



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

SALMONELLA SP. EM RÉPTEIS DE COMPANHIA

ANA CARINA BRANCO CARVALHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d' Almeida
Bernardo

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

CO-ORIENTADOR

Mestre Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

SALMONELLA SP. EM RÉPTEIS DE COMPANHIA

ANA CARINA BRANCO CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Manuel d' Almeida
Bernardo

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

CO-ORIENTADOR

Mestre Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho

2016

LISBOA

DEDICATÓRIA

Aos meus avós maternos, Maria da Conceição Branco e António Quirino Branco.

Agradecimentos

Agradeço a todos os que, de uma forma ou de outra, sempre me acompanharam, com especial atenção:

- À Professora Doutora Manuela Oliveira, pela proposta para o estágio realizado e pela sua presença desde o primeiro dia nesta instituição;
- À Dra. Ana Reinho, pelo acompanhamento prestado no Hospital Escolar- FMV-ULisboa, pela aceitação de co-orientadora, pela sua transmissão de conhecimentos, apoio prestado, compreensão e paciência mesmo nas alturas mais críticas e ainda pela sua enorme simplicidade e amizade.
- A todos os colegas do Hospital Escolar- FMV-ULisboa que me acompanharam desde o primeiro dia, como recepcionista e aluna.
- À colega Carla Carneiro pelo apoio prestado durante o trabalho laboratorial e todos os técnicos que, directa ou indirectamente, permitiram a realização deste trabalho prático.
- A todos os professores desta instituição que me acompanharam durante o curso e que se mostraram verdadeiros educadores e formadores com especial atenção ao Professor Telmo Nunes pela sua enorme paciência e disponibilidade na parte estatística e a Professora Teresa Semedo pela ajuda na organização dos dados recolhidos. Não podia deixar também de agradecer ao Professor Doutor António Ferreira e ao Professor Doutor Luís Tavares pelo acompanhamento durante o curso e aos colaboradores da ACIVET que estiveram presentes neste meu percurso.
- Ao Dr. Filipe Dias e a todos os profissionais da clínica Vetexóticos, em especial a Dra. Ana Mendes, pelo grande entusiasmo demonstrado e pela sua colaboração nesta dissertação.
- A todos os donos pela autorização de colheita e pela participação neste projeto com especial destaque a dona do “Lindo” e do “Mendes”, Dona Sofia de Sousa, pela sua grande simpatia, disponibilidade e permissão de acesso à sua coleção.
- Por último, mas considerado o interveniente mais importante, ao meu namorado, Nelson Trepado, pelo apoio, ajuda e compreensão durante o curso e entusiasmo durante o estágio, pelas sempre curtas férias e pelos fins-de-semana passados na secretária.

A todos o meu sincero obrigado!

Resumo

Salmonella sp. é um dos géneros bacterianos zoonóticos mais frequentemente associados a toxinfecções alimentares a nível mundial. Apesar de os alimentos serem os principais veículos de transmissão e propagação de Salmonelose, estima-se que 6% dos indivíduos afetados tenham desenvolvido infeção através contacto direto ou indireto com animais exóticos. Uma vez que a nível nacional os dados existentes sobre transmissão de *Salmonella* por répteis serem escassos ou praticamente inexistentes, este trabalho surge com o objetivo de avaliar a prevalência de *Salmonella* sp. em répteis, doentes e clinicamente saudáveis, bem como avaliar o seu perfil de resistência a agentes antimicrobianos e perfil fenotípico de virulência. Neste estudo foi possível obter um total de 78 amostras de fezes por zaragatoa cloacal, originárias de diferentes espécimes de répteis (Ofídios n=8, Saurios n=27 e Quelónios n=43), no período de 8 de setembro a 31 de outubro de 2014. A partir destas amostras procedeu-se ao isolamento e identificação de *Salmonella* sp. por métodos bacteriológicos convencionais. Foi ainda realizada a caracterização do perfil de resistência a 12 compostos antimicrobianos utilizados na prática clínica veterinária na terapêutica de répteis e com uso descrito também em Medicina Humana, incluindo: Amoxicilina+Ácido clavulânico, Ampicilina, Penicilina, Amicacina, Gentamicina, Cloranfenicol, Ácido nalidíxico, Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Cefotaxima, Tetraciclina e Sulfametoxazole+Trimetroprim. A avaliação do perfil de resistência de cada isolado foi realizada pelo método de difusão em disco, tal como recomendado pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). A produção de exotoxinas, tais como, gelatinase, lipase, DNase e hemolisina, foi avaliada através de métodos fenotípicos. Foi possível obter 38 isolados identificados como *Salmonella* sp. (n=21) e *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae* (n=17). Os isolados obtidos apresentaram elevada resistência a Penicilina (n=37) e também resistência a Ampicilina (n=6) e Amoxicilina + Ácido clavulânico (n=5). Quatro isolados apresentaram resistência a dois compostos antimicrobianos e 6 isolados possuíam um perfil de multirresistência, caracterizado pela resistência a três ou mais compostos antimicrobianos com modo de ação distinto. Em relação ao perfil de virulência, foi possível verificar que 23 dos isolados obtidos eram produtores de DNase e que a totalidade dos isolados eram produtores de hemolisina e lipase. Em relação a gelatinase, nenhum dos isolados apresentou capacidade de produzir esta enzima.

Estes resultados permitem concluir que os répteis são potenciais veículos de transmissão de *Salmonella* sp., tanto para outros animais como para humanos, o que pode originar problemas de Saúde Pública uma vez que podem apresentar perfis de resistência e virulência elevados. Devido a estes fatores, aconselha-se aos donos, proprietários e criadores a implementar medidas de higiene e manejo adequadas ao tipo de réptil que possuam, de modo a evitar a disseminação deste agente microbiano.

Palavras- chave: répteis, resistência a antimicrobianos, salmonella, virulência

Abstract

Salmonella sp. is a zoonotic bacteria, frequently associated with foodborne infections worldwide. However, salmonellosis can be transmitted by other means, being estimated that 6% of all affected individuals have developed infection by direct or indirect contact with exotic animals. As existing data on *Salmonella* sp. transmission by reptiles in Portugal is extremely scarce, this work intended to evaluate *Salmonella* sp. prevalence in both clinically healthy and diseased reptiles, as well as evaluate the isolates' antimicrobial resistance and virulence profiles.

A total number of 78 cloacal samples was collected by swabbing different individuals (snakes n=8, lizards n=27, chelonians n=43), from September 8th to October 31st 2014. *Salmonella* sp. was isolated and identified by conventional bacteriological methods. Antimicrobial resistance profile was evaluated by the disk diffusion method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines, using 12 antimicrobial compounds commonly used in veterinary practice and also used in human medicine, as follows: amoxicillin+clavulanic acid, ampicillin, penicillin, amikacin, gentamicin, chloramphenicol, nalidixic acid, ciprofloxacin, enrofloxacin, cefotaxime, tetracycline and sulfamethoxazole+trimethoprim. The production of exotoxins such as gelatinase, lipase, DNase and hemolysin was evaluated by phenotypic methods.

It was possible to obtain 38 isolates identified as *Salmonella* sp. (n=21) and as *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae* (n=17). Isolates exhibited high levels of resistance to penicillin (97.4%) and low levels of resistance to ampicillin (15.8%) and amoxicillin+clavulanic acid (13.2%). Six isolates (15.8%) presented a multidrug resistance profile, characterized by resistance to three or more antimicrobial compounds with distinct modes of action. All isolates were able to produce Hemolysin and Lipase, 60.5% were able to produce DNase and none were able to produce Gelatinase.

Therefore, reptiles are potential vehicles of *Salmonella* sp. transmission, both for humans and other animals, as almost half of the sampled animals were found to be carriers of this bacterium. This may represent a significant public health problem, especially if these *Salmonella* sp. present antimicrobial resistance and virulence determinants. It is advisable for owners and breeders to implement hygiene and husbandry measures appropriate for each type of reptile, in order to prevent the spread of this zoonotic bacterium.

KEY-WORDS: antimicrobial resistance, reptiles, salmonella, virulence

ÍNDICE GERAL

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.Introdução e Objetivos.....	4
2.Salmonella spp.....	5
2.1 Isolamento e identificação de Salmonella sp. a partir de répteis.....	7
2.2. Fatores de virulência em Salmonella sp.	10
2.3. Perfil de resistência a compostos antimicrobianos em Salmonella sp.	12
3.Características da infecção por Salmonella sp. em Répteis.....	15
3.1. Fontes de contaminação.....	18
3.2.Fatores condicionantes ao desenvolvimento de infecção sistêmica.....	18
3.3. Sinais Clínicos e Diagnóstico de Salmonelose.....	20
3.4. Tratamento.....	21
3.4. Estratégias de prevenção.....	21
4. Características da infecção por Salmonella sp. em Humanos.....	23
4.1. Primeiros relatos e medidas implementadas.....	25
4.2. Características da infecção transmitida por répteis.....	30
4.3.Vias de Transmissão.....	30
4.3.1.Transmissão oro-fecal.....	30
4.3.2. Transmissão por dentada.....	31
4.3.3. Transmissão por alimentos fornecidos a répteis.....	31
4.3.4. Estratégias de Prevenção.....	31
4.4 Diagnóstico.....	32
4.5. Tratamento.....	33
5. Materiais e Métodos.....	35
5.1.Objectivos do estudo.....	35
5.2. Amostragem.....	35
5.3.Isolamento e identificação de Salmonella sp.	35
5.4. Serotipagem.....	38
5.5 Teste de sensibilidade a antibióticos.....	39

