*. A distinção entre estes géneros foi feita através do arranjo do aparelho bucal (figura 38.B). A presença de 3 membranas cuticulares estriadas bem definidas e triangulares excluíram o género *Alaeuris* (Moravec, Maldonado e Mayen-Peña, 1996).

Até à data estão descritas 5 espécies de *Ozolaimus* parasitas de lagartos: *O. cirratus*, *O. megatyphlon*, *O. monhystera*, *O. ctenosauri* e *O. linstowi*. Os nematodes encontrados distinguem-se das duas primeiras espécies por terem um esófago contínuo sem divisão em duas partes distintas. Distinguem-se de *O. monhystera* pelo menor tamanho geral e da espícula dos machos. Distinguem-se de *O. ctenosauri* pelo diferente arranjo do aparelho bucal das fêmeas, particularmente pela forma das membranas que são triangulares nos espécimes encontrados e quase quadrangulares em *O. ctenosauri* (Malysheva, 2015).

Figura 38 - *Ozolaimos* cf *linstowi* encontrados no cólon de *Iguana iguana*. **A** - Macrofotografia dos espécimes encontrados durante a necrópsia. Imagem original. **B** - Extremidade anterior de uma fêmea. **C** - Extremidade anterior de um macho. **D** - Extremidade posterior de um macho. Imagens **B,C e D** (microscopia electrónica de varrimento) cedidas por Svetlana Malysheva. Fotos obtidas com espécimes recolhidos durante o presente trabalho enviados a esta investigadora.



Apesar de os machos e as fêmeas serem ligeiramente maiores que os descritos por Malysheva (2015) são morfologicamente indistinguíveis de *O. linstowi*. A análise genética dos nematodes encontrados no presente estudo revelou uma sequência da subunidade 18s similar à encontrada por Malysheva (2015) apesar de não ter sido possível sequenciar a subunidade 28s (Malysheva, comunicação pessoal, 2016).

Desta forma existe uma grande probabilidade de os nematodes encontrados pertencerem à espécie *Ozolaimus linstowi*.

Figura 39 - Fotocomposição de *Ozolaimos cf linstowi* encontrados em *Iguana iguana* durante a necrópsia. **A** - Fêmea. **Escala** - 500 μ m. **B** - Macho. **Escala** - 500 μ m. **C** - Ovo. **Escala** - 40 μ m. Imagens originais.



Descrição dos espécimes encontrados durante este estudo (média (min-max) μ m):

♀ (n=3) - **Comprimento** - 7705,709 (7533,374-7869,706);

Largura ao nível do bulbo esofágico - 624,990(571,447-656,904);

Bulbo esofágico (cxl) - 253,677 x 304,545 (250,267-258,425 x 281,029-318,733);

Esófago - 1850,412 (1748,105-1908,81);

Ânus - extremidade posterior - 331,314 (298,518-375,552);

Vulva - ânus - 2703,951 (2628,818-2773,097);

Vulva - Extremidade anterior - 4518,047 (4176,192-4719,468);

Cauda - 231,166 (218,182-247,928);

Ovos (n=10) - 129,054 x 69,064 (100,835-144,075 x 63,149-77,321).

♂ (n=3) - **Comprimento** - 5137,726 (5109,682-5156,820);

Largura ao nível do bulbo esofágico - 457,100 (443,767-473,554);

Bulbo esofágico (cxl) - 216,019 x 249,927 (196,913-229,299 x 244,347-255,454);

Esófago - 1394,339 (1226,767-1530,942);

Espícula - 1302,657 (1278,412-1344,631);

Cauda - 93,959 (81,156-100,549).

Como já foi referido anteriormente os nematodes da família Pharyngodonidae são considerados comensais e só raramente causam doença.

À necrópsia o animal em questão apresentava sangue nas cavidades oral e nasal, glossite na região antero-dorsal da língua. O intestino e estômago continham conteúdo arenoso e o cólon além deste conteúdo apresentava grande número de nematodes.

o exame histopatológico a língua apresentava lesões graves de glossite ulcerosa, o intestino tinha lesões de enterite catarral e o pulmão apresentava atelectasia e pneumonia multifocal purulenta. Todas estas lesões estavam associadas à presença de aglomerados de bactérias de forma bacilar.

O fígado apresentava congestão, edema e lesões disseminadas de degenerescência macrovacuolar.

Os achados de necrópsia e exame histopatológico sugerem um processo de septicémia. Mesmo não sendo possível atribuir uma relação de causa-efeito entre a presença dos parasitas e as lesões intestinais encontradas, a presença de um grande número de nematodes pode ter contribuído para o desfecho deste caso. Números elevados de parasitas podem causar erosão da mucosa e permitir a infeção sistémica por parte de bactérias e/ou não permitir a adequada absorção de nutrientes contribuindo para a morbidade do animal.

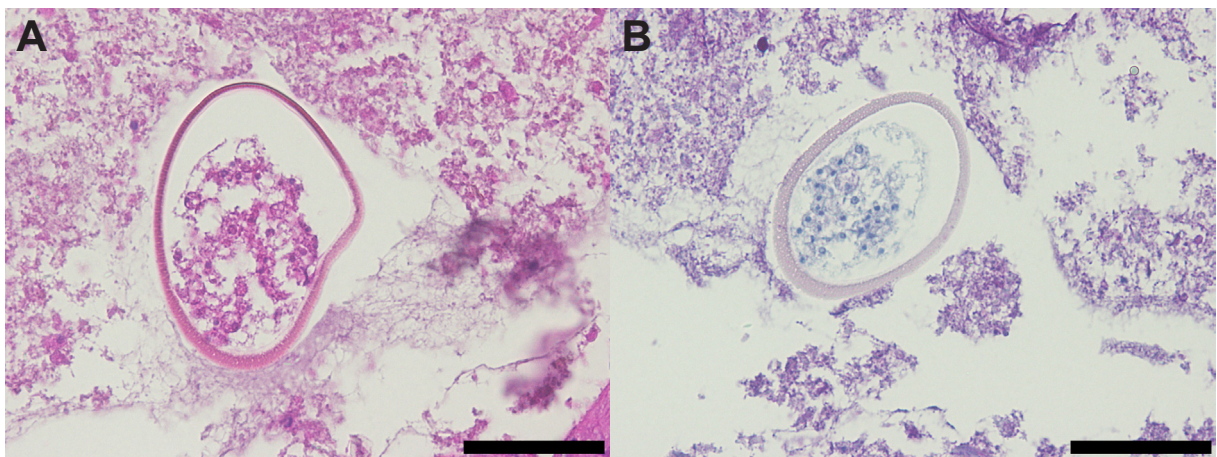
4.2.2.2.3 Família Pharyngodonidae - Ovos de género desconhecido

Além dos adultos e ovos de *Ozolaimos*, referidos no ponto anterior, foram encontrados ovos desta família (figura 40) em 6 iguanas verdes ao exame coprológico de flutuação com $ZnSO_4$ e solução saturada de açúcar. Estes ovos já tinham sido encontrados durante os exames coprológicos efetuados em vida (Ver ponto 4.1.3.4.1).

Durante o exame histopatológico todos os animais apresentavam lesões de enterite catarral. Dado o carácter comensal desta família de nematodes e o facto de todos os animais serem positivos a parasitas dos filos Amoebozoa, Ciliophora e Metamonada não foi possível associar as lesões encontradas no intestino e a presença de nematodes.

Figura 40 - Ovos de Pharyngodonidae em corte histológico de intestino de *Iguana iguana*.

A - Coloração de H&E; **B** - Coloração de PAS. **Escala** - 40 μ m. Imagens originais.



4.2.2.2.4 Família Physalopteridae - *Skrjabinoptera phrynosoma* Ortlepp, 1922

No mesmo lagarto cornudo ao qual foram recolhidos *Cyrtosomum penneri* encontraram-se no estômago nematodes de média/grande dimensão (Figura 41-44).

A conformação do aparelho bucal (Figura 42.A), com a presença de dois pseudolábios envolvidos por um colarete permitiram incluir estes parasitas na família Physalopteridae.

Os parasitas de lagartos do género *Phrynosoma* foram estudados em várias ocasiões e apenas dois géneros de nematodes desta família estão descritos: *Physaloptera* e *Skrjabinoptera*. A distinção das espécies destes dois géneros pode ser feita pelo número de úteros presentes nas fêmeas (dois em *Skrjabinoptera* e quatro em *Physaloptera*) (Ortlepp, 1922). Desta forma foi possível chegar ao diagnóstico do género *Skrjabinoptera* sendo a espécie *Skrjabinoptera phrynosoma* a única descrita e o nematode mais comum encontrado neste hospedeiro (Babero & Kay, 1967).

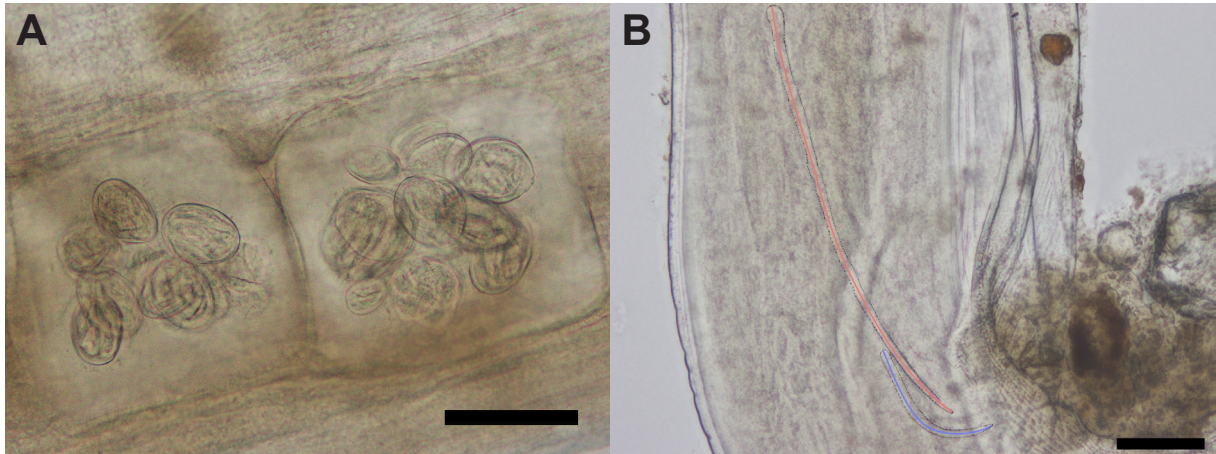
Figura 41 - *Skrjabinoptera phrynosoma* encontrados no estômago de *Phrynosoma platyrhinos*. Imagens originais.



O ciclo de vida deste parasita foi estudado e descrito por Sheridan H. Lee (1955 e 1957) e apresenta algumas particularidades principalmente na forma como dispersa os seus ovos e se adaptou ao clima árido onde habitam os seus hospedeiros.

Este nematode tem um ciclo de vida heteroxeno. Os adultos encontram-se fixos à mucosa gástrica dos hospedeiro e as fêmeas adultas fazem migrações para a cloaca onde saem para o exterior com o material fecal. Apresentam no útero cápsulas contendo entre 5 a 69 ovos em vários estádios de desenvolvimento desde mórula até larvas. A fêmea no exterior morre e é transportada por uma formiga (*Pogonomyrmex barbatus*) para o ninho onde serve de alimento às larvas. Esta é a forma de infeção do hospedeiro intermediário. À medida que as larvas da formiga passam pela metamorfose as larvas do parasita desenvolvem-se até L3 que é a forma infectante para o lagarto. O lagarto alimenta-se das formigas e desta forma completa o ciclo (Lee, 1955, 1957).

Figura 42 - *Srjabinoptera phrynosoma* encontrados no estômago de *Phrynosoma platyrhinos*. **A** - Cápsulas ovíferas. **Escala** - 100 μm ; **B** - Espículas desiguais presentes na extremidade posterior do macho. **Escala** - 100 μm . Imagens originais.



Medição dos espécimes encontrados (Média (min-max) μm):

♀ adultas (n=3) - **Comprimento** - 11994,213 (10672,397-12730,433);

Largura - 640,759 (622,825-651,325);

Ovos (cxl) (n=10) - 59,080 x 41,884 (52,661-70,117 x 37,59-48,252)

Cápsulas ovíferas (cxl) (n=10) - 236,47 x 199,52 (149,613-285,666 x 174,671-218,309)

♂ (n=3) - **Comprimento** - 8908,978 (7648,55-9672,06); **Largura** - 409,506 (369,642-456,321)

Comprimento esófago - 2345,410 (2258,796-2516,494)

Espícula maior - 557,283 (521,245-611,814) **Espícula menor** - 190,6737 (172,005-207,022)

A maioria dos autores descreve infecções com elevada carga parasitária, chegando a 750 nematodes num único hospedeiro (Babero & Kay, 1967).

O facto de este nematode apresentar um ciclo de vida indireto pode justificar a baixa quantidade de parasitas encontrados, visto que, nas condições em que era mantido, a formiga que serve de hospedeiro intermediário não fazia parte da sua dieta.

Figura 43 - *Srjabinoptera phrynosoma* encontrados no estômago de *Phrynosoma platyrhinos*. **A** - Extremidade anterior. **Escala** - 40 μm ; **B** - Extremidade anterior dos úteros com pormenor da divisão em apenas 2. **Escala** - 200 μm . Imagens originais.