5.6. Avaliação fenotípica da produção de fatores de virulência	40
5.6.1. DNase	40
5.6.2. Gelatinase	40
5.6.3. Hemolisina	41
5.6.4. Lipase	41
5.7. Isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de amostras de alimento e ambientais	41
5.8. Análise estatística	42
6. Resultados e Discussão	43
6.1. Amostragem e isolamento bacteriano	43
6.2 Serotipagem	46
6.3 Fatores que podem condicionar a excreção de <i>Salmonella</i> sp.	47
6.4. Teste de sensibilidade a antibióticos	51
6.5. Fatores de virulência	53
6.6. Dendrograma	53
6.7. Isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de alimento vivo- Baratas	55
7. Conclusão	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS.....	63
ANEXO I	63
ANEXO II	65
ANEXO III	66
ANEXO IV	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da infecção por Salmonella Typhimurium enteropatogénica. Esta recorre ao uso de flagelo para colonização do hospedeiro e do lúmen intestinal por movimentação directa para o epitélio intestinal. A ligação ao epitélio intestinal ocorre pelo uso de uma grande variedade de adesinas e pela secreção de proteínas efectoras. Existe sobrevivência da bactéria e a replicação em vacúolos no interior das células epiteliais e fagócitos.(Adaptado de Erhardt & Dersh,2015)	10
Figura 2 - A qualidade do manejo realizado condiciona a excreção de Salmonella sp. para o ambiente (imagem cedida por: Shirley Wiggins)	18
Figura 3 Crianças com idade inferior a 5 anos constituem um grupo de risco para a infecção por Salmonella sp. transmitida por Répteis (imagem cedida por Shirley Wiggins).	25
Figura 4 Aspeto de colónias sugestivas da presença de Salmonella sp. nas amostras testadas em Agar XLD (A) e Agar Hektoen (B).	37
Figura 5 Teste de sensibilidade a antibióticos realizado através do método de difusão me disco.	39
Figura 6. Placas de DNase test agar após incubação. Resultado negativo à esquerda e positivo à direita.	40
Figura 7. Placa de gelatinase test agar obtida após incubação.	40
Figura 8. Presença de β -hemólise em placas de agar- sangue após o período de incubação.	41
Figura 9. Aspecto da caixa de Petri após o período de incubação onde se pode observar a degradação lipídica total.	41
Figura 10- Resultados obtidos por serotipagem: Resultado positivo (à esquerda) e resultado negativo (à direita).	47
Figura 11. Dendrograma obtido com auxílio do BioNumerics 6.6 (coluna isolados: AZUL- Animais de loja VERDE-Animal de companhia; VERMELHO- Rotina; AMARELO- Consulta	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do número de animais amostrados por grupo taxonómico	43
Gráfico 2 Distribuição dos ofídios amostrados por espécie	43
Gráfico 4 Distribuição das amostras obtidas em Quelónios por espécie	44
Gráfico 3 Distribuição dos Saúrios amostrados por espécie	44
Gráfico 5. Resultados obtidos em API-20E dos isolados obtidos.	46
Gráfico 6 Distribuição etária dos animais amostrados em que o isolamento foi negativo	49
Gráfico 7 Distribuição etária dos animais amostrados em que o isolamento foi positivo	49
Gráfico 8 Distribuição do número de quelónios amostrados por dono	50
Gráfico 9 Distribuição do número de saúrios e ofídios amostrados por dono	51
Gráfico 10 - Perfil de suscetibilidade dos isolados <i>Salmonella</i> sp. em estudo relativamente a 12 compostos antimicrobianos. (AK-Amicacina ;CN-Gentamicina;AMC-Amoxicilina+ ácido clavulânico;P-penicilina;C-Cloranfenicol; NA-Ácido nalidixico; CIP-Ciprofloxacina; ENR-Enrofloxacina; CTX-Cefotaxima;TE-Tetraciclina;SXT-Sulfametoxazole-trimetoprin)	52
Gráfico 11 Resultados obtidos em testes em placa referentes a avaliação dos fatores de virulência dos isolados obtidos	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação taxonómica do género <i>Salmonella</i> (Adaptado de Quinn, Carter, Donnelly & Leonard, 2002)	6
Tabela 2-:Principais diferenças entre salmonelose tifoide e salmonelose não tifoide (adaptado de: Gal-Mor, Boyle & Grassl, 2014) (P.I.- Período de incubação)	24
Tabela 3-Algumas recomendações gerais de prevenção da transmissão de <i>Salmonella</i> sp. por répteis para humanos, segundo o CDC (adaptado de: The center for food security & public health,2013)	32
Tabela 4-Padrão de crescimento de alguns géneros de Enterobacteriaceae em Agar TSI e “Urease Broth”. (adaptado de: Quinn., Carter, Donnelly & Leonard, 2002)(+)- Reação positiva; (-)- Reação negativa	38
Tabela 5 Avaliação dos fatores de risco associados à excreção de <i>Salmonella</i> sp. nos animais amostrados.....	48
Tabela 6- - Percentagens relativas de isolamento distribuídas pelas condições de colheita	51

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1- Agentes patogénicos de maior importância veterinária pertencentes à família Enterobacteriaceae. (Adaptado de Quinn, Carter, Donnelly & Leonard, 2002)	6
Esquema 2- Classificação taxonómica da Classe Reptilia (adaptado de: Jacobson, 2007) ..	15
Esquema 3- A presença de Salmonelose latente ou subclínica deve-se a presença de fatores desencadeantes (adaptado de: Fornazi & Teixeira, 2009)	17
Esquema 4 - Fluxograma de isolamento de <i>Salmonella</i> sp. em amostras provenientes de répteis. (Adaptado de Hendriksen, 2003).....	36

LISTA DE SIGLAS

AK- Amicacina

AMP- Ampicilina

C- Cloranfenicol

CDC- Centers for Disease Control and Prevention

CFSPH - The center for food security & public health

CIM-concentração mínima inibitória

CIP- Ciprofloxacina

CLSI- Clinical & Laboratory Standards Institute

CN- Gentamicina

CTX- Cefotaxima

EFSA - European Food Safety Authority

ENR- Enrofloxacin

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

FMV- Faculdade de Medicina Veterinária

ICNF- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

LPS- lipopolissacarídeos

NA- ácido nalidíxico

NTS- *Salmonella* não tifoide

PCR- Polymerase chain reaction

P-Penicilina G

RAS- Reptile associated Salmonellosis

SPM- Sociedade Portuguesa de Microbiologia

SXT- Sulfametoxazole-trimetoprim

TE- Tetraciclina

TSA- teste de sensibilidade a antibióticos

TSI -Triple Sugar Iron agar

ULisboa- Universidade de Lisboa

STH- Sulfametoxazole-trimetoprim

XLD- Xilose Lisina Deoxicolato

DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

1. Introdução

O estágio curricular trata-se de uma etapa crucial do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV), tendo este sido realizado no período de 1 de outubro de 2014 e finalizado na data de 31 de março de 2015. Durante o intervalo referido foram realizadas actividades, tais como, recolha de material biológico e posterior isolamento e caracterização do isolado obtido sendo que estas últimas decorreram no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV- ULisboa) sob a orientação da Professora Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira e co-orientação da Mestre Ana Teresa Severino Caldeira Reisinho. No laboratório de Microbiologia e Imunologia é são realizados procedimentos de isolamento e caracterização de amostras biológicas diversificadas e provenientes do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV) e amostras externas. Este laboratório é constituído por 2 bancadas de trabalho principais, que possuem bico de *Bunsen*, uma bancada com lavatório onde foram realizadas as colorações Gram, uma *hotte* e 2 estufas, principalmente.

No estágio curricular em causa foi ultrapassado o número mínimo de horas indicado sendo estimado que tenham sido realizadas aproximadamente um total de 720 horas dedicadas a trabalho prático laboratorial.

O plano de actividades desenvolvido teve como objetivos a aquisição e aprofundamento de conhecimentos e aptidões relacionadas com a clínica de répteis assim como a prática na área de microbiologia veterinária que decorreu durante os 7 meses indicados em ambiente laboratorial.

2. Descrição das actividades desenvolvidas durante o estágio

Durante o período de 8 de Outubro a 31 de Novembro foi possível recolher amostras de diferentes ordens de répteis, incluindo Quelónios (n=43), Saurios (n=27) e Ofídios (n=8), totalizando um conjunto de 78 amostras. Em relação aos Quelónios, pertencentes à ordem Chelonia, a distribuição do número de indivíduos amostrados por espécie não foi homogénea, no entanto, foi praticável a recolha nas seguintes espécies: *Geochelone sulcata* (n=3), *Chelonoidis carbonaria* (n=2), *Graptemys pseudogeographica* (n=2), *Sternotherus odoratus* (n=1), *Testudo hermanni* (n=1), *Testudo horsfieldii* (n=1), *Traquemys scripta* (n=20), *Trachemys dorbigni* (n=1) e *Pseudemys* spp. (n=11). Em relação aos indivíduos pertencentes à ordem Squamata, no caso dos ofídios foi possível a realização de colheita em *Python regius* (n=3) e em *Pantherophis guttatus guttatus* (n=5) enquanto que em relação aos Saurios as

amostras sujeitas a isolamento eram provenientes de indivíduos das seguintes espécies: *Basiliscus basiliscus* (n=1), *Chamydosaurus kingii* (n=3), *Ctenosaura quinquecarinata* (n=3), *Grenosaurus major* (n=2), *Hydrosaurus amboinensis* (n=1), *Iguana iguana* (n=2), *Physignatus cocincinus* (n=3), *Physignatus lesueurii lesueurii* (n=2), *Pogona vitticeps* (n=8), *Tupinambis rufescens* (n=1) e *Sauromalus ater* (n=1). Não se obteve também homogeneidade na amostragem obtida na ordem Squamata.

As amostras foram colhidas em 3 situações diferentes e por diferentes intervenientes, tendo sido possível a execução da recolha durante a realização de consultas de rotina e de acompanhamento realizadas no Hospital Escolar FMV, recolhidas diretamente pela autora da dissertação, por colegas médicos veterinários e por particulares. Os animais amostrados habitavam na zona da Grande Lisboa e Margem Sul do Tejo, até à península de Setúbal. Em relação as amostras provenientes da região da Grande Lisboa grande parte destas foram colhidas na zona de Loures, Póvoa de Santo Adrião, Cacém e Lisboa. A amostragem proveniente da Margem Sul do Tejo pertencia a animais da zona da Charneca da Caparica, Moita, Feijó, Almada, Coina e Palmela. No entanto, a origem dos animais amostrados é desconhecida. Não foi possível realizar colheitas a animais de pequenas dimensões, devido a dimensão da cloaca, sendo que o animal mais novo possuía 1 ano de idade. Após o momento da recolha era realizado um pequeno questionário em que foram registados aspetos relevantes como, por exemplo, idade, número de pessoas com contacto diário, se tinham sido recentemente adquirido, data da última desparasitação, data da última hibernação e ainda antibioterapia realizada previamente.

Todas as amostras foram recolhidas por zaragatoa cloacal estéril sem meio, tendo sido realizado o armazenamento em ambientes de refrigeração, imediatamente após a recolha, até ao início do isolamento.

As amostras eram sujeitas a pré-enriquecimento, em água peptonada (APT) até 2 dias após a colheita. Como meios de enriquecimento, direcionados para o isolamento do género bacteriano em questão, foram utilizados Caldo Rappaport Vassiliadis e Caldo Tetrathionato Muller-Kaufmann. Após a produção destes meios de enriquecimento seletivo era necessária a sementeira em ágar XLD e ágar Hecktoen. Todos os meios referidos foram produzidos através de formulações comerciais em pó armazenadas à temperatura ambiente no laboratório. Os meios eram produzidos pela adição de água bidestilada, após pesagem, e posterior autoclavagem, consoante a necessidade de uso. Após este processo os meios líquidos, após arrefecimento eram armazenados em refrigeração até utilização, enquanto que os meios que continham ágar eram distribuídos por caixas de Petri em *hotte*. Após a distribuição e arrefecimento do ágar em caixas de Petri estas eram acondicionadas e mantidas a temperatura de refrigeração até a data de utilização.

Após a produção destes meios existiu a produção de ágar Triple Sugar Iron ágar (TSI) e “Urea Broth” que foram executados conforme os procedimentos já referidos, mas com a diferença que a distribuição foi realizada em tubos de ensaio e que em ágar TSI a gelose obtida era inclinada. A coloração de Gram era realizada também no laboratório, na bancada que possuía lavatório, utilizando reagentes comerciais (Cristal-violeta, Solutio de Lugol, Etanol-Acetona e Safranina). O API-20E e caixas ágar-sangue eram obtidos comercialmente e prontos para utilização. O ágar Muller-Hinton, utilizado aquando do teste de sensibilidade a antibióticos, foi também produzido consoante a necessidade de utilização e após adição de água bidestilada e autoclavagem era distribuído, em *hotte*, por caixas de Petri. Em relação aos meios usados na caracterização fenotípica de fatores de virulência, a DNase test agar, Gelatinase test agar e Spirit Blue agar foram produzidos conforme as indicações do fabricante, sendo que no caso da DNase test agar foi necessário realizar a suplementar com azul de toluidina 0,01% e no Spirit Blue Agar foi suplementado com Tween 80 (30g/L). Estes meios foram, após autoclavagem, distribuídos por placas de Petri em condições semelhantes as dos outros meios já referidos. Foram também utilizadas caixas de ágar-sangue que foram obtidas comercialmente como também já referido. Todo o material utilizado que poderia ser reutilizado era encaminhado para a Unidade de Preparatório de Piso onde era lavado e esterilizado. Todos os materiais que não podiam ser reutilizados após utilização, como caixas de Petri, ansas, entre outros, eram acondicionados em contentores indicados para o efeito dado que risco de contaminação que poderia advir da exposição a estes materiais.

Este trabalho permitiu a aprendizagem de competência de básicas na área da microbiologia veterinária, a execução de procedimentos de isolamento indicados para géneros bacterianos suspeitos no enquadramento da espécie, amostra biológica obtida e patologias presentes e sua caracterização a nível do perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana e de produção de alguns dos fatores de virulência importantes ao desenvolvimento da invasão e colonização bacteriana no hospedeiro.

3. Publicações

A investigação desenvolvida permitiu também que durante o período de estágio tenha sido possível redigir um artigo de divulgação científica. Este artigo foi incluído no Magazine da Sociedade Portuguesa de Microbiologia (SPM) com o objetivo de divulgar os aspetos gerais da presença de *Salmonella* sp. em répteis, vias de transmissão e principais medidas preventivas possíveis de implementar. O Abstract do anterior artigo foi aceite para apresentação de poster no Congresso Nacional de Microbiologia, Microbiotec, 2015.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.Introdução e Objetivos

Nos últimos anos tem crescido consideravelmente a percentagem de animais exóticos detidos como animais de estimação. São cada vez mais os interessados em adquirir um animal ou espécie distinta do cão e gato como animal de estimação, o que contribui para o aumento do interesse em répteis. As razões para este aumento incluem o estilo de vida ocupado atual que leva à ausência durante grande parte do dia das residências e os custos consideráveis a nível de cuidados diários e também médicos veterinários no caso dos cães e gatos. No entanto, embora os custos e tempo necessário a disponibilizar a um animal exótico sejam geralmente menores, as necessidades inerentes à manutenção do estado hígido do animal são também diferentes e muitas espécies têm exigências ambientais e alimentares bastante específicas. Quando estas necessidades não são satisfeitas, muitas vezes por desconhecimento do proprietário, surgem várias perturbações nutricionais e também de manejo que podem dar origem uma situação de doença.

Nos répteis, a salmonelose é apenas uma das doenças que se podem manifestar, mas dado o seu potencial zoonótico tem sido alvo de destaque por parte da comunidade científica e por parte de entidades relacionadas com a manutenção da Saúde Pública Veterinária, como é o caso do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

Embora seja reconhecida a sua importância pela comunidade científica, as implicações envolvidas na potencial transmissão de *Salmonella* sp. por répteis são desconhecidas pelos proprietários e pela população em geral. Apesar de existirem alguns estudos que descrevem o isolamento e caracterização desta bactéria em répteis e alguns casos documentados de infeção em humanos por répteis, estes não são ainda suficientes para a compreensão total desta problemática. Em Portugal, à semelhança de grande parte dos países europeus, não parecem existir registos oficiais de Salmonelose transmitida por répteis em humanos nem estudos recentes publicados sobre este assunto.

Estas razões conduziram à escolha do tema desta dissertação. Foram recolhidas amostras pertencentes a répteis mantidos como animais de estimação, com o objetivo de avaliação dos fatores de risco para os proprietários da presença de *Salmonella* e fornecimento de informação aos mesmos sobre as medidas de prevenção que poderiam ser implementadas.

2. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um género bacteriano pertencente à família Enterobacteriaceae, tendo sido descrito por Daniel Elmer Salmon, em 1885, após isolamento a partir de material biológico obtido em Suíno (Annous & Gurtler, 2012). As bactérias pertencentes a esta família são Gram-negativas anaeróbias facultativas (The center for food security & public health [CFSPH], 2013), não formadoras de esporos apresentando forma bacilar, com 2-5 µm de comprimento e 0,8 a 1,5 µm de largura (Annous & Gurtler, 2012).

Estas bactérias possuem uma temperatura ótima de crescimento de aproximadamente 37°C. Bioquimicamente, são oxidase negativas e fermentadoras de glucose e de outros açúcares, tais como, manitol, maltose e sorbitol não sendo fermentadoras de lactose. São também catalase positivas, e apresentam capacidade de se multiplicar em Agar de MacConkey, uma vez que a sua multiplicação não é inibida pelos sais biliares presentes neste meio (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2002).

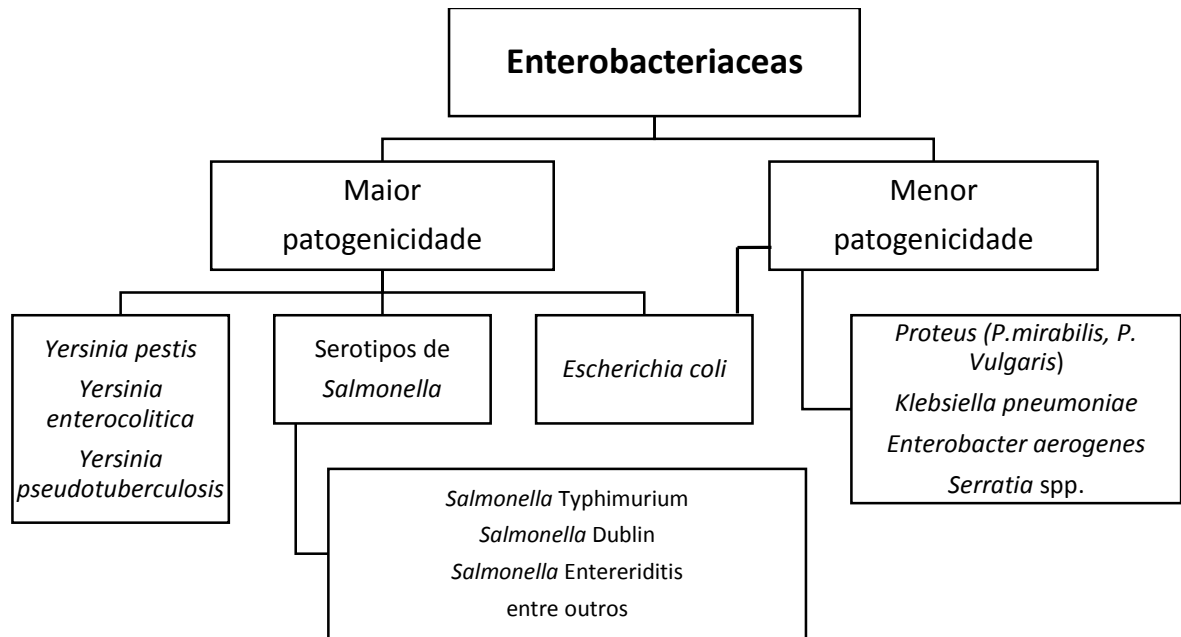
A maioria dos microrganismos pertencentes a esta família realiza a redução de nitratos a nitritos e possuem mobilidade proporcionada por flagelos peritricos.