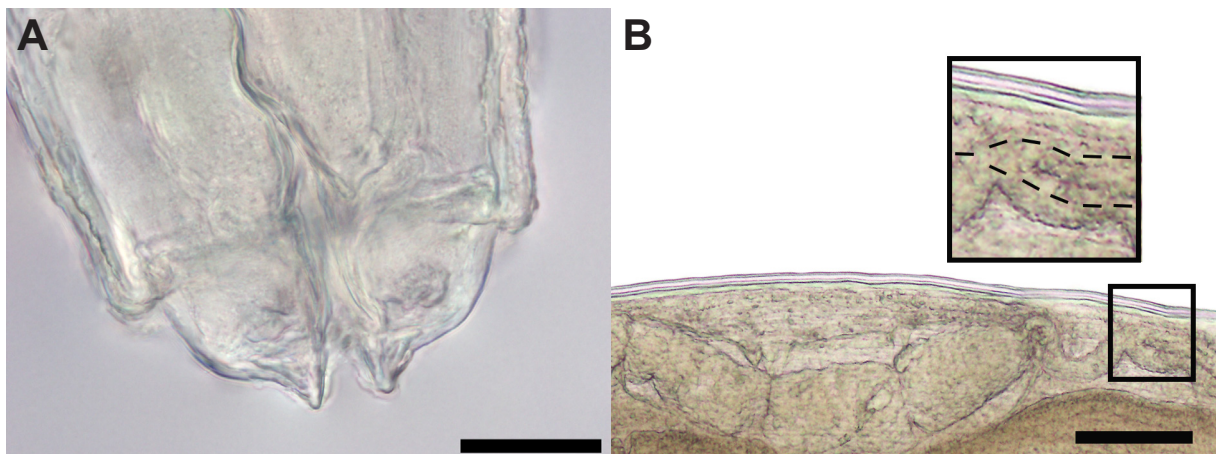


Figura 44 - *Srjabinoptera phrynosoma* encontrados no estômago de *Phrynosoma platyrhinos*. **A** - Fêmea madura; **B** - Fêmea imatura; **C** - Macho. **Escala** - 1000 µm. Imagens originais.



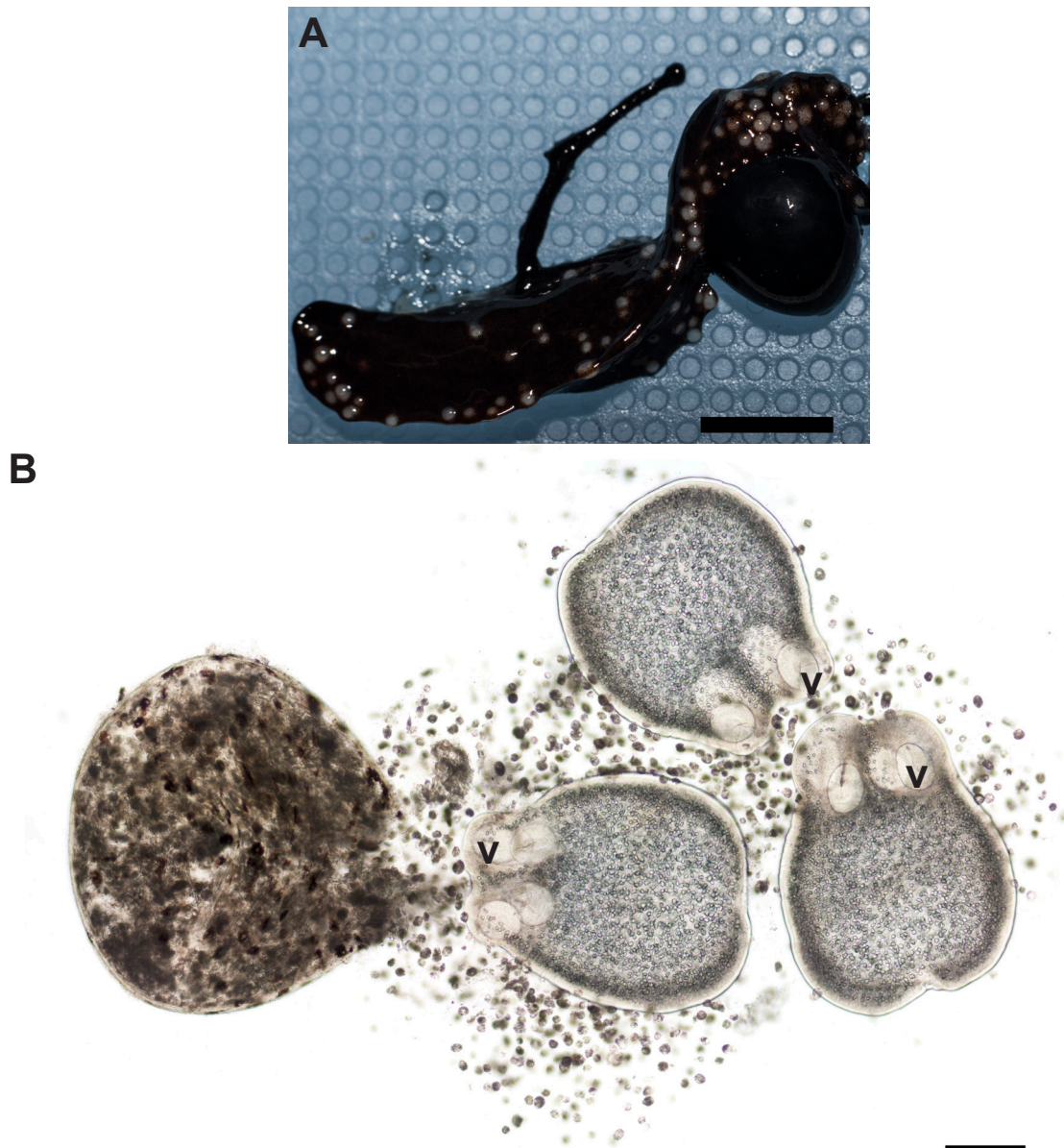
Os nematodes desta família podem causar lesões na mucosa do estômago onde se encontram fixados. Além desta ação direta competem pelos nutrientes dos alimentos ingeridos pelo hospedeiro. Microscopicamente não foram observadas lesões causadas pela sua presença. O lagarto apresentava caquexia provavelmente devida a uma dieta alimentar incorreta, mas que pode ter sido agravada pela ação dos parasitas.

4.2.2.3 Filo Platyhelminthes - *Mesocestoides* sp. Vaillant, 1863

Durante a necrópsia de um lagarto cornudo foram observados pequenos quistos esbranquiçados no fígado (Figura 45.A). Esmagou-se um dos quistos entre lâmina e lamela do qual saíram 3 larvas tetratirídio (Figura 45.B). A presença de 4 ventosas desprovidas de ganchos, o tamanho das larvas e o facto de ser o único género de Cestodes em forma de larva descrito em lagartos dos E.U.A são características que sugerem o diagnóstico do género *Mesocestoides*.

O ciclo de vida deste parasita ainda não é totalmente conhecido. Pressupõe-se que serão necessários 3 hospedeiros, 2 intermediários e 1 definitivo. O primeiro hospedeiro intermediário será um artrópode, possivelmente formigas, que é infectado através das oncosferas. O segundo hospedeiro é um réptil, anfíbio, ave ou pequeno mamífero onde o parasita se desenvolve até uma larva tetratirídio que aparece livre na cavidade abdominal/celômica ou enquistada em diversos órgãos. Em répteis, em particular nos lagartos, enquista regularmente no fígado. O hospedeiro final, por norma um mamífero carnívoro ou uma ave, é infetado quando se alimenta do segundo hospedeiro intermediário (Jacobson, 2007; McAllister et al., 2014).

Figura 45 - *Mesocestoides* sp. em *Phrynosoma platyrhinos*. **A** - Quistos de *Mesocestoides* sp. no fígado durante a necrópsia. **Escala** - 1 cm. **B** - Larvas tetratírdio exteriorizadas depois da rotura de um quisto. **V**- ventosas. **Escala** - 200 μ m. Imagens originais.

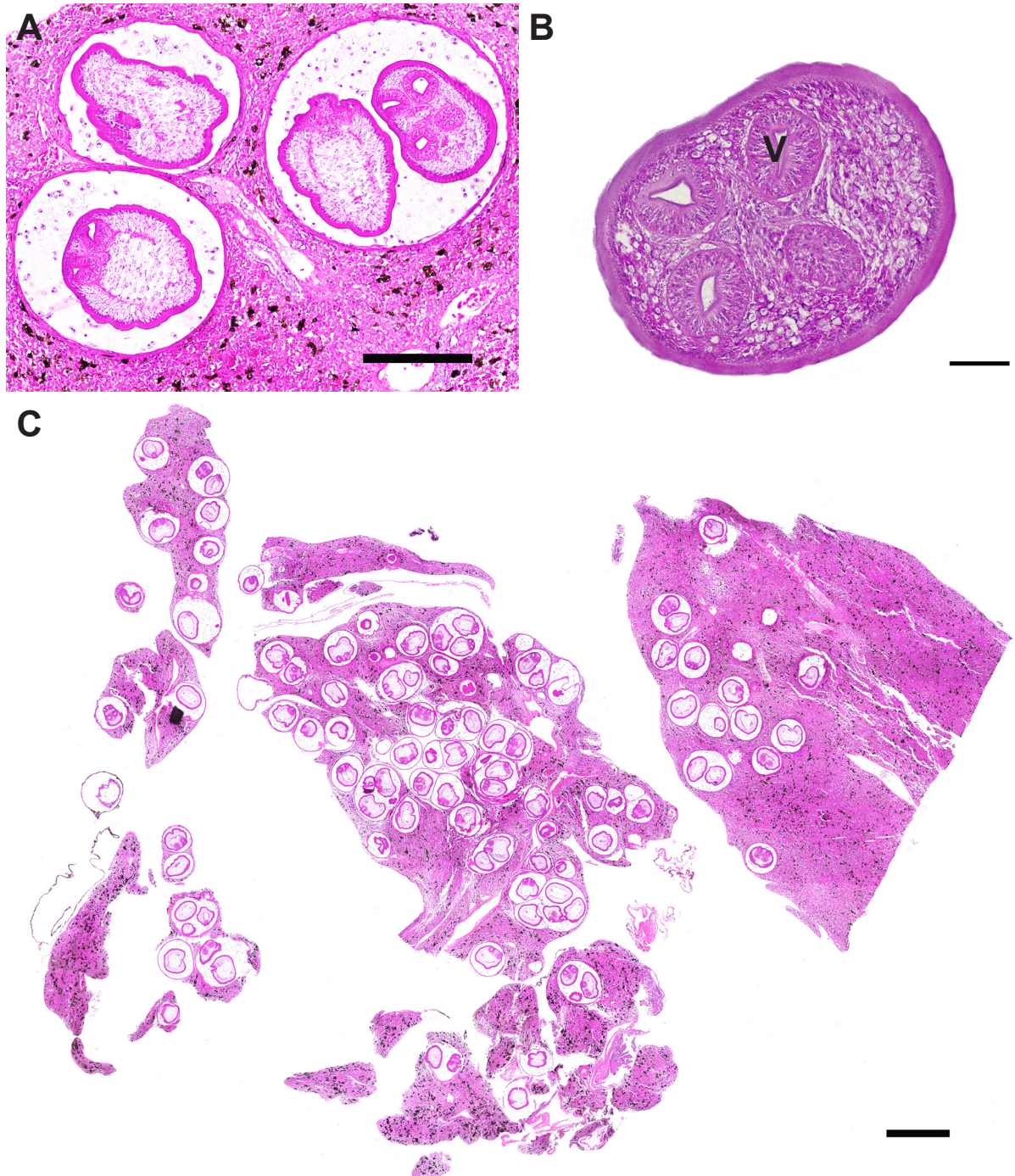


Ao exame histopatológico encontraram-se inúmeros quistos parasitários com uma dimensão média de 601 μ m x 625 μ m (figura 46). Por vezes os quistos apresentavam paredes contíguas e encontraram-se entre 1-4 larvas no seu interior.

Verificou-se a presença de aglomerados de pigmento provavelmente correspondentes a centros de melanomacrófagos. O fígado apresentava adicionalmente congestão e degenerescência macrovacuolar.

Apesar de não existir uma reação inflamatória ativa em redor dos quistos, nem alterações degenerativas necrosantes, a extensão de parênquima hepático ocupado pelos quistos pode comprometer a função do órgão.

Figura 46 - Larvas de *Mesocestoides* sp. encontradas em corte histológico no fígado de um *Phrynosoma platyrhinos*. **A** - Larva tetratirídio corada com H&E. **Escala** - 300 μ m; **B** - Larva tetratirídio corada com PAS. **V** - Ventosa. **Escala** - 60 μ m; **C** - Fotocomposição de um corte histológico do fígado. **Escala** - 1000 μ m. Imagens originais.



4.2.3 Sub-ordem Cryptodira

Não foram encontradas quaisquer formas parasitárias nos exames coprológicos, à necrópsia ou na análise histopatológicas de nenhuma tartaruga.

4.3 Associações estatísticas

4.3.1 Condições de manutenção

Como está demonstrado na tabela 2 foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre todas as variáveis de manutenção e a presença de parasitas no grupo 1 e 2. No grupo 3 foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis “temperatura”, “água”, “limpeza”, “iluminação”, “condições” e “conjunto”.

No grupo 4 foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis “temperatura”, “limpeza”, “iluminação”, “condições” e “conjunto”.

Na tabela 2 encontram-se os resultados de todos os testes para todas as variáveis. A sombreado + negrito estão os valores que demonstram uma associação, a negrito os que, apesar de existir uma associação demonstrada pelo valor de p, não foi possível a determinação do *Odds ratio* por um dos valores da tabela de contingência ser 0 e em texto simples os valores em que não se determinou uma associação estatisticamente significativa.

Tabela 2 - Resultados do teste de Fisher para os diferentes grupos definidos. **p** - valor de p. **OR** - Odds ratio médio.

	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	p	OR	p	OR	p	OR	p	OR
Temperatura	1,737e-06	10,53767	2.662e-06	8.463772	0,000202	41,68543	0.0001257	28.33099
Água	4.895e-06	11.83106	3.301e-06	9.76626	0.03617	6.201176	0.09011	4.381227
Alimentação	0,0006537	6,614283	0.002335	4.398469	1	0,9028809	1	0.7766122
Limpeza	3,63e-10	46,86296	2.53e-08	16.0159	0.001234	24,46041	0.01612	7.96674
Iluminação	1,079e-11	Inf	5.087e-08	15.71396	0.0002163	Inf	0.001857	13.37991
Condições	8,393e-12	103,8469	3.2e-11	31.30637	3.241e-06	Inf	3.165e-06	86.9668
Terrário	9,811e-07	15,06681	7.603e-07	11.59525	0.2134	3,397258	0.2629	2.43558
M. Conjunto	9,416e-10	Inf	2.651e-08	21.94585	0.000927	Inf	0.001867	20.5431
S. Clínicos	3,071e-12	68,37947	3.076e-11	25.70681	0.000202	41,68543	0.0001257	28.33099

Não foi encontrada na literatura uma referência que demonstre, de forma estatística, uma associação entre condições de manutenção não adequadas e a presença de parasitas.

De uma forma geral, é aceite que o cativeiro representa *per se* uma alteração no equilíbrio hospedeiro-parasita.

Animais em cativeiro podem ser mantidos em condições de stress potencialmente nefastas. Negligência, elevado número de indivíduos, estado nutricional, condições pouco higiénicas, temperatura baixa, doenças concomitantes e introdução de outros indivíduos doentes podem contribuir de forma decisiva para a manifestação clínica de doenças parasitárias. Adicionalmente, o cativeiro predispõe à concentração de elevado número de parasitas providenciando condições e microhabitat favoráveis para os parasitas com os quais os répteis, confinados, têm maior contato (Wilson & Carpenter, 1996; Fitzgerald & Vera, 2006).

Assim, era de esperar que os animais mantidos em condições desadequadas tivessem maior probabilidade de se encontrarem parasitados. Esta suposição confirmou-se pela existência de uma associação entre a variável “condições” e a presença de parasitas em todos os grupos. Adicionalmente, esta variável foi a que apresentou consistentemente maior valor de “odds ratio” (OR). Determinada a associação estatística com um valor de $p < 0.05$ em todos os grupos, estes valores de OR revelam uma associação forte entre as duas variáveis.

No que diz respeito à variável “terrário” era de esperar que existisse uma associação entre a manutenção em terrários pseudonaturalistas e a presença de parasitas. Tal aconteceu quando se fez o cálculo para o conjunto de todas as subordens de répteis, mas não se verificou nos cálculos que contabilizavam apenas os sáurios. Isto pode ser justificado pelo elevado número de serpentes testadas, que eram mantidas quase exclusivamente em caixas minimalistas e poucas foram consideradas positivas.

Os terrários/caixas pseudonaturalistas apresentam substratos e elementos decorativos mais complexos que tornam a sua limpeza mais difícil. Nestas condições, tendo em conta que os parasitas encontrados apresentavam maioritariamente ciclos de vida monoxenos, seria de esperar que existisse uma maior concentração das suas formas infetantes em ambientes pseudonaturalistas onde existem mais elementos onde estes se podiam fixar. A limpeza das instalações minimalistas implicava sempre a eliminação total do substrato e desinfeção dos respetivos terrários/caixas, enquanto no caso dos pseudonaturalistas apenas eram retirados o material fecal e excesso de comida que, em contacto com o substrato e elementos decorativos, são difíceis de eliminar totalmente.

É discutível se, em terrários completamente naturalistas, o conforto adicional e diminuição do stress traduzidos numa maior imunocompetência podem compensar a maior exposição a agentes infecciosos (Warwick & Steedman, 1995).

No entanto, no caso específico das instalações desta loja, os terrários pseudonaturalistas podem não representar uma vantagem aos minimalistas. Os elementos decorativos e as dimensões dos terrários/caixas, na maioria dos casos, não estavam desenhados de forma a mimetizarem o ambiente natural dos animais alojados. Havendo assim a possibilidade de esta tentativa de enriquecimento ambiental não ser suficiente para diminuir o stress do cativo comparando com os ambientes minimalistas.

Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a variável “conjunto” e a presença de parasitas para todos os grupos.

Como referido anteriormente, a maioria dos parasitas encontrados eram monoxenos. Sabendo isto, esta associação era expectável, já que seria de esperar que todos os indivíduos tivessem infeções parasitárias similares.

4.3.2 Sinais clínicos

Também se encontrou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de parasitas e a manifestação de sinais clínicos associados ao trato gastrointestinal.

Apesar dos parasitas encontrados serem, na generalidade, considerados comensais o stress do cativeiro pode determinar o desequilíbrio da relação hospedeiro-parasita. A susceptibilidade à doença causada por parasitas está relacionada com o stress de cativeiro, temperatura ambiente, higiene, doença concomitante, o número de parasitas, disponibilidade de hospedeiros intermediários, o estado nutricional e a idade do hospedeiro (Wilson & Carpenter, 1996).

No entanto é necessário ter em consideração que, mesmo as infecções parasitárias graves exibem sinais clínicos inespecíficos como inatividade, perda de peso progressiva e anorexia (Wilson & Carpenter, 1996). Adicionalmente, algumas das condições de mau manejo que propiciam a manifestação clínica de doenças parasitárias podem provocar sintomatologia gastrointestinal com origem distinta.

Em alguns casos, por exemplo, a anorexia pode ser sazonal (fêmeas em foliculogénese, os ovários ocupam muito espaço) ou pré-ecdise. Em outras ocasiões pode ser provocada por temperatura subótima, ausência de esconderijo, manipulação excessiva ou pela hierarquia social (animais mais fracos podem não se alimentar). A falta de espaço na cavidade celómica provocada por neoplasias, granulomas ou aumento anormal de um órgão podem causar obstruções e/ou diminuir a capacidade de ingestão de comida. Ingestão de substrato, dieta desadequada (principalmente em répteis herbívoros), fornecimento de água insuficiente ou desajustado podem causar impactações, obstruções ou tenesmo. Também doenças bacterianas (principalmente bactérias GRAM -) ou víricas (IBD) podem causar sinais clínicos do aparelho gastrointestinal similares aos de origem parasitária (Benson, 1999).

Desta forma, não excluindo a possibilidade de existirem outros fatores que poderiam causar estes sinais clínicos, a associação estatística encontrada dá força à importância que os parasitas gastrointestinais têm na condição clínica dos répteis mantidos em cativeiro. Atuem estes como agente principal ou agravem a condição dos animais com doenças concomitantes ou mantidos em más condições de manejo.

As conclusões a retirar destes resultados têm que ser abordadas com a precaução inerente às limitações dos próprios testes estatísticos. O desconhecimento da presença de infeção parasitária à chegada do animal à loja, o tipo de amostragem e a própria amostra, assim como o facto de a manifestação clínica de doenças parasitárias gastrointestinais ser inespecífica, têm que ser tidos em conta na avaliação dos resultados.

Assim sendo, estes resultados serviram para, de uma forma estatística, mostrar que as condições de manejo parecem ser, efetivamente, um fator importante na presença de parasitas gastrointestinais e que estes parasitas parecem ter influência na manifestação de sinais clínicos com origem no aparelho gastrointestinal.

As tabelas de contingência e os respectivos resultados do teste de Fisher assim como o score de cada variável e de cada animal estão no Anexo 7.

5. CONCLUSÕES

O rastreio parasitológico, no qual se determinou uma prevalência parasitária global média de 40,5%, reforça a ideia de que o parasitismo é um elemento importante quando se considera a manutenção de répteis em cativeiro.

Durante a realização dos exames coprológicos com amostras frescas detetaram-se 5 serpentes positivas (de 46 testadas) para três filões de parasitas (Apicomplexa, Metamonada e Nematoda). A baixa prevalência encontrada nesta subordem de répteis foi inesperada, principalmente no que se refere ao filo Nematoda, tendo em conta que os géneros *Kalicephalus*, *Strongyloides* e *Rhabdias* são dos mais prevalentes na bibliografia consultada.

Na subordem Sauria observaram-se, durante o rastreio parasitológico, 17 animais positivos (de 33 testados) a parasitas de seis filões diferentes (Amoebozoa, Apicomplexa, Ciliophora, Metamonada, Nematoda e Platyhelminthes). Foram identificadas duas espécies de coccídias, *Isospora amphiboluri* (em dragões barbudos e num lagarto de gola) e *Choleoeimeria pogonae* (em dragões barbudos) e também o nematode *Skrjabinoptera phrynosoma* num lagarto cornudo. Além destas espécies, foi determinado o género de duas coccídias, *Choleoeimeria* sp. em *Cordylus tropidosternum* (possível primeiro registo de uma coccídia deste género neste hospedeiro) e *Eimeria/Acroeimeria* sp. em *Phelsuma madagascariensis*. Foi ainda encontrado um nematode adulto do género *Cyrtosomum* (Atractidae), um adulto de *Thelandros* sp. (Pharyngodonidae) e vários quistos de *Entamoeba* sp. em iguana verde e oncosferas do género *Oochoristica* num lagarto de água chinês.

Em relação aos quelónios, apesar de apenas se terem analisado amostras de três indivíduos, todos foram considerados positivos. Ainda assim detetaram-se 4 filões de parasitas (Amoebozoa, Ciliophora, Metamonada e Nematoda) dentro dos quais se identificou uma espécie de protozoário ciliado da espécie *Balantidium testudinis* em tartaruga de esporas africana, quistos de amebas do género *Entamoeba* e um nematode adulto do género *Tachygonetria*.

A maior dificuldade encontrada durante a realização do rastreio parasitológico foi na tentativa de identificação de protozoários flagelados. A escassez de referências bibliográficas e a necessidade de se realizarem colorações específicas para evidenciar estruturas morfológicas tornaram inviável a identificação destes parasitas, mesmo ao nível de género.

Durante a realização das necrópsias e exames coprológicos associados (quando possível) foram considerados positivos 15 dos 41 répteis.

As amostras de três serpentes foram consideradas positivas, ao esfregaço fecal e/ou com material gástrico, para *Cryptosporidium* sp. A análise histopatológica destes animais revelou lesões compatíveis com a infeção deste parasita apesar de não se terem encontrado formas parasitárias.

Foram identificadas três espécies de nematodes recolhidos durante a necrópsia. As espécies *Skrjabinoptera phrynosoma* (Physalopteridae) e *Cyrtosomum penneri* (Atractidae) foram recolhidas durante a necrópsia de um lagarto cornudo e a espécie *Ozolaimus linstowii* (Pharyngodonidae) recolhidos do cólon de uma iguana verde.

Além destas espécies foram identificados, durante a necrópsia e análise histopatológica, quistos contendo larvas tetratirídio de um cestode do género *Mesocestoides* (Cyclophyllidea) no fígado de um lagarto cornudo.

Durante as análises coprológicas complementares às necrópsias detetou-se uma espécie de coccídia (*Isospora amphiboluri*) num dragão barbudo e num lagarto de gola. Adicionalmente foram detetados ovos da família Pharyngodonidae em iguanas verdes e trofozoítos dos filos Amoebozoa e Metamonada numa serpente Boa arco-íris.

De referir que, apesar de não serem parasitas gastrointestinais, a Boa arco-íris apresentava ácaros da espécie *Ophionyssus natricis* e durante a análise histopatológica detetaram-se gamontes de *Hepatozoon* sp.

Desta forma, apesar da identificação de lesões causadas por parasitas ter sido difícil, as necrópsias revelaram-se de grande utilidade, permitindo recolher parasitas em grande quantidade diretamente do trato gastrointestinal, que foram determinantes na identificação dos mesmos à espécie.

Com este trabalho, confirmou-se também que a maioria dos parasitas presentes em répteis mantidos em cativeiro apresentam ciclo de vida direto. Os parasitas com ciclo de vida indireto que foram encontrados (*Skrjabinoptera phrynosoma* e *Mesocestoides* sp.) podem ajudar na definição da origem dos seus hospedeiros, sendo provável que estes tenham sido recolhidos diretamente da natureza. Principalmente o nematode *S. phrynosoma*, que tem uma relação estrita com a formiga que serve de alimento a estes lagartos no seu habitat natural.

A análise estatística sustentou a grande importância que têm as instalações onde são mantidos os animais na presença de parasitas e manutenção da infeção. Da mesma forma, foi reforçada a ideia de que as infeções parasitárias parecem ser importantes na manifestação de sinais clínicos gastrointestinais.

Conclui-se, portanto, que a maioria dos parasitas presentes em répteis mantidos em cativeiro apresentam ciclo de vida direto. Alguns dos parasitas (por exemplo *Isospora amphiboluri*) aparecem regularmente em animais criados em cativeiro, mas outros (por exemplo *Skrjabinoptera phrynosoma*), por necessitarem de hospedeiros intermediários específicos, são trazidos da natureza com os seus hospedeiros. Esta dinâmica reforça a importância de se conhecerem tanto os parasitas que se encontram em animais mantidos em cativeiro, como os que se encontram em animais de vida livre.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dada a escassez de informação sobre parasitas em répteis em Portugal, um primeiro passo seria conhecer os parasitas mais comuns quer em animais mantidos em cativeiro quer de vida livre, através de rastreios parasitológicos de coleções privadas, comerciais e de parques zoológicos. No caso dos animais de vida livre, uma possibilidade seria recorrer a animais encontrados mortos (principalmente atropelados).