Esta família inclui mais de 28 géneros e cerca de 80 espécies bacterianas, sendo que menos de metade dos géneros apresenta importância a nível da medicina veterinária (Quinn *et al.*, 2002). Segundo Quinn *et al.* (2002), a família Enterobacteriaceae pode ser dividida em 3 categorias principais: agentes patogénicos, oportunistas e não patogénicos. A espécie *Escherichia coli* e os géneros *Salmonella* sp. e *Yersinia* spp. considerados patogénicos podem causar tanto doença entérica como doença sistémica. Enterobacteriaceae sem significado patogénico, como *Erwinia* e *Hafnia*, podem ser isoladas a partir de amostras de fezes e ambientais e dado o seu carácter oportunista podem ser responsáveis por causar doença em outras localizações que não o trato gastrointestinal. (Quinn *et al.*, 2002) (Esquema 1).

Salmonella sp. é ubiqüitária, com distribuição a nível mundial, sendo que alguns serotipos podem estar associados a determinados nichos ecológicos. (Annous & Gurtler, 2012).

O género *Salmonella*, que apresenta cerca de 2541 serotipos, divide-se em 2 espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* inclui 6 subespécies: *Salmonella enterica* subsp. Enterica (I), *S. enterica* subsp. Salamae (II), *S. enterica* subsp. Arizonae (IIIa), *S. enterica* subsp. Diarizonae (IIIb), *S. enterica* subsp. Houtenae (IV) e *S. enterica* subsp. Indica (VI). A maioria dos serotipos potencialmente patogénicos para humanos e animais correspondem a *Salmonella enterica* subsp. Enterica. Em termos gerais a subsp. I pode ser encontrada em animais endotérmicos enquanto as subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI, juntamente com *Salmonella bongori*, estão presentes no ambiente e em animais poiquilotérmicos, como é o caso dos répteis (Annous & Gurtler, 2012) (Tabela 1).

Esquema 1- Agentes patogénicos de maior importância veterinária pertencentes à família Enterobacteriaceae. (Adaptado de Quinn, Carter, Donnelly & Leonard, 2002)



Este género é composto por estirpes não fermentadoras de lactose, com a exceção de *S. enterica* subsp. *Arizonae*, que apresenta capacidade fermentadora deste açúcar. A maioria dos serotipos pertencentes ao género produzem sulfureto de hidrogénio (H₂S) em grande quantidade, com exceção de *Salmonella Paratyphi* e *Salmonella Cholerasuis* (Mitchell & Shane, 2001).

Nos Estados Unidos, as bactérias deste género são anualmente responsáveis por 1,4 milhões de casos de toxinfecção que provoca aproximadamente 400 casos de evolução fatal (Harris, Neil, Behravesh, Sotir & Angulo, 2010). Na União Europeia cerca de 90000 casos são reportados por ano segundo a European Food Safety Authority (EFSA).

Tabela 1- Classificação taxonómica do género *Salmonella* (Adaptado de Quinn, Carter, Donnelly & Leonard, 2002)

Espécies		Número de serotipos
<i>Salmonella enterica</i>	Subespécies	
	<i>enterica</i> (I)	1504
	<i>salamae</i> (II)	502
	<i>arizonae</i> (IIIa)	95
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	333
	<i>houtenae</i> (IV)	72
	<i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i>		22
Total		2541

Salmonella sp. está, geralmente, presente no intestino dos animais endo e poiquilotérmicos e a maioria dos animais infetados acabam por se tornar excretores subclínicos e portadores assintomáticos (Quinn, Carter, Markey & Carter, 1999). Após a sua excreção, esta bactéria pode sobreviver cerca de 9 meses, no meio ambiente, principalmente se se verificar condições de humidade e temperaturas favoráveis para a sua multiplicação. Pode persistir no solo, água, partículas fecais e até rações para animais, especialmente as que utilizam como matéria prima osso, sangue e farinha de peixe (Quinn *et al.*, 1999). De facto, já foi descrito o seu isolamento num aquário de répteis onde já não habitava qualquer animal há mais de seis semanas (CFSPH, 2013).

Tem sido encontrado um grande número de serotipos em diversos isolados a partir em répteis, incluindo *Salmonella* Chameleon, Java, Marina, Poona, Stanley e Typhimurium, entre outros. As bactérias pertencentes as espécies *S. bongori*, *S. enterica* subsp. *Salamae*, *S. enterica* subsp. *Arizonae*, *S. enterica* subsp. *Diarizonae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae*, *S. enterica* subsp. *Indica*, são usualmente encontrados em animais poiquilotérmicos (incluindo répteis, anfíbios e peixes) e no ambiente. Alguns destes serotipos foram esporadicamente associadas a doença em humanos (CFSPH, 2013).

Embora os serotipos não apresentem especificidade de hospedeiro a subespécie III (*S. Arizona*) é isolada de ofídios, enquanto que a subespécie IV (*S. Marina*) é muitas vezes isolada mais frequentemente a partir de iguanas (Warwick, Lambiris, Westwood & Steedman, 2001).

2.1 Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. a partir de répteis

A colheita de amostras para análise bacteriológica a partir de répteis deve ser realizada o mais assepticamente possível, e qualquer tratamento em curso ou recentemente efetuado deve ser registado na altura da colheita. Animais sujeitos a antibioterapia na altura da colheita, podem originar resultados falsos-negativos. Após colheita, as amostras devem ser mantidas a temperatura de refrigeração (+4°C) e o processo de isolamento deve iniciar-se o mais rapidamente possível (Quinn *et al.*, 1999).

O diagnóstico é realizado através de cultura microbiológica a partir de fezes ou zaragatoas cloacais.

Em primeiro lugar, a amostra colhida é colocada num meio de pré-enriquecimento não seletivo (água peptonada tamponada) que permite aumentar a possibilidade de recuperação de bactérias pertencentes ao género *Salmonella* sp. que estiveram submetidas a condições menos favoráveis no período após a colheita (Mitchell & Shane, 2001). No entanto, existem estudos que indicam que este pré-enriquecimento diminui a possibilidade de recuperação de bactérias do género *Salmonella* sp. em amostras cloacais recolhidas de Tartarugas (Mitchell & Shane, 2001).

Os meios líquidos de enriquecimento selectivo, usados após o enriquecimento não selectivo, devem ser seleccionados de acordo com as subespécies de *Salmonella* sp. a isolar. Geralmente, os meios líquidos utilizados incluem o meio Tetracionato com ou sem adição de verde brilhante, meio modificado de Rappaport-Vassiliadis e meio de Selenito Cistina. O meio de Tetracionato pode inibir a multiplicação de certos serótipos de *Salmonella* sp. quando a amostra é muito pequeno. O meio de Selenito Cistina é tóxico para *Salmonella Choleraesuis*. O enriquecimento selectivo usando o meio de Rappaport tem sido usado consistentemente para enriquecimento de *Salmonella* sp. em amostras suspeitas de diferentes origens. (Mitchell & Shane, 2001).

Meios seletivos como Agar de MacConkey e Agar Eosina azul de metileno normalmente utilizadas no isolamento de Enterobacteriaceae têm baixa seletividade. Para o isolamento de *Salmonella* sp., devem ser selecionados meios com seletividade média a alta, tais como: Desoxycholate citrate, Xilose Lisina Deoxicolato (XLD), xylose-lysine tergitol 4, Rambach e Salmonella-Shigella agar (Mitchell & Shane, 2001). Estes meios contêm geralmente um composto indicador que permite a identificação macroscópica de colónias presuntivas de *Salmonella* sp. (Quinn *et al.*, 1999). No caso do XLD agar, apresenta na sua composição vários açúcares, tais como xilose, lactose e sacarose. A presença de vermelho fenol, como indicador de pH, o meio fica vermelho e não amarelo na presença da bactéria, por o pH se manter alcalino (Quinn *et al.*, 1999).

As colónias suspeitas resultantes do crescimento dos meios anteriormente referidos podem ser inoculadas em Triple Sugar Iron agar (TSI), sendo o meio de eleição para diagnóstico presuntivo de *Salmonella* sp. mas também para diferenciação de outras Enterobacteriaceae (Quinn *et al.*, 1999). O TSI agar apresenta na sua composição três açúcares principais: lactose (1,0%), sucrose (1,0%) e glucose (0,1%). Como indicador este meio possui vermelho fenol, quando o pH é maior ou igual a 7,3 este apresenta-se vermelho, no caso de ocorrerem reacções de acidificação, em que o pH pode ser igual o menor que 6,8, o meio torna-se amarelado (Quinn *et al.*, 1999). Outro componente deste meio é a adição de sulfato ferroso conjuntamente com tiosulfato de sódio para detectar a produção de sulfeto de hidrogénio. No meio TSI há ainda adição de Lisina. Quando da inoculação de *Salmonella* sp., ocorre a descarboxilação deste aminoácido, com produção de sulfeto de hidrogénio (H₂S). Para uma interpretação geral do TSI, temos que ter em conta as seguintes possibilidades de resultados:

- Rampa vermelha (meio alcalino) e fundo amarelo (ácido): apenas fermentação da glucose
- Rampa amarela (ácida) e fundo amarelo (ácido): lactose e/ ou sucrose gastas tal como a glucose
- Meio enegrecido: produção de sulfeto de hidrogénio.

A maioria das espécies de *Salmonella* quando inoculadas em TSI agar dão origem ao seguinte padrão: rampa vermelha, fundo amarelo com produção de H₂S correspondendo à anotação: R/Y/ H₂S+ (Quinn *et al.*, 1999).

Em certas condições pode existir necessidade de realizar em paralelo o teste de produção da urease, usando o meio “Urea Broth”. Este meio é utilizado quando é necessário fazer diferenciação de microrganismos em que há capacidade de produção de urease. Este meio é especialmente útil quando é necessário fazer diferenciação de colônias espécies de *Proteus*, *Salmonella* ou *Shigella*, dada a sua semelhança a nível morfológico após sementeira em Agar Hektoen ou Agar XLD. Quando os resultados são coincidentes realiza-se sementeira em ágar sangue e posterior confirmação bioquímica por galerias API-20E.

Um resultado positivo não significa necessariamente que *Salmonella* seja causa de doença, uma vez que a sua presença é frequente no trato gastrointestinal, da mesma forma que um resultado negativo não significa ausência de infeção, dada a ocorrência de excreção intermitente. Para obter um resultado fiável devem ser realizadas colheitas seriadas ou cultura microbiológica de tecidos extra-entéricos como, por exemplo, sangue. Nos casos de isolamento positivo de *Salmonella* sp. e presença de sinais clínicos concordantes, é possível diagnosticar um quadro clínico de Salmonelose (Fornazi & Teixeira, 2009).