Saber quais são os parasitas mais prevalentes nestes ambientes permitirá desenhar e planear estudos direccionados ao conhecimento dos seus ciclos de vida, dos seus efeitos nos hospedeiros e o seu potencial enquanto agentes zoonóticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amanatfard, E., Youssefi, M., & Barimani, A. (2014). Human Dermatitis Caused by *Ophionyssus natricis*, a Snake Mite. *Iranian Journal Of Parasitology*, 9(4), 594-596.
- Anderson, R. (2000). *Nematode parasites of vertebrates (2ª ed.)*. Wallingford, Oxon: CABI Pub.
- APPA (2016). *Pet Industry Market Size & Ownership Statistics*. American Pet Products Association. Acedido a SET. 06, 2016, disponível em: http://www.americanpetproducts.org/press_industrytrends.asp.
- Arena, P. C. & Warwick, C. (1995). Miscellaneous factors affecting health and welfare. In Warwick, C., Frye, F., & Murphy, J., *Health and Welfare of Captive Reptiles*. (pp. 263 - 283). Dordrecht: Springer, B.V.
- Auliya, Mark. (2003). Hot trade in cool creatures: A review of the live reptile trade in the European Union in the 1990s with a focus on Germany. TRAFFIC Europe, Brussels, Belgium
- Babero, B., & Kay, F. (1967). Parasites of Horned Toads (*Phrynosoma* spp.), with Records from Nevada. *The Journal Of Parasitology*, 53(1), 168-175. doi: 10.2307/3276642
- Barnard, S., & Upton, S. (1994). *A veterinary guide to the parasites of reptiles*. Flórida: Krieger Pub. Co.
- Barrow, J., & Stockton, J. (1960). The Influences of Temperature on the Host-Parasite Relationships of Several Species of Snakes Infected with *Entamoeba invadens*. *The Journal Of Protozoology*, 7(4), 377-383. doi: 10.1111/j.1550-7408.1960.tb05984.x
- Benson, K. (1999). Reptilian gastrointestinal diseases. *Seminars In Avian And Exotic Pet Medicine*, 8(2), 90-97. doi: 10.1016/s1055-937x(99)80041-3
- Bernardino, M.S.N. (2014) Parasitas gastrointestinais de uma coleção privada de geckos leopardo (*Eublepharis macularius*) e de répteis tidos como animais de estimação no norte de Portugal. Dissertação MIMV FMV-ULisboa, xiii + 71 pp.
- Bouamer, S., & Morand, S. (2006). Nematodes Parasites of Testudinidae (Chelonia): List of species and biogeographical distribution. *Annales Zoologici*, 56(2), 225-240. doi: 10.3161/000345406778700775
- Bowman, D. & Georgi, J. (2009). Helminths. In *Georgis' parasitology for veterinarians*. (9ª ed.) (pp. 115 - 152) St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier.
- Brower, A., & Cranfield, M. (2001). *Cryptosporidium* sp. - Associated enteritis without gastritis in rough green snakes (*Opheodrys aestivus*) and a common garter snake (*Tamnophis sirtalis*). *Journal Of Zoo And Wildlife Medicine*, 32(1), 101-105. doi: 10.1638/1042-7260(2001)032[0101:csaewg]2.0.co;2
- Brownstein, D., Strandberg, J., Montali, R., Bush, M., & Fortner, J. (1977). *Cryptosporidium* in Snakes with Hypertrophic Gastritis. *Veterinary Pathology*, 14(6), 606-617. doi: 10.1177/030098587701400607

- Burse, C., & Flanagan, J. (2002). *Atractis marquezii* n. sp. (Nematoda: Atractidae) and a Revision of *Atractis* Dujardin, 1845, Sensu Baker, 1987. *The Journal Of Parasitology*, 88(2), 320-324. doi: 10.2307/3285582
- Burse, C., & Goldberg, S. (2005). Two new species of Pahryngodonidae (Nematoda: Oxyuroidea) and other nematodes in *Agama caudospina* (Squamata: Agamidae) from Kenya, Africa, AFRICA. *Journal Of Parasitology*, 91(3), 591-599. doi: 10.1645/ge-3421
- Camin, J. (1948). Mite Transmission of a Hemorrhagic Septicemia in Snakes. *The Journal Of Parasitology*, 34(4), 345-354. doi: 10.2307/3273698
- Cannon, L. (1967). New coccidia from Australian lizards I. *Isospora*. *Parasitology*, 57(02), 227 - 235. doi: 10.1017/s003118200007205x
- Chia, M., Jeng, C., Hsiao, S., Lee, A., Chen, C., & Pang, V. (2009). *Entamoeba invadens* Myositis in a Common Water Monitor Lizard (*Varanus salvator*). *Veterinary Pathology*, 46(4), 673-676. doi: 10.1354/vp.08-vp-0224-p-cr
- CITES (2002). Conference resolution 12.3 (Rev. CoP17). Permits and certificates. In: Convention on International Trade in Endangered Species. Acedido a Abr. 18 2017, disponível em <https://cites.org/sites/default/files/document/E-Res-12-03-R17.pdf>
- CITES DATABASE | CITES. (2018). Acedido a JAN. 12, 2018, disponível em: <https://cites.org/eng/app/index.php>
- Comissão Europeia (2007). Regulamento (UE) n. o 750/2013 da Comissão, de 29 de julho de 2013, que altera o Regulamento (CE) n. o 338/97 do Conselho relativo à proteção de espécies da fauna e da flora selvagens através do controlo do seu comércio
- Conn, D. (1985). Life Cycle and Postembryonic Development of *Oochoristica anolis* (Cyclophyllidea: Linstowiidae). *The Journal Of Parasitology*, 71(1), 10-16. 10. doi: 10.2307/3281970
- Daszak, P., & Ball, S. (1991). Five new species of Eimeria (Apicomplexa: Eimeriidae) from lizards. *Systematic Parasitology*, 20(2), 141-147. doi: 10.1007/bf00007390
- Daszak, P., & Ball, S. (2001). A description of two new species of coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from African reptiles with nomenclatural corrections for two *Caryospora* and one *Eimeria* species from snakes. *Folia Parasitologica*, 48(1), 1-6. doi: 10.14411/fp.2001.001
- DeNardo, D. (2006). Stress in captive reptiles. In Mader, D. R., *Reptile Medicine and Surgery*. (2^a ed.). (pp. 119 – 123). Filadélfia: W. B. Saunders.
- DeNardo, D., & Wosniak, E. (1997). Understanding the snake mite and current therapies for its control. *Proceedings Of The Fourth Annual Conference Of The Association Of Reptilian And Amphibian Veterinarians*, 137-147.
- Diário da República (2009). Decreto-Lei nº 211/2009 de 3 de Setembro. Diário da República nº 171/2009 – Série I-A. Ministério do Ambiente. Lisboa.
- Duszynski, D. & Wilber, P. (1997). A Guideline for the Preparation of Species Descriptions in the Eimeriidae. *The Journal Of Parasitology*, 83(2), 333. doi: 10.2307/3284470
- Duszynski, D., Upton, S., & Couch, L. (2008). Coccidia of the World. Acedido a Out.11, 2017, disponível em: <http://biology.unm.edu/coccidia/sauria.html>

- Engler, M. and Parry-Jones, R. (2007). Opportunity or threat: The role of the European Union in global wildlife trade. TRAFFIC Europe, Brussels, Belgium.
- Fitzgerald, K. T. & Vera, R. (2006). Acariasis. In D. Mader, Reptile Medicine and surgery (2^a ed., pp. 720 - 738). Filadélfia: W. B. Saunders.
- Frank W. (1984). Non-hemoparasitic protozoans. In Hoff G., Frye F., & Jacobson E., Diseases of Amphibians and Reptiles. (pp. 259 - 384). Nova Iorque: Plenum Press.
- Frye, F. L. (1995). Nutritional considerations. In Warwick , C., Frye, F., & Murphy, J., Health and Welfare of Captive Reptiles. (pp. 82 - 96). Dordrecht: Springer, B.V.
- Garner, M. M. (2006). Overview of biopsy and necropsy techniques. In Mader, D. R., Reptile Medicine and Surgery. (2^a ed.). (pp. 119 – 123). Filadélfia: W. B. Saunders.
- Garza, M., & Hernández, R. (1986). Two new species of *Nyctotherus* (Heterotrichidae: Protozoa) from the cecum of the iguana *Ctenosaura pectinata* from Islas Marias, Nayarit, México. Revista De Biología Tropical, 34(2), 225-229.
- Geiman, Q., & Ratcliffe, H. (1936). Morphology and Life-cycle of an Amoeba Producing Amoebiasis in Reptiles. Parasitology, 28(02), 208-230. doi: 10.1017/s0031182000022423
- Geiman, Q., & Wichterman, R. (1937). Intestinal Protozoa from Galapagos Tortoises (With Descriptions of Three New Species). The Journal Of Parasitology, 23(4), 331-347. doi: 10.2307/3272225
- Gillespie, D. S. (2006). Large collections: special considerations. In Mader, D. R., Reptile Medicine and Surgery. (2^a ed.). (pp. 1013 –1016). Filadélfia: W. B. Saunders.
- Gray, C., Marcus, L., McCarten, W., & Sappington, T. (1966). Amoebiasis in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*. International Zoo Yearbook, 6(1), 279-283. doi: 10.1111/j.1748-1090.1966.tb01799.x
- Greiner, E. (2003). Coccidiosis in reptiles. Seminars In Avian And Exotic Pet Medicine, 12(1), 49-56. doi: 10.1053/saep.2003.127880
- Greiner, E. C. & Mader, D. R. (2006). Parasitology. In Mader, D. R., Reptile Medicine and Surgery. (2^a ed.). (pp. 343 – 364). Filadélfia: W. B. Saunders.
- Guillette, L.J., Cree, A. & Rooney A. R. (1995). Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In Warwick , C., Frye, F., & Murphy, J., Health and Welfare of Captive Reptiles. (pp. 263 - 283). Dordrecht: Springer, B.V.
- Hering-Hagenbeck, S., Petter, A., & Boomker, J. (2002). Redescription of some *Thelandros* and *Tachygonetria* spp. (Pharyngodonidae: Oxyuroidea) from the omnivorous plated lizard, *Gerrhosaurus validus validus* A. Smith, 1849 in South Africa. Onderstepoort Journal Of Veterinary Research, 69, 31-51.
- Hill, W., & Neal, R. (1954). An epizootic due to *Entamoeba invadens* at the Gardens of the Zoological Society of London. Proceedings Of The Zoological Society Of London, 123(4), 731-738. doi: 10.1111/j.1096-3642.1954.tb00198.x
- How CITES works | CITES. (2016). Acedido a NOV. 25, 2016, disponível em <https://cites.org/eng/disc/how.php>
- ICNF (2016). Enquadramento Legal — ICNF. Acedido a Set. 17 2016, disponível em <http://www2.icnf.pt/portal/cites/enq-leg>

- Jacobson, E. (2007). Parasites and Parasitic Diseases of Reptiles. In: Infectious diseases and pathology of reptiles. (pp.571-666). Boca Raton, Flórida: CRC Press/Taylor & Francis.
- Jacobson, E., & Greiner, E. (1984). Amebiasis in red-footed tortoises. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*, 183(11), 1192 - 1194.
- Jakob, W., & Wesemeier, H. (1995). Intestinal inflammation associated with flagellates in snakes. *Journal Of Comparative Pathology*, 112(4), 417-421. doi: 10.1016/s0021-9975(05)80022-2
- Jirků, M., Modrý, D., Šlapeta, J., Koudela, B., & Lukeš, J. (2002). The Phylogeny of *Goussia* and *Choleoeimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the Evolution of Excystation Structures in Coccidia. *Protist*, 153(4), 379-390. doi: 10.1078/14344610260450118
- Klingenberg, R. J. (2004). Parasitology. In *BSAVA Manual of Reptiles*. (2^a ed.) (pp. 319 – 329) Quedgeley: BSAVA.
- Klingenberg, R. K. (2007a). Hygiene and the herpetoculturist. In *Understanding Reptile Parasites*. (2^a ed.) (pp. 231–236). Califórnia: Advanced Vivarium Systems.
- Klingenberg, R. K. (2007b). Internal parasites and their treatment. In *Understanding Reptile Parasites*. (2^a ed.) (pp. 157–213). California: Advanced Vivarium Systems.
- Koudela, B., & Modrý, D. (1998). New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards. *Folia Parasitologica*, 45, 93-100.
- Kuchta, R., Scholz, T., Brabec, J., & Bray, R. A. (2008). Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *International Journal for Parasitology*, 38, 49–55. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.08.005
- Langford, G., Willobee, B., & Isidoro, L. (2013). Transmission, Host Specificity, and Seasonal Occurrence of *Cyrtosomum penneri* (Nematoda: Atractidae) in Lizards from Florida. *Journal Of Parasitology*, 99(2), 241-246. doi: 10.1645/12-30.1
- Lee, S. (1955). The Mode of Egg Dispersal in *Physaloptera phrynosoma* Ortlepp (Nematoda: Spiruroidea), a Gastric Nematode of Texas Horned Toads, *Phrynosoma cornutum*. *The Journal Of Parasitology*, 41(1), 70-74. doi: 10.2307/3274001
- Lee, S. (1957). The Life Cycle of *Skrjabinoptera phrynosoma* (Ortlepp) Schulz, 1927 (Nematoda: Spiruroidea), a Gastric Nematode of Texas Horned Toads, *Phrynosoma cornutum*. *The Journal Of Parasitology*, 43(1), 66-75. doi: 10.2307/3274761
- Levine, N. (1980). Some Corrections of Coccidian (Apicomplexa: Protozoa) Nomenclature. *The Journal Of Parasitology*, 66(5), 830-834. doi: 10.2307/3280679
- Lillywhite, H.B. & Gatten Jr, R.E. (1995). Physiology and functional anatomy. In Warwick, C., Frye, F., & Murphy, J., *Health and Welfare of Captive Reptiles*. (pp. 5 - 25). Dordrecht: Springer, B.V.
- Lynn, D. (2010). Characters and the Rationale Behind the New Classification. In *The ciliated protozoa* (3^a ed., pp. 75 - 88). Nova Iorque: Springer.
- Malysheva, S. (2015). Morphometrics and molecular analysis of *Ozolaimus linstowi* n. sp. (Oxyuroidea: Pharyngodonidae) from the green lizard *Iguana iguana*. *Journal Of Helminthology*, 90(02), 186-198. doi: 10.1017/s0022149x15000061

- McAllister, C., Connior, M., Bursey, C., Trauth, S., Robison, H., & Conn, D. (2014). Six New Host Records for *Mesocestoides* sp. Tetrathyridia (Cestoidea: Cyclophyllidae) from Amphibians and Reptiles of Arkansas, U.S.A. *Comparative Parasitology*, 81(2), 278-283. doi: 10.1654/4685r.1
- McAllister, C., Upton, S., Jacobson, E., & Kopit, W. (1995). A Description of *Isospora amphiboluri* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the Inland Bearded Dragon, *Pogona vitticeps* (Sauria: Agamidae). *The Journal Of Parasitology*, 81(2), 281. doi: 10.2307/3283934
- Meerovitch, E. (1958). Some biological requirements and host-parasite relations of *Entamoeba invadens*. *Canadian Journal Of Zoology*, 36(4), 513-523. doi: 10.1139/z58-046
- Megía-Palma, R., Martínez, J., Acevedo, I., Martín, J., García-Roa, R., & Ortega, J., Peso-MArtinéz, M., Albaladejo, G., Cooper, R., Paranjpe, D., Sinervo, B. & Merino, S. (2015). Phylogeny of the reptilian Eimeria: are *Choleoeimeria* and *Acroeimeria* valid generic names?. *Zoologica Scripta*, 44(6), 684-692. doi: 10.1111/zsc.12126
- Member countries | CITES. (2016). Acedido a NOV. 25, 2016, disponível em <https://cites.org/eng/disc/parties/index.php>
- Mitchell, M. A. (2007). Parasites of Reptiles. IN Flynn, R., Baker, D. & Flynn, R., *Flynn's parasites of laboratory animals* (2ª ed.) (pp. 177 - 216). Ames, Iowa: Blackwell Pub
- Moravec, F., Salgado-Maldonado, G., & Mayen-Pena, E. (1996). Two Pharyngodonid Nematodes, *Alaeuris mexicana* n. sp. and *Ozolaimus ctenosauri*, from the Iguanid Lizard *Ctenosaura pectinata* from Nayarit, Mexico. *The Journal Of Parasitology*, 82(6), 1011-1016. doi: 10.2307/3284214
- Okulewicz, A., Kaźmierczak, M., & Zdrzalik, K. (2014). Endoparasites of exotic snakes (Ophidia). *Helminthologia*, 51(1), 34-40. doi: 10.2478/s11687-014-0205-z
- Okulewicz, A., Kaźmierczak, M., Hildebrand, J., & Adamczyk, M. (2015). Endoparasites of lizards (Lacertilia) from captive breeding and trade networks. *Helminthologia*, 52(1), 31-36. doi: 10.1515/helmin-2015-0008
- Origi, F. C. (2007). Reptile Immunology. In: Jacobson, E., *Infectious diseases and pathology of reptiles*. (pp.131 - 168). Boca Raton, Flórida: CRC Press/Taylor & Francis.
- Ortlepp, R. (1922). The Nematode Genus *Physaloptera* Rud. *Proceedings Of The Zoological Society Of London*, 92(4), 999-1107. doi: 10.1111/j.1469-7998.1922.tb07095.x
- Paperna, I., & Landsberg, J. (1989). Description and taxonomic discussion of eimerian coccidia from African and Levantine geckoes. *South African Journal Of Zoology*, 24(4), 345-355. doi: 10.1080/02541858.1989.11448176
- Papini R., Manetti C., Mancianti F. (2011). Coprological survey in pet reptiles in Italy. *Veterinary Record*, 169(8), 207-207. doi:10.1136/vr.d4398.
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., & Pantchev, N. (2008). Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. *The Veterinary Journal*, 175(1), 53-68. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.12.009
- Pedraza-Díaz, S., Ortega-Mora, L., Carrión, B., Navarro, V., & Gómez-Bautista, M. (2009). Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from pet reptiles. *Veterinary Parasitology*, 160(3-4), 204-210. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.11.003
- PFMA, Pet Population 2016. Pet Food Manufacturing Association. Acedido a SET. 06, 2016, disponível em: <http://www.pfma.org.uk/pet-population-2016>

- Ponce-Gordo, F., & Martínez-Díaz, R. (2010). Taxonomía y filogenia del género *Entamoeba*. Una revisión histórica. *Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 69(1), 5-37.
- Pough, F. (1991). Recommendations for the Care of Amphibians and Reptiles in Academic Institutions. *ILAR Journal*, 33(4), S1-S21. doi: 10.1093/ilar.33.4.s1
- Ramanandan Shanavas, K., & Ramachandran, P. (1990). Life-history of *Hepatozoon octosporei* sp. n., a new haemogregarine from the skink, *Mabuya carinata* (Schneider), with notes on the in vitro excystment of its oocysts. *Archiv Für Protistenkunde*, 138(2), 127-137. doi: 10.1016/s0003-9365(11)80154-5
- Rataj, A., Lindtner-Knific, R., Vlahović, K., Mavri, U., & Dovč, A. (2011). Parasites in pet reptiles. *Acta Vet Scand*, 53(1), 33. doi: 10.1186/1751-0147-53-33
- Ratcliffe, H., & Geiman, Q. (1934). Amebiasis in reptiles. *Science*, 79(2049), 324-325. doi: 10.1126/science.79.2049.324
- Reavill, D.R., Griffin, C. (2014) Common Pathology and Diseases Seen in Pet Store Reptiles. In Mader, D. & Divers, S. *Current therapy in reptile medicine and surgery* (pp.13 - 19). Missouri: Elsevier Saunders.
- Ren, X., Zhao, J., Zhang, L., Ning, C., Jian, F., & Wang, R., Lv, C., Wang, Q., Arrowood, M. & Xiao, L.(2012). *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology*, 130(3), 274-281. doi: 10.1016/j.exppara.2011.07.012
- Robinson, J., Griffiths, R., St. John, F., & Roberts, D. (2015). Dynamics of the global trade in live reptiles: Shifting trends in production and consequences for sustainability. *Biological Conservation*, 184, 42-50. doi: 10.1016/j.biocon.2014.12.019
- Rossi, J. (2006). General husbandry and management. In D. Mader, *Reptile Medicine and surgery* (2^a ed., pp. 25-41). Filadélfia: W. B. Saunders.
- Schneller, P., & Pantchev, N. (2008). *Parasitology in snakes, lizards and chelonians*. Frankfurt am Main: Edition Chimaira.
- Schultz, H. (1975). Human infestation by *Ophionyssus natricis* snake mite. *British Journal Of Dermatology*, 93(6), 695-697. doi: 10.1111/j.1365-2133.1975.tb05120.x
- Scullion, F., & Scullion, M. (2009). Gastrointestinal Protozoal Diseases in Reptiles. *Journal Of Exotic Pet Medicine*, 18(4), 266-278. doi: 10.1053/j.jepm.2009.09.004
- Sidall, M. (1995). Phylogeny of Adeleid Blood Parasites with a Partial Systematic Revision of the Haemogregarine Complex. *The Journal Of Eukaryotic Microbiology*, 42(2), 116-125. doi: 10.1111/j.1550-7408.1995.tb01551.x
- Silvestre, A. M. (2011). Massive *Tachygonetria* (Oxyuridae) infection in a Herman's tortoise (*Testudo hermanni*). *Consult Journal. Special*. 409-412.
- Smith, T. (1996). The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal Of Parasitology*, 82(4), 565-585. doi: 10.2307/3283781
- Sprent, J. (1980). Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Angusticaecum* and *Krefftascaaris* n.g. *Journal Of Helminthology*, 54(01), 55. doi: 10.1017/s0022149x00006350
- Stacy, B. A. & Pessier, A.P. (2007). In: Jacobson, E., *Infectious diseases and pathology of reptiles*. (pp.257 - 298). Boca Raton, Flórida: CRC Press/Taylor & Francis.

- Szczepaniak, K., Tomczuk, K., Lojszczyk-Szczepaniak, A., & Lopuszynski, W. (2015). Reclassification of *Eimeria pogonae* Walden (2009) as *Choleoeimeria pogonae* comb. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae). *Parasitology Research*, 115(2), 681-685. doi: 10.1007/s00436-015-4787-2
- Taylor, M., Coop, R., & Wall, R. (2015). Laboratory diagnosis of parasitism. In *Veterinary Parasitology* (4^a ed., pp. 259 - 312). Oxford: John Wiley & Sons.
- Teles, D., Brito, S., Teixeira, A., Ribeiro, S., Araujo-Filho, J., Lima, V., Pereira, A. & Almeida, W. (2016). Nematodes associated with *Iguana iguana* (Linnaeus, 1758) (Squamata, Iguanidae) in Semi-arid areas of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal Of Biology*, 77(3), 514-518. doi: 10.1590/1519-6984.17615
- Telford, S. (2009). The Hemogregarines. In *Hemoparasites of the reptilia*. (pp. 200 - 241) Boca Raton, Flórida: CRC Press.
- Terrel, S. P. & Stacy, B.A. (2007). Reptile necropsy techniques. In: *Infectious diseases and pathology of reptiles*. (pp.219 - 258). Boca Raton, Flórida: CRC Press/Taylor & Francis
- The CITES species | CITES. (2016). Acedido a NOV. 26, 2016, disponível em: <https://cites.org/eng/disc/species.php>
- Tilley, M., Upton, S., & Freed, P. (1990). A Comparative Study on the Biology of *Cryptosporidium serpentis* and *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Journal Of Zoo And Wildlife Medicine*, 21(4), 463-467.
- Uetz, P., & Hošek, J. (2018). Species Statistics. Acedido a Mar. 11 2018, disponível em <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>
- UNEP-WCMC (2009). Review of non-CITES reptiles that are known or likely to be in international trade. A Report to the European Commission. UNEPWCMC, Cambridge.
- Upton, S., & Barnard, S. (1987). Two New Species of Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from Madagascar Gekkonids. *The Journal Of Protozoology*, 34(4), 452-454.
doi: 10.1111/j.1550-7408.1987.tb03213.x
- Upton, S., & Current, W. (1985). The Species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) Infecting Mammals. *The Journal Of Parasitology*, 71(5), 625. doi: 10.2307/3281435
- Upton, S., McAllister, C., & Garret, C. (1993). A new species of *Eimeria* (Apicomplexa) from *Cordylus cataphractus* (Sauria: Cordylidae), from South Africa. *Journal Of The Egyptian Society Of Parasitology*, 23, 189-194.
- Varga, M. (2004). Captive Maintenance and Welfare. In *Girling, S. & Raiti, P. BSAVA manual of reptiles*. (2^a ed.) (pp. 6-17). Quedgeley: British small animal veterinary Association.
- Vitt, L., & Caldwell, J. (2014). *Herpetology* (4th ed.). Amsterdam (Holanda): Elsevier.
- Walden, M. R. (2009). Characterizing the epidemiology of *Isospora amphiboluri* in captive bearded dragons (*Pogona vitticeps*)". *LSU Doctoral Dissertations*. 1402.
- Warwick, C. & Steedman, C. (1995). Naturalistic versus clinical environments in husbandry and research. In *Warwick, C., Frye, F., & Murphy, J., Health and Welfare of Captive Reptiles*. (pp. 113 - 130). Dordrecht: Springer B.V.

- Wilson, S. & Carpenter, J. (1996). Endoparasitic diseases of reptiles. *Seminars In Avian And Exotic Pet Medicine*, 5(2), 64-74. doi: 10.1016/s1055-937x(96)80019-3
- Wozniak, E., & DeNardo, D. (2000). The Biology, Clinical Significance and Control of the Common Snake Mite, *Ophionyssus natricis*, in Captive Reptiles. *Journal Of Herpetological Medicine And Surgery*, 10(3), 4-10. doi: 10.5818/1529-9651-10.3.4
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., & Upton, S. (2004a). *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 72-97. doi: 10.1128/cmr.17.1.72-97.2004
- Xiao, L., Ryan, U., Graczyk, T., Limor, J., Li, L., Kombert, M., Junge R., Sulaiman, I., Zhou, L., Arrowood, M., Koudela, B., Modry, D. & Lal, A. (2004b). Genetic Diversity of *Cryptosporidium* spp. in Captive Reptiles. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(2), 891-899. doi: 10.1128/aem.70.2.891-899.2004
- Zapata, A., Varas, A., & Torroba, M. (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology Today*, 13(4), 142-147. doi: 10.1016/0167-5699(92)90112-k
- Zimmerman, L., Vogel, L., & Bowden, R. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal Of Experimental Biology*, 213(5), 661-671. doi: 10.1242/jeb.038315
- Zwart, P., & Truyens, E. (1975). Hexamitiasis in tortoises. *Veterinary Parasitology*, 1(2), 175-183. doi: 10.1016/0304-4017(75)90020-5
- Zwart, P., Teunis, S., & Cornelissen, J. (1984). Monocercomoniasis in Reptiles. *The Journal Of Zoo Animal Medicine*, 15(3), 129-134. doi: 10.2307/20094704

ANEXOS

Anexo 1 - Classificação taxonómica e nº das espécies incluídas no presente estudo. Anexo da CITES, anexo da Legislação da UE e estatuto de conservação dessas espécies.