A hemocultura poderá ser realizada quando existe suspeita de bacteriemia. Neste caso, as medidas de assépsia devem ser ainda mais cuidadosas na altura da colheita. A área sujeita a venopunção deve ser limpa com uma solução detergente, seca, e limpa novamente com solução de iodopovidona, após o que no caso dos répteis a recolha deve ser realizada num intervalo inferior a 30 segundos (Quinn *et al.*, 2004). Como a bacteriemia é intermitente, deverá ser realizada uma segunda recolha 24 horas após a primeira. A identificação dos isolados pode ser realizada através de galerias e identificação bioquímica disponíveis comercialmente, tal como a galeria API 20E (Biomérieux), embora esta identificação deva ser confirmada por serologia. A identificação pode ainda ser realizada através de técnicas de biologia molecular como, por exemplo, a técnica de PCR (Polymerase chain reaction).

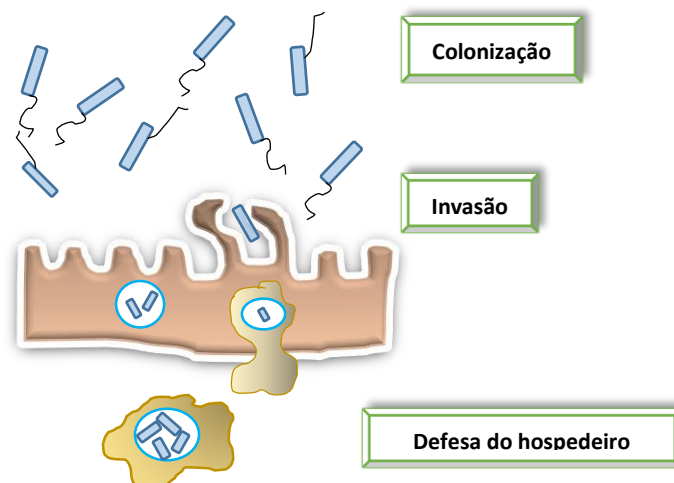
Após identificação, a classificação das espécies de *Salmonella* em diferentes serotipos é baseada na análise dos antigénios lipopolissacarídeos (O), proteínas flagelares (H) e, em algumas situações, proteínas flagelares (vi), pelo esquema de Kauffman-White (CFSPH, 2013).

Os isolados de *Salmonella* obtidos a partir de amostras fecais de répteis são geralmente classificados como pertencentes às subespécies III e IIIb e pensa-se que possam usar vias bioquímicas alternativas (Mitchell & Shane, 2001).

2.2. Fatores de virulência em *Salmonella* sp.

A grande maioria dos processos infecciosos decorre segundo as seguintes etapas: adesão, invasão, replicação e resistência aos mecanismos de defesa e lesão no hospedeiro. Na etapa de adesão, as adesinas possuem um papel importante, uma vez que são proteínas que reconhecem recetores existentes na superfície das células do hospedeiro. Quando ocorre a adesão bacteriana, esta promove a modificação da superfície celular e a alteração dos recetores expostos. As adesinas podem ser classificadas em 2 grupos principais: fimbriais e não fimbriais. Nas bactérias Gram negativas estão presentes adesinas fimbriais que incluem: fímbrias, pili, flagelo, lipopolissacarídeos (LPS) e cápsula (Oliveira, Sola, Fiestel, Moreira & Oliveira, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo da infecção por *Salmonella Typhimurium* enteropatogénica. Esta recorre ao uso de flagelo para colonização do hospedeiro e do lúmen intestinal por movimentação directa para o epitélio intestinal. A ligação ao epitélio intestinal ocorre pelo uso de uma grande variedade de adesinas e pela secreção de proteínas efectoras. Existe sobrevivência da bactéria e a replicação em vacúolos no interior das células epiteliais e fagócitos. (Adaptado de Erhardt & Dersh, 2015)



As fímbrias têm um papel fundamental na adesão à superfície celular, persistência ambiental e formação de biofilme. A formação de biofilme possui um papel importante na persistência da infecção por *Salmonella* sp. e outras espécies bacterianas, sendo responsável pelo desenvolvimento de infecções crônicas, pela persistência no ambiente e ineficácia dos agentes antimicrobianos (Seixas, Machado, Bernardo, Vilela & Oliveira, 2014).

A mobilidade de *Salmonella* sp. é possível através de flagelos que contactam com os enterócitos. A forma como os flagelos se distribuem na superfície da célula influencia o grau de patogenicidade dos diferentes serotipos. Por exemplo, *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium apresenta um flagelo único, relacionado com a sua capacidade invasiva (Mitchell & Shane, 2001).

Os sideróforos são quelantes de ferro produzidos por bactérias quando as concentrações de ferro disponíveis no hospedeiro são baixas, permitindo a multiplicação e o metabolismo bacteriano (Mitchell & Shane, 2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium produz um sideróforo fenolato denominado de enteroquelina (Mitchell & Shane, 2001) e embora não seja indispensável para a sobrevivência e proliferação bacteriana, a sua presença permite que a multiplicação bacteriana seja mais rápida (Mitchell & Shane, 2001).

O LPS é um componente característico da parede celular de bactérias de Gram negativo e são considerados os fatores de virulência mais importantes no género *Salmonella*. O LPS é composto por 3 regiões: cadeia lateral O, região central polissacarídica e Lípido A. Os microorganismos que não possuem na sua membrana a região antigénica O apresentam menor virulência, devido ao facto de esta região aumentar a distância entre a membrana celular e os mecanismos mediados pelo sistema complemento (Mitchell & Shane, 2001).

A região central polissacarídica é responsável pela manutenção da carga negativa da superfície bacteriana e o Lípido A constitui uma endotoxina. A presença de endotoxinas promove a estimulação dos mediadores da cascata inflamatória e de citocinas imunorreguladoras, que causam lesões vasculares e alterações na coagulação, podendo dar origem à formação de pequenos coágulos ou trombos (Mitchell & Shane, 2001).

Alguns serotipos de *Salmonella enterica* apresentam genes de virulência em regiões específicas do cromossoma, denominadas ilhas de patogenicidade (*pathogenicity island 2-SPI 2*) (Asten & Dijk, 2005). A expressão destes genes pode conduzir a infeção sistémica em animais endotérmicos especialmente em indivíduos pertencentes a grupos de risco, como crianças, indivíduos geriátricos ou indivíduos imunocomprometidos (Corrente *et. al.*, 2004).

Nesta dissertação foi possível o estudo fenotípico de alguns fatores de virulência: DNase, lipase, gelatinase e hemolisina.

DNase ou desoxirribonuclease é uma enzima que catalisa a hidrólise de ADN pela clivagem das ligações fosfodiéster. Existem DNases extracelulares que são produzidas por bactérias patogénicas e embora o seu papel não esteja bem compreendido esta enzima pode contribuir para a degradação de neutrófilos aquando da fase de invasão bacteriana. (Seixas, 2011).

A lipase tem como função a clivagem de ácidos gordos e glicerol. Aquando da fase de invasão bacteriana esta exoenzima assegura a clivagem de moléculas lipídicas produzidas pelo hospedeiro (Seixas, 2011).

A gelatinase é uma protease que degrada gelatina, colagénio, caseína hemoglobina entre outros substratos. Gelatinase é uma protease capaz de degradar uma ampla variedade de substratos, incluindo a gelatina, colagénio, caseína, hemoglobina e outros (Seixas, 2011).

A hemolisina é uma enterotoxina que forma poros transmembranares nas células do hospedeiro levando à sua lise e necrose, permitindo à bactéria o acesso aos nutrientes celulares existentes. São exemplos destas células os eritrócitos e células do sistema imunitário. Esta toxina também possui capacidade de inibir a fagocitose e a quimiotaxia (Encarnação, 2013). É possível a visualização, aquando da sementeira em agar-sangue de 3 tipos de hemólise: Hemólise total (beta), apresentando um halo transparente em redor das colónias; Hemólise parcial (alfa) que apresenta formação de um esverdeado e sem hemólise (gama) (Catálogo de Práticas de laboratório para la docencia en Microbiología, 2008).

Salmonella apresenta ainda a capacidade de adquirir genes de virulência por transferência horizontal, por incorporação de material genético existente após lise celular (Oliveira *et al.*, 2013).

2.3. Perfil de resistência a compostos antimicrobianos em *Salmonella* sp.

A resistência antimicrobiana é definida como o mecanismo pelo qual a bactéria pode diminuir a ação dos agentes antimicrobianos de forma natural ou adquirida (Calderón, Delgado, Urbano & Coy, 2012).

De acordo com a grande maioria dos médicos veterinários e de medicina humana, a administração de antimicrobianos é apenas benéfica quando se observa sinais de salmonelose sistémica ou infeção em indivíduos imunocomprometidos (Duijkeren & Houwers, 2000). A antibioterapia de doentes com enterite por *Salmonella* sp. considerada não complicada deve ser sempre considerada contra-indicada com a exceção de animais com menos de 6 meses de idade. Existem ainda vários estudos que referem que a aplicação de tratamento antimicrobiano prolonga o tempo de excreção deste agente para o meio ambiente, o que constitui um argumento adicional para a sua utilização apenas em casos particulares (Duijkeren & Houwers, 2000).

São várias as classes de antibióticos que actuam contra *Salmonella*. Os aminoglicosídeos realizam a inibição da síntese proteica bacteriana por ligação à subunidade ribossomal 30S. São exemplos desta classe a Amicacina (AK) e a Gentamicina (CN). A amicacina é um antimicrobiano bactericida de largo espectro, com atividade contra a maioria dos agentes bacterianos, à exceção de *Streptococcus* spp. e bactérias anaeróbias. Apresenta atividade contra bastonetes Gram negativos que apresentam resistência a outros antimicrobianos. Em relação à Gentamicina, este agente apresenta um espectro de ação alargado incluindo *Staphylococcus* spp. e Enterobacteriaceae (Duijkeren & Houwers, 2000).