Ordem <u>Sub-ordem</u> família	Espécie (n)	Nome científico	Nome comum	Legislação		Estatuto de conservação
				CITES	EU	IUCN ¹
Squamata (n=109)						
Sauria (n=45)						
Agamidae (n=11)	<i>Chlamydosaurus kingii</i> (n=1)		Lagarto de gola	NC	NC	Least concern
	<i>Physignathus cocincinus</i> (n=1)		Lagarto de água Chinês	NC	NC	NA
	<i>Pogona vitticeps</i> (n=9)		Dragão barbudo	NC	NC	NA
Cordylidae (n=4)	<i>Cordylus tropidosternum</i> (n=4)		Lagarto de cauda espinhosa	Anexo II	Anexo B	NA
Corytophanidae (n=1)	<i>Basiliscus pulmifrons</i> (n=1)		Basilisco verde	NC	NC	Least concern
Crotaphytidae (n=2)	<i>Crotaphytus collaris</i> (n=2)		Lagarto de colar	NC	NC	Least concern
Diplodactylidae (n=3)	<i>Correlophus ciliatus</i> (n=3)		Gecko de crista	NC	NC	Vulnerable
Eublepharidae (n=7)	<i>Eublepharis macularius</i> (n=7)		Gecko leopardo	NC	NC	NA
Gekkonidae (n=1)	<i>Phelsuma madagascariensis</i> (n=1)		Gecko diurno do madagáscar	Anexo II	Anexo B	Least concern
Iguanidae (n=8)	<i>Iguana iguana</i> (n=8)		Iguana verde	Anexo II	Anexo B	NA
Phrynosomatidae (n=5)	<i>Phrynosoma asio</i> (n=1)		Lagarto cornudo gigante	NC	NC	Least concern
	<i>Phrynosoma platyrhinos</i> (n=4)		Lagarto cornudo	NC	NC	Least concern
Teiidae (n=1)	<i>Tupinambis merianae</i> (n=1)		Teiú	Anexo II	Anexo B	Least concern
Varanidae (n=2)	<i>Varanus exanthematicus</i> (n=1)		Varano da savana	Anexo II	Anexo B	Least concern
	<i>Varanus niloticus</i> (n=1)		Varano do nilo	Anexo II	Anexo B	NA
Serpentes (n=64)						
Boidae (n=1)	<i>Epicrates cenchria</i> (n=1)		Boa arco-íris	Anexo II	Anexo B	NA
Colubridae (n=50)	<i>Heterodon nasicus</i> (n=1)		Cobra de nariz de porco	NC	NC	Least concern
	<i>Lampropeltis getula</i> (n=4)		Cobra real californiana	NC	NC	Least concern
	<i>Lampropeltis triangulum</i> (n=8)		Cobra do leite	NC	NC	NA
	<i>Pantherophis guttatus</i> (n=37)		Cobra do milho	NC	NC	Least concern
Pythonidae (13)	<i>Aspidites ramsayi</i> (n=1)		Pitão de Ramsay	Anexo II	Anexo B	Endangered
	<i>Morelia spilota</i> (n=1)		Pitão carpete	Anexo II	Anexo B	Least concern
	<i>Python regius</i> (n=11)		Pitão bola	Anexo II	Anexo B	Least concern
Testudines						
Cryptodira (n=6)						
Emydidae (n=3)	<i>Pseudemys concinna</i> (n=3)		Tartaruga hieroglífica	NC	NC	Least concern
Testudinidae (n=3)	<i>Agrionemys horsfieldii</i> (n=1)		Tartaruga russa	Anexo II	Anexo B	Vulnerable
	<i>Centrochelys sulcata</i> (n=2)		Tartaruga de esporas africana	Anexo II	Anexo B	Vulnerable

Legenda: NC - Não contemplado. NA - Não atribuído (sem estatuto de conservação disponível). 1- Informação disponível em < <http://www.iucnredlist.org> />.

Anexo 2 - Condições de manejo das espécies incluídas no presente trabalho.

Espécie	Temperatura (°C)	Humidade relativa (%)	Alimentação	Iluminação UV	Habitat tipo / [c x l x a (m)]
Sauria					
<i>Basiliscus pulmifrons</i>	28-31 dia 24-25 noite (1)	70-80 (1)	Insectívoro / Carnívoro (2)	Espectro total (1)	Floresta tropical 1,5 X 1,2 X 1,8 (2)
<i>Cordylus tropidosternum</i>	24-28 dia 18-20 noite (3)	50-60 (3)	Insectívoro (3)	Necessário em recém nascidos (3)	Desértico 0,8 X 0,4 X 0,5 (3)
<i>Correlophus ciliatus</i>	20-27 dia 20 noite (4)	60-80 (4)	Insectívoro / Frugívoro (4)	Opcional (4)	Floresta tropical 0,5 X 0,4 X 0,8 (4)
<i>Crotaphytus collaris</i>	24-32 dia 21-29 noite (5)	30-40 (6)	Carnívoro / Insectívoro (juvenis) (5)	Espectro total (5)	Semi-desértico (5) 1,2 X 0,5 X 0,5
<i>Eublepharis macularius</i>	25-30 dia 18-24 noite (1)	30-40 (7)	Insectívoro (8)	Opcional (7)	Semi-árido 0,8 X 0,4 X 0,5 (8)
<i>Iguana iguana</i>	29-32 dia 19,5-25 noite (1)	75-100 (7)	Herbívoro (7)	Espectro total (1)	Floresta tropical 3,6 X 1,8 X 11,8 (9)
<i>Phelsuma madagascariensis</i>	29,5 dia 24 noite (1)	50-70 (10)	Omnívoro (10)	Espectro total (1)	Floresta tropical 0,6 X 0,3 X 0,6 (10)
<i>Phrynosoma asio</i>	18,3-24 (dia e noite) + BS 46 (dia) (11)	50-70 (12)	Insectívoro (11)	Espectro total (11)	Semi-desértico 91,5 X 45 X 75 (11)
<i>Phrynosoma platyrhinos</i>	29,5-35 (dia e noite) + BS 46 (dia) (13)	40-60 (14)	Insectívoro (13)	Espectro total (13)	Semi-desértico 91,5 X 45 X 75 (13)
<i>Physignathus cocincinus</i>	29-31 (dia) 24-27 (noite) (15)	80-90 (7)	Insectívoro (12)	Espectro total (7)	Floresta tropical (7) 1,8 X 1,2 X 1,8 (15)
<i>Pogona vitticeps</i>	29-31 dia 20-23 noite (1)	40-50 (16)	Omnívoro (16)	Espectro total (1)	Semi desértico 1,5 X 0,8 X 0,8 (16)
<i>Tupinambis merianae</i>	26,6-30 dia 21-25,5 noite (1)	70 (17)	Carnívoro (17)	Opcional (1)	Climas temperados 1,8 X 0,9 X 0,6 (17)
<i>Varanus exanthematicus</i>	28-32 dia 21-24 noite (18)	60-80 (18)	Carnívoro (18)	Aconselhável (18)	Semi-aquático (18) 1,8 X 1,2 (19)
<i>Varanus niloticus</i> *	29,5-32 dia 24 noite (19)	70-100 (19)	Carnívoro (19)	Aconselhável (19)	Semi-aquático (19) 2,4 X 1,2 (19)
Serpentes					
<i>Aspidites ramsayi</i>	27-33 dia 22-24 noite (20)	40-60 (20)	Carnívoro (20)	Opcional (1)	Semi-árido 1,5 X 0,7 X 0,7 (20)
<i>Epicrates cenchria</i>	21-24 dia 29,5-31,5 noite (21)	70 (21)	Carnívoro (21)	Opcional (1)	Floresta tropical 1,80 X 0,8 X 0,9 (21)
<i>Heterodon nasicus</i>	26-33 (22)	40-50 (22)	Carnívoro (22)	Opcional (1)	Seco e arenoso 90 X 30 X 30 (22)
<i>Lampropeltis getula</i>	25-29 dia 19,5-24noite (1)	30-70 (7)	Carnívoro (23)	Opcional (1)	Variável 1,2 X 60 X 40 (23)
<i>Lampropeltis triangulum</i>	27-33 (24)	40-60 (25)	Carnívoro (24)	Opcional (1)	Variável 1,2 X 60 X 40 (24)
<i>Morelia spilota</i>	25 ambiente 30-32 BS (26)	40-60 (26)	Carnívoro (26)	Opcional (1)	90 X 60 X 60 (26)
<i>Pantherophis guttatus</i>	25-29 dia 19,5-24 noite (1)	50-70 (27)	Carnívoro (27)	Opcional (1)	Variável 1 X 0,5 X 0,8 (27)
<i>Python regius</i>	24-34 dia 20-27 noite (28)	50-60 (28)	Carnívoro (28)	Opcional (1)	Estepe 1 X 0,5 X 0,5 (28)
Cryptodira					
<i>Agrionemys horsfieldii</i>	21 ambiente 32-37 BS (29)	70 (toca) (30)	Herbívoro (29)	Espectro total (29)	Desértico 0,6 X 1,2 (29)
<i>Centrochelys sulcata</i>	25-35 (7)	40-75 (7)	Herbívoro (7)	Espectro total (7)	Desértico/semi-árido (7)
<i>Pseudemys concinna</i>	30 BS 24 (água) (31)	-	Omnívoro (31)	Espectro total (1)	Temperado 1,5 X 1,5 X 0,4 (água) (31)

Anexo 2 - Condições de manejo das espécies incluídas no presente trabalho (continuação).

- (1) Rossi, J. (2006). General husbandry and management. In Mader D.R., Reptile Medicine and surgery (2ª ed., pp. 25-41). Elsevier.
- (2) Basilisk Lizard Care And Information. Reptilemagazine.com. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Lizard-Care/Basilisk-Care/>
- (3) Cordylus tropidosternum. Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Scincoidea/Cordylidae/Cordylus-tropidosternum.html>
- (4) Correlophus ciliatus. Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Gekkota/Diplodactylidae/Correlophus-ciliatus.html>
- (5) Collared Lizards (Crotaphytus collaris). (Anapsid.org.) Disponível em: <http://www.anapsid.org/collared.html>
- (6) Western Collared Lizard Care Sheet. Disponível em: <http://www.lizardsarchive.com/care-sheets/western-collared-lizard.php>
- (7) Varga, M. (2004). Captive Maintenance and welfare. In Girling, S.J. & Raiti, P. (2004) BSAVA manual of reptiles (2ª ed., pp. 6-17). Quedgeley:BSAVA
- (8) Eublepharis macularius. Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Gekkota/Eublepharidae/Eublepharis-macularius.html>
- (9) Green Iguana Care Sheet. Reptilemagazine.com. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Care-Sheets/Lizards/Green-Iguana/>
- (10) Giant Day Gecko Care Sheet. Reptilemagazine.com. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Care-Sheets/Lizards/Giant-Day-Gecko/>
- (11) Phrynosoma.Org. Disponível em: <http://forum.phrynosoma.org/husbandryasio.html>
- (12) Recchio, I., Robertson-Billet, M., Rodriguez, C. & Haigwood, J. (2014). Captive husbandry and reproduction of Phrynosoma asio (Squamata: Phrynosomatidae) at the Los Angeles Zoo and Botanical Gardens. Herpetological Review. 45. 450-454.
- (13) Phrynosoma.Org. Disponível em: <http://forum.phrynosoma.org/husbandryplatyrhinos.html>
- (14) Reptilian smiles. Disponível em: <http://reptilian-smiles.webs.com/The%20Horned%20Lizard%20Manual.pdf>
- (15) Chinese Water Dragon Care. Reptilemagazine.com. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Chinese-Water-Dragon-Care/>
- (16) Pogona vitticeps. (2017). Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Iguania/Agamidae/Pogona-vitticeps.html>
- (17) Argentine Black & White Tegus. Reptilecare.com. Disponível em: <http://www.reptilecare.com/tegu.html>
- (18) Savannah Monitor Care Sheet. ReptiPro. Disponível em: <http://www.reptipro.com/care-sheets/lizards/64-savannah-monitor-varanus-exanthematicus-care-sheet.html>
- (19) Nile Monitor Care Sheet. ReptiPro. Disponível em: <http://www.reptipro.com/care-sheets/lizards/58-nile-monitor-varanus-niloticus-care-sheet.html>
- (20) Aspidites ramsayi. Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Serpentes/Pythonidae/Aspidites-ramsayi.html>
- (21) Rainbow Boa Care Sheet. Reptilemagazine.com. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Care-Sheets/Rainbow-Boa-Care-Sheet/>
- (22) TheHognosesnake.co.uk- care sheet, description, breeding and more. Thehognosesnake.co.uk. Disponível em: http://www.thehognosesnake.co.uk/hognose_snake_care_sheet.htm
- (23) TheKingSnake.co.uk- Common King Snake Care Sheet. Thekingsnake.co.uk. Disponível em: http://www.thekingsnake.co.uk/Common_king_snakes_care_sheet.htm
- (24) TheKingSnake.co.uk- Milk Snake Care Sheet. (2017). Thekingsnake.co.uk. Retrieved 8 June 2017, from http://www.thekingsnake.co.uk/Milk_snake_care_sheet.html
- (25) Honduran Milk Snake Care And Breeding. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Snake-Care/Milk-Snake-Care-And-Breeding/>
- (26) Carpet Python Care Sheet. Reptilemagazine.com. Disponível em: <http://www.reptilemagazine.com/Care-Sheets/Carpet-Python-Care-Sheet/>
- (27) Pantherophis guttatus. Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Serpentes/Pythonidae/Pantherophis-guttatus.html>
- (28) Python regius. Reptile-care.de. Disponível em: <http://www.reptile-care.de/species/Serpentes/Pythonidae/Python-regius.html>
- (29) Caring for a Russian Tortoise | Russian Turtle Caresheet | petMD. Disponível em <https://www.petmd.com/russian-tortoise-agrionemys-horsfieldii>
- (30) The Russian Tortoise Care Sheet. (2018). Disponível em https://www.russiantortoise.org/care_sheet.htm
- (31) Cooter Turtles. Disponível em <http://www.reptilemagazine.com/Turtles-Tortoises/Turtle-Care/Cooter-Turtles/>

Anexo 3 - Bibliografia adicional recomendada.