Os β -lactâmicos atuam através de inibição da síntese da parede bacteriana. Esta ação é mais eficaz se for adicionado um inibidor da produção de β -lactamases, como é o caso do ácido clavulânico, frequentemente usado em associação com amoxicilina. Outro β -lactâmico de uso clínico frequente é a Ampicilina (AMP), à qual é encontrada geralmente resistência em

bactérias Gram negativas. A Penicilina G (P) apresenta maior ação descrita contra infecções causadas por bactérias Gram positivas, bactérias anaeróbias e algumas bactérias Gram negativas suscetíveis (*Pasteurella* spp.). Praticamente todas as Enterobacteriaceae são resistentes, o que faz sentido se considerarmos o mecanismo de ação destes antimicrobianos, tal como *Staphylococci* produtores de β -lactamases (Duijkeren & Houwers, 2000).

O Cloranfenicol (C), é um agente inibidor da síntese proteica por ligação ribossomal, apresentando espectro de atividade alargado contra bactérias Gram positivas, cocci, e bastonetes Gram negativos (incluindo Enterobacteriaceae) e *Rickettsia*, além de capacidade de penetração nas membranas lipídicas (Duijkeren & Houwers, 2000).

As quinolonas, que atuam pela inibição da DNA girase, surgiram nos anos 60 pela introdução do ácido nalidíxico (NA) no mercado. Mais tarde surgiram as fluorquinolonas (Papich, 2010), consideradas substâncias antimicrobianas de elevado potencial terapêutico, devido à baixa concentração mínima inibitória (CIM) necessária para uma boa resposta clínica na Salmonelose (Duijkeren & Houwers, 2000). Representantes das fluorquinolonas incluem a Ciprofloxacina (CIP), com atividade contra bastonetes de Gram negativo (incluindo Enterobacteriaceae) e alguns cocci Gram positivos, e a Enrofloxacin (ENR), um antibiótico de largo espectro com atividade contra bactérias suscetíveis, tais como *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Pasteurella* (Papich, 2010). As quinolonas são excretadas em alta concentração no muco biliar, mantendo atividade no ambiente intracelular, característica importante uma vez que *Salmonella* sp. apresenta capacidade de colonização intracelular facultativa. Outra vantagem da utilização das fluorquinolonas é o facto de praticamente não afetarem a microbiota anaeróbia e de não potenciarem a resistência mediada por plasmídeos (Duijkeren & Houwers, 2000).

As cefalosporinas, como é o caso da Cefotaxima (CTX), apresentam atividade semelhante aos β -lactâmicos com principal atividade contra bastonetes de Gram negativo, Enterobacteriaceae (incluindo *E. coli* e *Salmonella* sp.), que apresentam resistência contra cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e a derivados da ampicilina (Duijkeren & Houwers, 2000).

A tetraciclina (TE) inibe a síntese proteica bacteriana e possui atividade bacteriostática de largo espectro contra bactérias de Gram positivo e *Mycoplasma*. A maioria dos bastonetes Gram negativos, incluindo Enterobacteriaceae apresentam resistência (Papich, 2010).

O co-trimoxazole ou Sulfametoxazole-trimetoprim (SXT) é constituído por dois compostos sinérgicos, sendo que o trimetoprim apresenta atividade antagonista da produção bacteriana de ácido fólico e o sulfametoxazole é uma sulfamida que apresenta um bom espectro de ação contra bactérias de Gram positivo de Gram negativo e protozoários, sendo que quando não é usado em associação, a resistência à sua atividade é comum (Papich, 2010).

Existem duas formas de transmissão de resistência adquirida descritas para *Salmonella* sp.: por aquisição de material genético extra-cromossômico proveniente de outras bactérias ou através de mutações no cromossoma bacteriano. A resistência a antimicrobianos como o cloranfenicol, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim ocorre principalmente pela captação de novo material genético, enquanto a resistência às fluorquinolonas deve-se a mutações no genoma bacteriano (Calderón, Delgado, Urbano & Coy, 2012). Em humanos, os serotipos que mais rapidamente adquirem resistência antimicrobiana são *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* e *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* (Yang *et al.*, 2001).

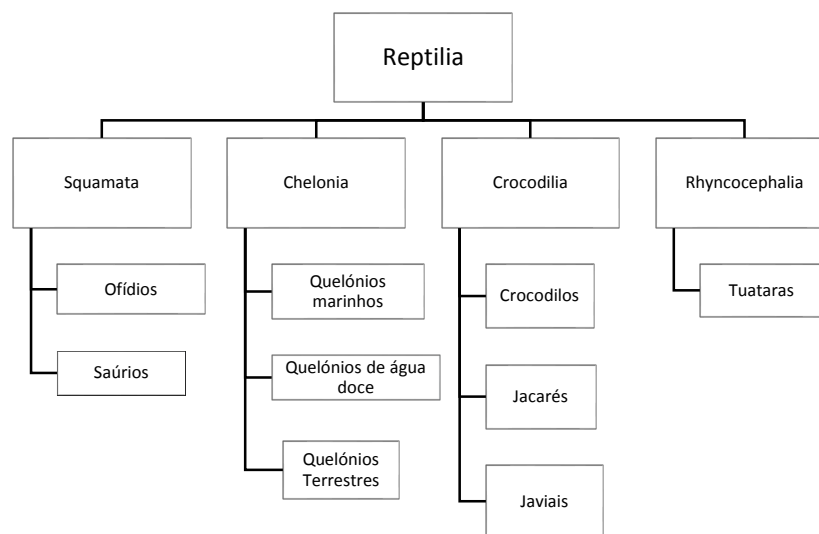
Em relação as classes de antibióticos existentes deve ser toda em conta a importância do seu uso e tomada sempre uma abordagem em termos de risco de modo a adoptar estratégias de gestão para utilização não humana de agentes antimicrobianos. Segundo a World Health Organization (2007) considera-se com antibióticos criticamente importantes as quinolonas, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e macrólidos pelo que a sua utilização deve estar reservada a situações de doença não comum e extrema causada por organismos que podem adquirir genes de resistência. Por estas razões a sua utilização é quase proibitiva no casos de antibioterapia prescrita a animais de companhia ou outros.

3. Características da infecção por *Salmonella* sp. em Répteis

Os primeiros répteis apareceram na Era Paleozóica há aproximadamente 300 milhões de anos, existindo actualmente aproximadamente 7500 espécies, agrupadas em 4 Ordens: Squamata, Chelonia, Crocodilia e Rhyncocephalia (Esquema 2). A relação filogenética entre a Ordem Crocodilia, Squamata e Chelonia encontra-se por esclarecer (Jacobson, 2007).

Em Portugal, existem espécies endémicas pertencentes às Ordens Squamata e Chelonia (Instituto da conservação da Natureza e das Florestas [ICNF], 2008).

Esquema 2- Classificação taxonómica da Classe Reptilia (adaptado de: Jacobson, 2007)



Os Quelónios são constituídos por 13 famílias e mais de 285 espécies. Esta Ordem divide-se em duas Subordens: Pleurodira e Cryptodira. A primeira Subordem, inclui as famílias Pelomedusidae e Chelidae, das quais são exemplo a Tartaruga africana de capacete (*Pelomedusa subrufa*) e o Cágado-mediterrânico (*Mauremys leprosa*), respectivamente. A subordem Cryptodira possui 11 famílias, das quais se destaca a família Testudinoidea, à qual pertencem espécies tais como, a tartaruga-russa (*Testudo horsfieldii*) ou a tartaruga de orelhas-vermelhas (*Trachemys scripta elegans*) (Jacobson, 2007) sendo, na fauna portuguesa, um representante desta Ordem o Cágado-de-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*) (ICNF, 2008).

A ordem Squamata inclui aproximadamente 7200 espécies, que estão organizadas em três Subordens: Sauria, que contém cerca de 4300 espécies de Sáurios, vulgarmente conhecidos como lagartos, a Ophidia que inclui 2900 espécies, conhecidas vulgarmente por serpentes, e ainda a Subordem Amphisbaenia, que inclui 140 espécies de répteis subterrâneos endémicos nas zonas tropicais e subtropicais da América (Jacobson, 2007). Em Portugal, podemos encontrar como representantes desta Ordem a lagartixa-do-mato-comum (*Psammotromus*

algius), o camaleão-comum (*Chamaeleo chamaeleon*), pertencentes a Subordem Sauria, e a cobra-rateira (*Malpolon monspessulanus*) e a cobra-de-escada (*Elaphe scalaris*), pertencentes à Subordem Ophidia (ICNF, 2008).

Os primeiros relatos de isolamento de *Salmonella* sp. em répteis datam de 1939 (Chambers & Hulse, 2006) e 1944 (Mitchell & Shane, 2001), em amostras obtidas a partir de Monstro de Gila (*Heloderma suspectum*) e Lagarto-de-cornos-do-Texas (*Phrynosoma solare*). Em anfíbios, esta bactéria só foi isolada mais tarde, em 1958.

Num estudo realizado em 2003 (Pfleger, Benyr, Sommer & Hassl), foi possível verificar que as serpentes apresentam uma percentagem de isolamento mais elevada (24%), seguidas dos lagartos com uma percentagem de identificação intermédia (17%) e tartarugas (3%).

No entanto, um estudo mais recente, realizado apenas com répteis mantidos como animais de estimação refere que os sáurios apresentam uma alta prevalência de isolamento de *Salmonella* sp. (superior a 76%) quando comparado com quelónios, não tendo sido estabelecida comparação com os ofídios (Pees *et al.*, 2010). No mesmo estudo foi possível constatar que o isolamento era mais frequente nos répteis provenientes de lojas de animais (89%) comparativamente com animais capturados na Natureza (59%) (Pees *et al.*, 2010).

Embora a literatura disponível relativamente à presença de *Salmonella* sp. em répteis seja escassa e o isolamento em muitas espécies não esteja descrito, o potencial de transmissão não pode deixar de ser considerado (Chambers & Hulse, 2006). Considera-se atualmente, que *Salmonella* sp. é um microrganismo comensal do trato gastrointestinal dos répteis (Mermin *et. al.*, 2004) e que 3-5% dos casos de Salmonelose humana são associados ao contacto direto ou indireto com animais exóticos (Pfleger *et al.*, 2003), tais como, os petauros do açúcar (*Petaurus breviceps*), ouriços e répteis (Pees *et al.*, 2010). No caso da transmissão associada apenas a répteis, a incidência é de cerca de 1% (Mermin *et. al.*, 2004).

Apesar da transmissão de *Salmonella* sp por répteis se encontrar descrita noutros países (Berthand *et. al.*, 2008), em Portugal não existem dados disponíveis relativamente a este modo de transmissão.

Os portadores assintomáticos são mais importantes como fonte de infeção, uma vez que os animais clinicamente doentes são geralmente isolados, o que diminui a probabilidade de transmissão para outros animais ou até para o Homem (Fornazi & Teixeira, 2009). A presença de *Salmonella* sp. no trato digestivo dos répteis sem levar ao aparecimento de sinais clínicos pode indicar a existência de uma adaptação evolutiva (Maciel, Argôlo-Filho, Nogueira, Dias & Rezende, 2009). Efectivamente, os répteis são considerados um grupo particular, dada a sua capacidade de permanecerem portadores assintomáticos, apesar de a maioria viver num ambiente contaminado, não só mas em grande parte devido à acumulação de fezes nos alojamentos em que são mantidos (Duijkeren & Houwers, 2000).

O desenvolvimento de doença pode ocorrer quando *Salmonella* sp. invade tecidos extra-intéricos o que geralmente ocorre devido à presença concomitante de imunodepressão, que pode ser desencadeada por um grande número de fatores (Esquema 3).

Esquema 3-A presença de Salmonelose latente ou subclínica deve-se a presença de fatores desencadeantes (adaptado de: Fornazi & Teixeira, 2009)

Fatores principais despoletantes de excreção de *Salmonella* sp. em répteis

- **Stress**
 - **Transporte prolongado**
 - **Privação de alimento ou água**
 - **Sobrepopulação**
 - **Temperaturas ambientais extremas**
 - **Infeções intercorrentes**
 - **Antibioterapia oral**
 - **Administração prolongada ou excessiva de fármacos imunossupressores**
-

Existem estudos que referem que infeções latentes por *Salmonella* sp. passaram a ter manifestações clínicas em quelónios após os animais passarem por um período de desidratação de 10 a 14 dias (Fornazi & Teixeira, 2009).

O desenvolvimento do estado de portador, bem como a sua manutenção ou evolução para doença sistémica, está dependente de vários fatores, tais como, o serotipo envolvido, a quantidade de bactérias infetantes, a idade do animal e resposta imune (Fornazi & Teixeira, 2009). Os fatores que condicionam a excreção de *Salmonella* sp. não se encontram bem esclarecidos. Pensa-se que a imunodepressão seja uma das principais causas, no entanto, animais clinicamente saudáveis podem eliminar este agente por longos períodos de tempo (Fornazi & Teixeira, 2009).

Quando ocorre desenvolvimento de doença, o animal pode apresentar um quadro de septicémia devido à migração da bactéria do intestino para a corrente sanguínea, atingindo posteriormente diversos órgãos.

Os principais sintomas de salmonelose em répteis incluem diarreia, anorexia, perda de peso e letargia, podendo ainda ocorrer choque hipovolémico e morte. As principais lesões incluem celomite, salpingite, osteomielite, formação de granulomas e abscessos, decorrentes geralmente de processos crónicos. Existem relatos de dermatite com etiologia relacionada com *Salmonella* sp., cujos sinais clínicos incluem a presença de vesículas crostosas e exsudativas. Já foram relatados casos de osteomielite e osteoartrite em diferentes espécies de serpentes. Pode ainda ocorrer estomatite, embora esta manifestação clínica seja rara (Fornazi & Teixeira, 2009).

3.1. Fontes de contaminação

A contaminação de quelônios com *Salmonella* sp. pode ocorrer durante a criação e no transporte. Os criadores possuem répteis geralmente em ambientes exteriores com elevada densidade populacional, com fornecimento de uma dieta que na sua maioria possui uma elevada quantidade de proteína, como ração ou pedaços de peixe, que são introduzidos diretamente nas lagoas, constituindo um meio favorável à multiplicação de *Salmonella* sp. (Harris *et al.*, 2010).

A urina emitida pela progenitora durante a ovopostura ou o próprio solo onde é feito o ninho podem constituir fontes de contaminação para o embrião, que pode ocorrer através da penetração pela casca ou na altura da eclosão do réptil recém-nascido (Harris *et al.*, 2010). Em ofídios, foi demonstrado que a colonização da descendência aquando do nascimento é uma via de transmissão de *Salmonella* sp. muito significativa (Maciel, *et al.*, 2009). Em iguanas no estado selvagem, a colonização por *Salmonella* sp. pode ocorrer através de ingestão de fezes que contaminam a água e alimento, insetos, solo e até água de lagoas (Mermin *et al.*, 2004). Sendo, por isso, necessária a existência de boas condições e manejo e higiene (Figura 2).

Figura 2 - A qualidade do manejo realizado condiciona a excreção de *Salmonella* sp. para o ambiente (imagem cedida por: Shirley Wiggins)



3.2. Fatores condicionantes ao desenvolvimento de infecção sistémica

O desenvolvimento de doença num réptil depende da sua resposta imune. À semelhança de outros animais, a resposta imune parece estar relacionada com uma grande diversidade de fatores, tais como idade, género, estado nutricional, temperatura ambiente, variações sazonais, nível de stress, fontes de alimento disponíveis e terapias imunossupressoras concomitantes (Jaffredo, Fella & Dunon, 2005) e que desempenham um papel crítico no desenvolvimento da resposta imune (Jacobson, 2007).

O funcionamento do sistema imunitário dos répteis ainda não se encontra totalmente descrito. É caracterizado por uma diferenciação lenta dos órgãos linfóides e uma resposta imune limitada, relacionada com a evidência de serem animais poiquilotérmicos (Jaffredo *et al.*, 2005). A nível evolutivo, pensa-se que a dependência da temperatura ambiente constituiu uma condicionante em termos evolutivos para o desenvolvimento de uma resposta imunitária mais vigorosa.

O desenvolvimento de uma resposta imunitária primária é sempre lento e pode demorar quatro a seis semanas a estabelecer-se, ao contrário do que acontece nos mamíferos, que demoram quatro a seis dias a estabelecer este tipo de resposta, num indivíduo imunocompetente (Sandmeier, Tracy, DuPré, & Hunter, 2012). O período prolongado para o desenvolvimento de uma resposta por parte do sistema imunitário pode permitir que a multiplicação dos agentes patogénicos ocorra mais rapidamente do que o tempo necessário para que o sistema imunitário consiga atuar. No entanto, devido à persistência de anticorpos em circulação, a resposta quando ocorre um segundo contacto com o mesmo agente é mais rápida (Sandmeier *et al.*, 2012). Por esta razão, animais mais novos são mais suscetíveis a manifestação de um quadro clínico de doença sistémica, uma vez que animais mais velhos têm capacidade de controlar a infeção mais rapidamente (Fornazi & Teixeira, 2009). Um estudo realizado em tartarugas-russas (*Testudo horsfieldii*), revelou uma baixa flexibilidade dos anticorpos produzidos quando comparado com os de mamíferos. Esta baixa flexibilidade leva a uma diminuição da possibilidade de rotação intramolecular das imunoglobulinas, o que influencia a ligação a agentes ou células marcadas como *non-self*, podendo explicar a existência de uma resposta menos efectiva e mais demorada (Zagyansky, 1973).

A resposta do sistema imunitário dos répteis varia com as condições ambientais. A resposta humoral em chuckwalla comum (*Sauromalus ater*) contra o antigénio H de *Salmonella* sp. (STH) provou ser menor quando o lagarto é mantido a 25°C ou 40°C, havendo uma resposta mais efetiva quando a temperatura corporal é mantida a 30°C. Em tartarugas mediterrânicas (*Testudo hermanni*) foi possível provar a existência de uma produção menor de anticorpos quando mantidos a 20°C, comparativamente à exposição a uma temperatura de 28°C (Evans & Cowles, 1959).

A privação de alimento, fator desencadeador de stress, ou presença concomitante de doença, são fatores que causam alterações em órgãos linfóides, como por exemplo a involução precoce do timo (Cooper, Klumpam & Zapata, 1985). Outro órgão linfóide que sofre alterações sazonais é o baço. A polpa vermelha do baço de *Psammophis schokari* está bem desenvolvida no inverno e no final de junho/ julho o tecido linfóide esplénico começa a regredir lentamente de tamanho e parando a sua regressão em agosto (El Ridi, Badir & El Rouby, 1981).

Em *Chalcides ocellatus* foi comprovado o desenvolvimento de uma forte resposta imune desde o início da primavera até o início do outono, correlacionada com um baixo nível de

corticosteroide endógeno. Quando presente uma involução marcada do tecido linfóide, associada a um alto nível de cortisol endógeno, há uma diminuição da resposta imune (Hareramadon, Reubhotktar & Rai, 2004).

Em Geckos Leopardo (*Eublepharis macularius*), a regressão do timo no inverno parece estar relacionada com um elevado nível de androgénios. A sua regeneração entre a primavera e o verão ocorre quando o nível de androgéneos endógenos está mais baixo no organismo. Em fêmeas da mesma espécie, o estrogénio inibe diretamente as células do timo por controlo da apoptose celular (Hareramadas & Rai, 2001).

Em relação a terapias imunossupressoras, um estudo realizado em Geckos Leopardo, demonstrou que animais que estejam a receber terapia glucocorticoide, dependendo da dose e do tempo de exposição, apresentavam a sua atividade fagocitária alterada e libertação de nitritos decorrente da atividade LPS (Mondal & Rai, 2002 b).

3.3. Sinais Clínicos e Diagnóstico de Salmonelose

A grande maioria dos animais infetados podem manter-se assintomáticos e os sinais clínicos de infeção em répteis podem variar de espécie para espécie, tal como os achados de necrópsia.