A - Identificação de parasitas:

Nematodes:

Yamaguti, S. (1961). *Systema helminthum* Vol. 3, The Nematodes of vertebrates. Nova Iorque: Interscience Publ.

Anderson, R., Chabaud, A., Willmott, S., & Gibbons, L. (2009). *Keys to the nematode parasites of vertebrates - Archival volume*. Wallingford, UK: CABI.

Gibbons, L. (2010). *Keys to the nematode parasites of vertebrates - Supplementary volume*. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI. - É um complemento e atualização à obra anterior.

Cestodes:

Khalil, L., Jones, A., & Bray, R. (2006). *Keys to the cestode parasites of vertebrates*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International.

Trematodes:

Hughes, R., Higginbotham, J., & Clary, J. (1942). *The Trematodes of Reptiles, Part I, Systematic Section*. *American Midland Naturalist*, 27(1), 109. doi: 10.2307/2421028

Bray, R., Gibson, D., & Jones, A. (2002). *Keys to the Trematoda - Vol. 1*. Wallingford, UK: CABI Pub. and the Natural History Museum.

Gibson, D., Bray, R., & Jones, A. (2005). *Keys to the Trematoda - Vol. 2*. Wallingford (UK): CABI Publishing.

B - Tratamento:

Funk, R.S. & Diethelm, G. (2006). *Reptile formulary*. In Mader, D. R., *Reptile Medicine and Surgery*. (2ª ed.). (pp. 1124 - 1125). Filadélfia: W. B. Saunders.

Gibbons, P. M., Klaphake, P. & Carpenter, J. (2012) *Reptiles*. In Carpenter, J., & Marion, C. *Exotic animal formulary* (4ª ed., pp. 94 - 99). Missouri: Elsevier.

C - Bem estar:

Warwick. (2014). *The Morality of the Reptile "Pet" Trade*. *Journal Of Animal Ethics*, 4(1), 74. doi: 10.5406/janimaethics.4.1.0074

Outras obras :

Kraus, F. (2009). Alien reptiles and amphibians. (1^a ed.). Dordrecht: Springer.

Dodd, C. (2016). Reptile ecology and conservation (1^a ed.). Oxford: Oxford University Press.

Anexo 4 - Preparação das soluções de flutuação.

A - Solução saturada de açúcar (Scullion & Scullion, 2009).

454g de açúcar.

355 ml de água destilada.

Aquecer a água e adicionar o açúcar. Mexer até o açúcar se dissolver e deixar a solução arrefecer.

Conservar a solução a 8°C e utilizá-la o mais brevemente possível para evitar o crescimento de fungos. Para aumentar o tempo de vida da solução podem ser adicionados seis ml de formaldeído.

B - Solução a 33% de Sulfato de Zinco (Scullion & Scullion, 2009).

386g de ZnSO_4

1l de água destilada

Adicionar o ZnSO_4 à água e misturar até se dissolver completamente.

Guardar a solução num frasco com tampa hermética para evitar a evaporação de água e consequente alteração da densidade específica da solução.

Anexo 5 - Protocolos de técnicas e colorações histopatológicas.

(Elaborados e gentilmente cedidos pela Técnica Sandra Carvalho do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa)

A - Protocolo de processamento de amostras histológicas no processador automático de tecidos Leica TP 1020®

1. Formalina - 1 hora (temperatura ambiente);
2. Álcool 70% - 1 hora (temperatura ambiente);
3. Álcool 95% - 1 hora 30 minutos (temperatura ambiente);
4. Álcool 95% - 1 hora 30 minutos (temperatura ambiente);
5. Álcool 100% - 1 hora (temperatura ambiente);
6. Álcool 100% - 1 hora 30 minutos (temperatura ambiente);
7. Álcool 100% - 1 hora 30 minutos (temperatura ambiente);
8. Xileno - 1 hora (temperatura ambiente);
9. Xileno - 1 hora (temperatura ambiente);
10. Xileno - 1 hora (temperatura ambiente);
11. Parafina – 2 horas (68°) ;
12. Parafina – 2 horas (68°).

B - Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina (H&E).

Reagentes:

- A- Hematoxilina de Gill 2 – (sigma-GHS 280)
- B- Eosina- Floxina – (sigma-HT110-3)

Procedimento:

1. Desparafinar – 15 minutos ;
2. Hidratar – 5 minutos ;
3. Hematoxilina de Gill 2 - 30 segundos ;
4. Lavar em água destilada ;
5. Lavar em água corrente tépida – 2 minutos ;
6. Álcool 70% - 1 minuto ;
7. Eosina-Floxina – 1 minuto ;
8. Desidratar, diafanizar e montar – 1 minuto ;

Anexo 5 - Protocolos de técnicas e colorações histopatológicas (continuação).

C - Protocolo de coloração Ácido Periódico-Schiff (Periodic acid–Schiff ou PAS)

Reagentes:

A - Solução Aquosa de Ácido Periódico a 1%:

- 1 gr de Ácido Periódico (Panreac – 122320);
- 100 ml de Água Destilada.

B - Reagente de Schiff (sigma – 3952016)

C - Hematoxilina de Gill 2 – (sigma-GHS 280)

Procedimentos:

- 1- Desparafinar – 15 minutos;
- 2- Hidratar – 5 minutos;
- 3- Solução aquosa de Ácido Periódico a 1% - 10 minutos;
- 4- Lavar bem em água destilada
- 5- Reagente de Schiff – 15 minutos;
- 6- Lavar em água corrente – 10 minutos;
- 7- Hematoxilina de Gill2 – 30 segundos;
- 8- Lavar em água corrente morna – 3 minutos;
- 9- Desidratar, diafanizar e montar.

D - Protocolo de coloração Ziehl-Neelsen

Reagentes:

A - Carbol Fucsina

B - Ácido Clorídrico

C - Azul de Metileno

- Azul de Metileno -1 gr
- Água destilada - 100ml

Procedimentos:

- 1- Desparafinar - 15 minutos
- 2- Hidratar - 5 minutos
- 3- Carbol-Fucsina (na estufa) - 30 minutos
- 4- Lavar em água corrente - 3 minutos
- 5- Diferenciar com uma solução de ácido clorídrico 0.5% em álcool a 70% até o corte ficar rosa pálido
- 6- Lavar em água corrente - 3 minutos
- 7- Contrastar com Azul de Metileno - 1 minutos
- 8- Lavar rapidamente em água corrente
- 9- Desidratar, diafanizar e montar

Anexo 6 - Fichas de colheita de dados.

A - Ficha de identificação e condições

Ficha individual de identificação do animal

Dados do animal

Numero ID

Nome comum

Espécie

Condição corporal 1 - Magro Sexo Macho
 2 - Normal Fêmea
 3 - Obeso Indet.

Observações
(terrário, outros animais...)

História pregressa
(sinais de doença, desparasitações...)

Tipo de amostra Fezes
 Sangue
 Cadáver

Fotos sim
 não

Data de recolha

Anexo 6 - Fichas de colheita de dados (continuação).

B - Ficha de parasitologia

Formulário de exame coprológico e relatório		Relatório
Formulário de necrópsia		<div style="border: 1px solid black; height: 300px;"></div>
Numero ID	<input type="text"/>	
Conservação da amostra	<input type="checkbox"/> refrigeração Se fixador, qual. <input type="text"/> <input type="checkbox"/> fixador	
Tipo de análise	<input type="checkbox"/> esfregaço NaCl <input type="checkbox"/> esfregaço Lugol <input type="checkbox"/> flutuação (ZnSO ₄) <input type="checkbox"/> flutuação (Sheather's) <input type="checkbox"/> outro	
Colorações específicas	<input type="checkbox"/> Ziehl-Neelson Se outro, qual. <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Giemsa <input type="checkbox"/> outro	
Observações (condições especiais da amostra, possíveis problemas dignos de registo)	<div style="border: 1px solid black; height: 100px;"></div>	
Fotos	<input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não	
Data de análise	<input type="text"/>	
		Data de relatório <input type="text"/>

Anexo 6 - Fichas de colheita de dados (continuação).

C - Ficha de necrópsia

Formulário de necrópsia e relatório

Formulário de necrópsia

Numero ID

Observações dignas de registo (condição geral e pele, olhos...)

Observações dignas de registo (timo, tireoide, para tireoide, cavidade oral)

Observações dignas de registo (sistema cardio-vascular)

Observações dignas de registo (aparelho respiratório)

Observações dignas de registo (aparelho digestivo)

Observações dignas de registo (fígado, pâncreas, baço)

Observações dignas de registo (aparelho genito-urinário)

Observações dignas de registo (Outros)

Tipo de amostra colhida

	Frasco seco	Água	Formol	Etanol 70%	Outro/AFA
Fezes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fígado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Estômago (tecido)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Estômago (conteúdo)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Intestino (tecido)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Intestino (conteúdo)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pulmão (tecido)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pulmão (conteúdo)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Rim	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Macro parasitas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

*Se Outro, qual/quais e método de colheita/preservação

Observações pós-necrópsia

Fotos Sim Não

Data de necrópsia

Relatório

Notas adicionais

Data de relatório

Anexo 7 - Tabelas de contingência dos testes de Fischer efetuados .

A - Temperatura - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	T _{desadequada}	T _{adequada}	T _{desadequada}	T _{adequada}	T _{desadequada}	T _{adequada}	T _{desadequada}	T _{adequada}
Positivo	26	8	29	10	22	3	25	3
Negativo	11	37	14	42	1	7	2	8
P-value	1.737e-06		2.662e-06		0.000202		0.0001257	
OR	10.53767		8.463772		41.68543		28.33099	
I.C. 95%	3.481698 - 35.579625		3.110654 - 24.957344		3.684605 - 2365.278062		3.649605 - 398.677676	

B - Água - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	A _{desadequada}	A _{adequada}	A _{desadequada}	A _{adequada}	A _{desadequada}	A _{adequada}	A _{desadequada}	A _{adequada}
Positivo	20	14	23	16	20	5	23	5
Negativo	5	43	7	49	3	5	5	5
P-value	4.895e-06		3.301e-06		0.03617		0.09011	
OR	11.83106		9.766261		6.201176		4.381227	
I.C. 95%	3.497586 - 48.240833		3.313039 - 32.418693		0.8752566 - 55.0302793		0.7175399 - 28.9166081	

C - Alimentação - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	AI _{desadequada}	AI _{adequada}	AI _{desadequada}	AI _{adequada}	AI _{desadequada}	AI _{adequada}	AI _{desadequada}	AI _{adequada}
Positivo	15	19	18	21	15	10	18	10
Negativo	5	43	9	47	5	3	7	3
P-value	0.0006537		0.002335		1		1	
OR	6.614283		4.398469		0.9028809		0.7766122	
I.C. 95%	1.937719 - 26.773950		1.575136 - 13.127878		0.113984 - 5.951236		0.1058847 - 4.4399446	

D - Limpeza - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	L _{desadequada}	L _{adequada}	L _{desadequada}	L _{adequada}	L _{desadequada}	L _{adequada}	L _{desadequada}	L _{adequada}
Positivo	24	10	26	13	20	5	22	6
Negativo	2	46	6	50	1	7	3	7
P-value	3.63e-10		2.53e-08		0.001234		0.01612	
OR	46.86296		16.0159		24.46041		7.96674	
I.C. 95%	9.352631 - 472.773763		5.141142 - 58.251111		2.364881 - 1309.887640		1.337024 - 63.267095	

Anexo 7 - Tabelas de contingência dos testes de Fischer efetuados (continuação).

E- Iluminação - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	I _{desadequada}	I _{adequada}	I _{desadequada}	I _{adequada}	I _{desadequada}	I _{adequada}	I _{desadequada}	I _{adequada}
Positivo	22	12	24	15	19	6	22	6
Negativo	0	48	5	51	0	8	2	8
P-value	1.079e-11		5.087e-08		0.0002163		0.001857	
OR	inf		15.71396		inf		13.37991	
I.C. 95%	17.64668 - inf		4.83133 - 62.16841		3.748362 - inf		1.990003 - 161.881013	

F- Condições de manutenção - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	C _{desadequada}	C _{adequada}	C _{desadequada}	C _{adequada}	C _{desadequada}	C _{adequada}	C _{desadequada}	C _{adequada}
Positivo	24	10	28	11	23	2	26	2
Negativo	1	47	4	52	0	8	1	9
P-value	8.393e-12		3.2e-11		3.241e-06		3.165e-06	
OR	103.8469		31.30637		inf		86.9668	
I.C. 95%	14.00845 - 4583.75652		8.696232 - 148.176535		9.349992 - inf		7.491328 - 5058.080156	

G - Tipo de terrário - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	Te _{naturalista}	Te _{minimalista}	Te _{naturalista}	Te _{minimalista}	Te _{naturalista}	Te _{minimalista}	Te _{naturalista}	Te _{minimalista}
Positivo	20	14	23	16	17	8	20	8
Negativo	4	44	6	50	3	5	5	5
P-value	9.811e-07		7.603e-07		0.2134		0.2629	
OR	15.06681		11.59525		3.397258		2.43558	
I.C. 95%	4.141012 - 71.057850		3.775455 - 41.312658		0.512971 - 27.642632		0.4317064 - 14.1106333	

H- Individual/ conjunto - Presença de parasitas

Parasitas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	M _{conjunto}	M _{individual}	M _{conjunto}	M _{individual}	M _{conjunto}	M _{individual}	M _{conjunto}	M _{individual}
Positivo	19	15	22	17	17	8	20	8
Negativo	0	48	3	53	0	8	1	9
P-value	9.416e-10		2.651e-08		0.000927		0.001867	
OR	inf		21.94585		inf		2.254232 1027.094597	
I.C. 95%	12.44844 - inf		5.623844 - 128.262303		2.660052 - inf		20.5431	

I - Presença de parasitas - Presença de sinais clínicos

S. clínicos	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Sim	26	2	31	7	22	1	25	2
Não	8	46	8	49	3	7	3	8
P-value	3.071e-12		3.076e-11		0.000202		0.0001257	
OR	68.37947		25.70681		41.68543		28.33099	
I.C. 95%	13.35215 - 694.28643		8.002682 - 96.325659		3.684605 - 2365.278062		3.649605 - 398.677676	

Anexo 8 - Prevalência absoluta, média estimada e com intervalo de confiança de 95% das formas parasitárias encontradas durante o rastreamento parasitológico.

Filo	Ophidia (n=46)			Sauria (n=33)			Testudines (n=3)			Total (n=82)		
	nº Positivos	Prevalência		nº Positivos	Prevalência		nº Positivos	Prevalência		nº Positivos	Prevalência	
		Média (%)	I.C. 95% (%)		Média (%)	I.C. 95% (%)		Média (%)	I.C. 95% (%)		Média (%)	I.C. 95% (%)
Amoebozoa	0	-	-	11	34,2	19,6 - 50,2	1	40,3	7,0-80,4	12	15,5	8,6 - 24,0
Apicomplexa	2	6,2	1,3 - 14,5	6	20,0	8,9-34,2	0	-	-	8	10,7	5,2-17,8
Ciliophora	0	-	-	9	28,5	15,1 - 44,2	2	60,0	19,1-93,6	11	14,3	7,8 - 22,3
Metamonada	1	4,2	0,5 - 11,3	13	40,1	24,8 - 56,5	1	40,3	7,0-80,4	15	19,1	11,5 - 28,1
Nematoda	2	6,2	1,3 - 14,5	17	51,3	35,2-67,6	3	79,7	46,7-100	22	27,4	18,4-37,4
Platyhelminthes	0	-	-	1	5,7	0,7-15,4	0	-	-	1	2,4	0,3-6,5
Total por grupo	5	12,5	4,8 - 22,8	25	74,3	58,9-87,2	3	79,7	46,7-100	33	40,5	30,3 - 51,1

Anexo 9 - Resumo das formas parasitárias encontradas durante o presente trabalho

Filo	Forma parasitária	Hospedeiro (n)	Teste
	Família..... gênero/espécie		
AMOEOBOZA	Quistos Entamoebidae		
	<i>Entamoeba</i> sp.	<i>Centrochelys sulcata</i> (1) <i>Eublepharis macularius</i> (2) <i>Iguana iguana</i> (6) <i>Pogona vitticeps</i> (3)	Esf Esf Esf Esf
	desconhecido (trofozoitos)	<i>Epicrates cenchria</i> (1)	Esf
	Oocisto Eimeriidae		
	<i>Choleoimeria pogonae</i>	<i>Pogona vitticeps</i> (2)	Esf,Flu
APICOMPLEXA	<i>Eimeria</i> sp.	<i>Cordylus tropidisternum</i> (1)	Esf,Flu
	<i>Isospora amphiboluri</i>	<i>Chlamydosaurus kingii</i> (1) <i>Pogona vitticeps</i> (3)	Esf,Flu Esf,Flu,Hist
	<i>Cryptosporidium</i> sp.	<i>Lampropeltis triangulum</i> (1) <i>Pantherophis guttatus</i> (2)	ZN ZN
	Desconhecido	<i>Phelsuma madagascariensis</i> (1) <i>Aspidites ramsayi</i> (1) <i>Python regius</i> (1)	Esf,Flu Esf Esf
	Trofozoito Balantiidae		
	<i>Balantidium testudinis</i>	<i>Centrochelys sulcata</i> (2)	Esf
CILIOPHORA	<i>Balantidium</i> sp.	<i>Iguana iguana</i> (6)	Esf
	Quisto Nyctotheridae		
	<i>Nyctotherus</i> sp.	<i>Eublepharis macularius</i> (1) <i>Pogona vitticeps</i> (2)	Esf,Flu Esf,Flu
	Trofozoito Nyctotheridae		
	<i>Nyctotherus</i> sp.	<i>Pogona vitticeps</i> (1)	Esf,Flu
METAMONADA	Trofozoito e Quisto desconhecido		
	Desconhecido	<i>Centrochelys sulcata</i> (1) <i>Crotaphytus collaris</i> (1) <i>Epicrates cenchria</i> (1) <i>Eublepharis macularius</i> (2) <i>Iguana iguana</i> (6) <i>Lampropeltis getula</i> (1) <i>Phelsuma madagascariensis</i> (1) <i>Pogona vitticeps</i> (3)	Esf Esf Esf Esf Esf Esf Esf Esf

Legenda: forma parasitária encontrada durante a análise de **Esf** - esfregaços diretos **Flu** - flutuações **Hist** - lâminas de histopatologia **Nec** - répteis à necrópsia.

**Anexo 9 - Resumo das formas parasitárias encontradas durante o presente trabalho
(continuação).**

NEMATODA	Adulto Pharyngodonidae		
	<i>Ozolaimus cf linstowi</i>	<i>Iguana iguana</i> (1)	Nec, Flu
	<i>Parapharyngodon</i> sp.	<i>Iguana iguana</i> (1)	Esf
	<i>Tachygonetria</i> sp.	<i>Centrochelys sulcata</i> (1)	Esf
	Larva Pharyngodonidae		
	desconhecido	<i>Centrochelys sulcata</i> (1) <i>Crotaphytus collaris</i> (1)	Esf Esf
	Ovo Pharyngodonidae		
	desconhecido	<i>Agrionemys horsfieldii</i> (1) <i>Centrochelys sulcata</i> (2) <i>Correlophus ciliatus</i> (2) <i>Crotaphytus collaris</i> (2) <i>Eublepharis macularius</i> (1) <i>Iguana iguana</i> (6) <i>Phrynosoma asio</i> (1) <i>Pogona vitticeps</i> (4)	Esf,Flu Esf,Flu Esf,Flu Esf,Flu Esf,Flu Esf,Flu,Hist Esf,Flu Esf,Flu
	Adulto Physalopteridae		
	<i>Skrjabinoptera phrynosoma</i>	<i>Phrynosoma platyrhinos</i> (2)	Nec,Flu
	Adulto Atractidae		
	<i>Atractis penneri</i>	<i>Phrynosoma platyrhinos</i> (1)	Nec
	<i>Atractis</i> sp.	<i>Iguana iguana</i> (1)	Esf
PLATYHELMINTHES	Larva Mesocestoididae		
	<i>Mesocestoides</i> sp.	<i>Phrynosoma platyrhinos</i> (1)	Nec,Hist
	Ovo Linstowidae		
<i>Oochoristica</i> sp.	<i>Physignathus cocincinus</i> (1)	Esf	

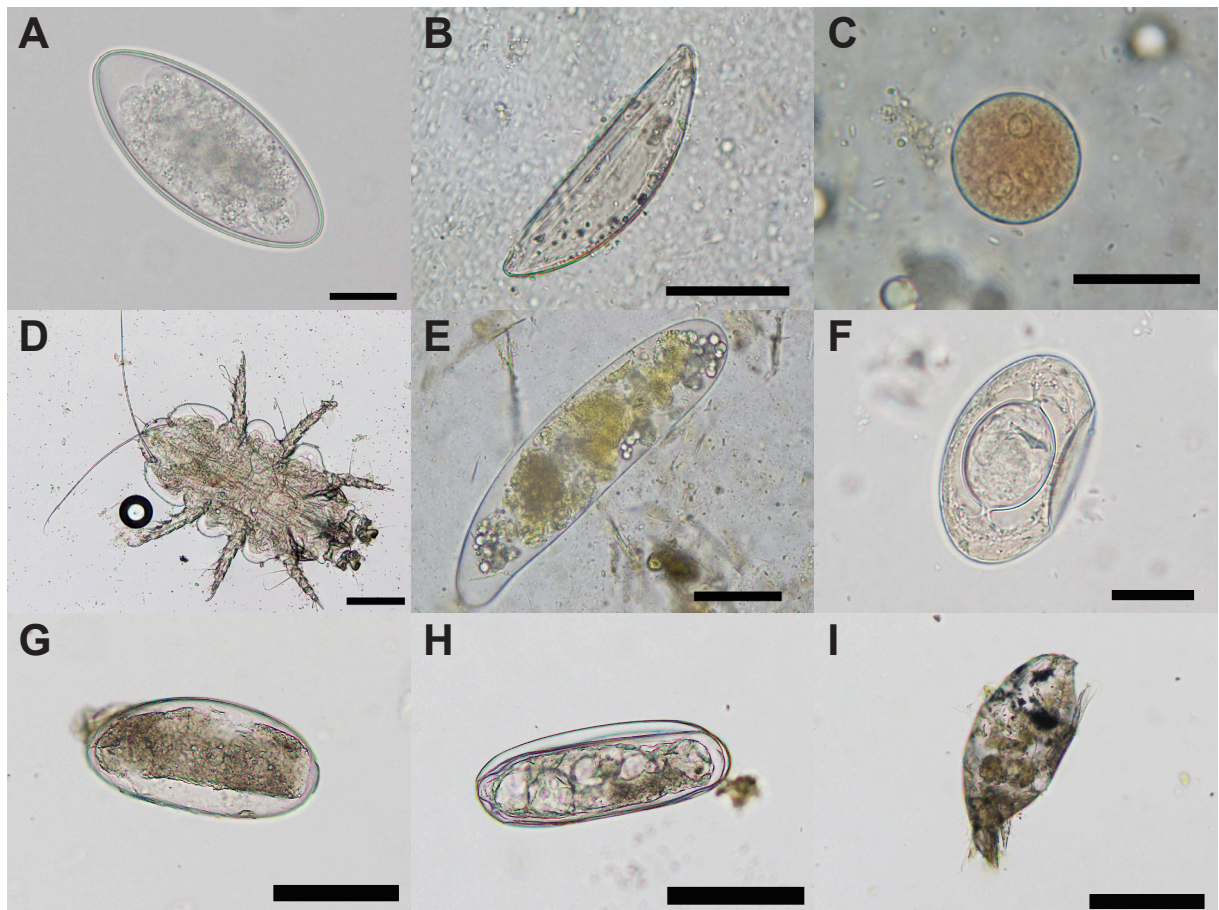
Legenda: forma parasitária encontrada durante a análise de **Esf** - esfregaços diretos **Flu** - flutuações **Hist** - lâminas de histopatologia **Nec** - répteis à necrópsia.

Anexo 10 - Resumo das lesões encontradas durante a análise histopatológica microscópica

Lesões histopatológicas - Órgão (nº com lesão / nº de colhidos)					
Estômago (6/38)	Intestino (32/40)	Fígado (33/40)	Rim (21/33)	Pulmão (21/29)	Outros órgãos (3/24)
Gastrite catarral (4)	Enterite catarral (20)	Congestão (17)	Nefrite intersticial multifocal (7)	Atelectasia (12)	Bexiga - Cistite catarral (1)
Gastrite linfoplasmocitária transmural + Granulomas (1)	Enterite necrosante (4)	Degenerescência macrovacuolar (17)	Congestão (7)	Congestão (7)	Língua - Glossite ulcerosa e purulenta de origem bacteriana (1)
Gastrite necrosante (1)	Congestão (3)	Colestase (13)	Nefrite serosa (2)	Pneumonia exsudativa (7)	Pâncreas - Congestão (1)
Hiperplasia mucípara das glândulas da mucosa (1)	Enterite linfoplasmocitária (1)	Degenerescência microvacuolar (6)	Calcificação a nível dos túbulos renais (1)	Bronquite catarral (1)	
	Enterite fibrinosa (1)	Edema (3)	Degenerescência macrovacuolar (1)	Edema alveolar (1)	
	Enterite diftérica (1)		Edema intersticial (1)	Hemorragia (1)	
	Hiperplasia mucípara (1)		Inflamação fibrinosa (1)	Pneumonia purulenta (1)	
			Nefrite necrótica (1)		
			Necrose tubular (1)		
			Nefrite urática (1)		

Anexo 11 - Alguns pseudoparasitas encontrados durante o presente estudo.

A - Ovo de *Aspicularis* cf. *tetraptera* (em serpente). **Escala** - 20 μ m. **B** - Ovo de *Syphacia* sp. (em serpente). **Escala** - 50 μ m. **C** - *Entamoeba* sp. (em serpente). **Escala** - 20 μ m. **D** - *Myobia musculi* (em serpente). **Escala** - 100 μ m. **E** - Ovo de tipo de *Myobia* (em serpente). **Escala** - 50 μ m. **F** -Ovo de *Rodentolepis* cf. *nana* (em serpente). **Escala** - 20 μ m. **G e H** - Ovo de ácaro de género desconhecido (em serpente). **Escala** - 100 μ m. **I** - Ácaro de género desconhecido (em serpente). **Escala** - 100 μ m. **J** - Ácaro de género desconhecido (lagarto). **Escala** - 100 μ m. **L e M** - Ovo de ácaro de género desconhecido (lagarto). **Escala** - 100 μ m. **N** - Provável ácaro de género desconhecido (em lagarto). **Escala** - 100 μ m. **O** - Provável quisto de *Malamoeba* sp. (em lagarto). **Escala** - 20 μ m. **P** - Estrutura vegetal e grão de pólen (em tartaruga). **Escala** - 50 μ m. Imagens originais.



Anexo 11 - Alguns pseudoparasitas encontrados durante o presente estudo (continuação).