A salmonelose em répteis caracteriza-se pela presença de osteomielite, osteoartrite, pneumonia, gastroenterite e abscessos cutâneos ou subcutâneos. Em grupos de tartarugas com vida semi-livre, têm sido encontrados com frequência aquando da necrópsia, sintomas como a emaciação, lesões no plastrão, lesões respiratórias e hepáticas enquanto que em ofídios têm sido descritas infeções ósseas progressivas e fatais (CFSPH, 2013). São também descritas como frequentes, ainda no caso dos ofídios, alterações a nível hepático (Mitchell & Shane, 2001). Têm sido encontrados, em várias Iguanas Verdes (*Iguana iguana*), sinais pós-morte de nefrite, ooforite, miocardite e endocardiose valvular aórtica após bacteriemia por *Salmonella* sp. (Mitchell & Shane, 2001). Não está descrita a existência de lesões patognomónicas (CFSPH, 2013).

A Salmonelose encontra-se também descrita em crocodilos de criação em quintas, causando letargia e anorexia. Estes sinais estão frequentemente associados à existência de uma alta densidade populacional, fornecimento de alimento contaminado e elevado défice de higiene, que predispõem a infeção (Mitchell & Shane, 2001).

A morte devida a salmonelose *per se* é ocasionalmente reportada nos répteis, no entanto esta parece ser rara (CFSPH, 2013).

O diagnóstico a nível clínico é realizado na presença de sinais clínicos compatíveis e após isolamento do agente a partir de amostras biológicas recolhidas antes da instituição de terapêutica antimicrobiana.

3.4. Tratamento

A terapêutica antimicrobiana em répteis com diagnóstico laboratorial de salmonelose é controversa. *Salmonella* sp. é capaz de desenvolver vários mecanismos de resistência a antimicrobianos e a administração destes compostos no caso de isolamento positivo poderá ser responsável pela disseminação de novas resistências. Além disso, a instituição de terapêutica antimicrobiana levará ao aumento do tempo de excreção fecal de *Salmonella* sp. (CFSPH, 2013). Devem ser sempre instituídas medidas de suporte aos animais afetados incluindo fluidoterapia, regulação da temperatura e humidade e suporte nutricional (CFSPH, 2013). Antes de iniciar uma terapêutica antimicrobiana, recomenda-se a realização de um teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) juntamente com a correção das medidas de higiene e ambientais, podendo a aplicação destas medidas contribuir para o controlo da infeção e o restabelecimento da homeostasia (Mitchell & Shane, 2001).

3.4. Estratégias de prevenção

Qualquer factor ambiental ou mudança que possa causar stress é suficiente para que ocorra um desequilíbrio no sistema imunitário do réptil e eventual excreção do agente ou ao desenvolvimento de salmonelose clínica, com possibilidade de transmissão para a descendência, para além do risco para a saúde pública (Maciel, *et al.*, 2009).

Salmonella sp. tem um período de sobrevivência alargado fora do hospedeiro, sendo que permanece viável até 89 dias em água corrente e até 30 meses em fezes de réptil (Warwick, *et al.*, 2001).

Assim, as medidas de prevenção a implementar incluem a limpeza periódica dos terrários, agrupamento de animais por escalão etário, a alimentação com alimentos lavados e sempre de acordo com as necessidades nutricionais dos animais. Promover o enriquecimento ambiental, de modo a que o ambiente artificial se assemelhe tanto quanto possível ao natural para o réptil constitui uma boa forma de reduzir o stress associado à falta de abrigos ou camuflagem, por exemplo (Maciel *et al.*, 2009).

As melhores medidas de medicina veterinária preventiva, no caso dos répteis, devem ser tomadas ainda antes da introdução do novo indivíduo. A realização de um exame clínico completo e o tratamento de doenças existentes antes da introdução de um novo animal num ambiente doméstico contribui não só para o aumento da taxa de sobrevivência em cativeiro mas também para a prevenção da transmissão de agentes infecciosos e potencialmente zoonóticos, como é o caso de *Salmonella* sp. Recomenda-se que seja realizada citologia fecal na altura do primeiro exame clínico e nas reavaliações posteriores (Pasmans, Blahak, Martel, & Pantchev, 2007). Animais que apresentem salpingite, dermatite, osteomielite, sinais clínicos

de septicemia ou doença granulomatosa devem ser suspeitos de Salmonelose clínica (Pasmans et al., 2007).

A quarentena é uma das medidas preventivas de maior importância. Muitas vezes não são praticados os tempos recomendados, ou não é realizado nenhum período de quarentena (Pasmans et al., 2007). Recomenda-se um período de quarentena não inferior a 90 dias para a generalidade das espécies. Assim, no entanto, existem exceções em que o tempo recomendado pode ir até 6 meses no caso das Boas (Família Boidae) (Pasmans et al., 2007). Segundo Pasmans (2007), é recomendável que o novo réptil permaneça numa divisão da casa independente do local onde se encontra o terrário com os outros animais.

Recomenda-se ainda o uso de luvas descartáveis quando se vai alimentar e/ou manipular os animais, devendo o réptil em quarentena ser o último a ser alimentado e/ou manipulado (Jaffredo et al., 2005). Caso do animal tenha sido adquirido numa loja de animais, estas medidas tornam-se ainda mais importantes e necessárias. Devido à alta densidade animal, o fluxo contínuo de animais e juntamente com um nível muito elevado de stress e uma alta prevalência de doença, faz com que seja necessário implementar as medidas de quarentena de modo mais rigoroso (Pasmans et al., 2007).

A desinfecção das mãos pós-manipulação ou contacto indireto com o réptil (limpeza do terrário) deve ser igualmente considerada uma medida importante.

A desinfecção do terrário deve ser realizada periodicamente com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% (Pasmans et al., 2007).

4. Características da infecção por *Salmonella* sp. em Humanos

A Salmonelose e a Campilobacteriose são as zoonoses com maior prevalência em países desenvolvidos (Calderón *et al.*, 2012).

A salmonelose é uma zoonose potencialmente transmitida por contacto com cães, gatos, aves, cavalos e répteis (Duijkeren & Houwers, 2000). A Salmonelose transmitida por répteis apresenta distribuição mundial (CFSPH, 2013). Embora a gastroenterite auto-limitante seja a apresentação clínica mais comum, podem ocorrer infeções invasivas, especialmente nos indivíduos pertencentes a grupos de risco, tais como crianças de idade inferior a 5 anos, adultos imunocomprometidos e idosos (Harris *et al.*, 2010). De facto, embora grande parte destas infeções sejam causadas pela ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella*, estima-se que uma percentagem aproximada de 6% da população afetada (que corresponde a cerca de 11% de indivíduos afetados com idade inferior a 21 anos) desenvolva a infeção através do contacto direto ou indireto com répteis (Harris *et al.*, 2010), levando à existência do estatuto de “Reptile associated Salmonellosis” (RAS) (Mitchell & Shane, 2001).

A salmonelose em humanos pode ter duas apresentações diferentes. A primeira, designada por Salmonelose do tipo Tifoide ou Paratifoide, é causada por *Salmonella enterica Typhi* ou por *S. enterica* ser. Paratyphi A, B ou C, respetivamente. Estas infeções são transmitidas de pessoa para pessoa, não estando descrita transmissão por animais. A forma tifoide é responsável pelo aparecimento de sintomas durante um período mais prolongado e apresenta uma maior taxa mortalidade do que a forma paratifoide. Os sintomas da forma tifoide incluem febre, diarreia, dor abdominal e podem envolver falência hepática, esplénica e respiratória e a lesão neurológica. No caso da febre paratifoide, os sintomas são muito semelhantes mas menos graves.

O período de incubação da febre tifoide varia entre 7 a 14 dias, enquanto no caso da febre paratifoide varia entre 1 a 10 dias. Nesta forma de salmonelose 1 a 3% dos indivíduos afetados tornam-se portadores crónicos. Na forma tifoide, se não forem alvo de tratamento, mais de 5% dos indivíduos afetados adquire o estatuto de portador crónico (Annous & Gurtler, 2012)

O segundo tipo, designado por salmonelose não tifoide, é causado por serotipos que residem primariamente em animais e que possuem potencial zoonótico (Tabela 2). Esta doença é associada maioritariamente à ingestão de alimentos contaminados, ocorrendo menos frequentemente devido a contacto com animais de várias espécies (Duijkeren & Houwers, 2000).

Tabela 2-: Principais diferenças entre salmonelose tifoide e salmonelose não tifoide (adaptado de: Gal-Mor, Boyle & Grassl, 2014) (P.I.- Período de incubação)

	Doença não tifoide	Doença tifoide
Serótipos	Serotipos ubiqüitários (<i>Typhimurium</i> e <i>Enteritidis</i> entre outros 1500)	Serotipos <i>Typhi</i> , <i>Paratyphi</i> , <i>sendai</i>
Hospedeiro	Ampla	Restrito a humanos
Epidemiologia	Mundial	Endêmico em países em vias de desenvolvimento (Ásia, África, América do Sul)
Reservatório	Animais de quinta ou produção, animais de companhia	Sem reservatório Humano para humano
Manifestações clínicas	Gastro-enterite auto limitante (diarreia, vômito, cólicas em indivíduos imunocompetentes) ou doença com invasão extra-intestinal (sistema imunitário comprometido)	Invasiva, doença sistêmica em indivíduos imunocompetentes (febre, tremores, dor abdominal, erupções cutâneas, náusea, anorexia, hepato e esplenomegalia, diarreia, tosse seca)
Curso da Doença	P.I.: 6-24h Duração dos sintomas: 10 dias. Geralmente não se observa o desenvolvimento de portadores assintomáticos	P.I.: 7-21 d Duração dos sintomas: 3 semanas. 1-4% dos indivíduos afetados tornam-se excretores por um longo período de tempo (1 ano min)
Resposta imune (humanos)	Resposta imunitária eficiente, recrutamento de neutrófilos, resposta Th1	Inflamação intestinal mínima, leucopénia e resposta Th1
Vacinação	Sem vacina disponível	Existe para <i>S. enterica</i> ser. <i>Typhi</i> , não está autorizada para <i>S. enterica</i> ser. <i>Paratyphi</i>

Cerca de 80% dos casos estimados de salmonelose em humanos tem origem numa toxinfecção alimentar (Annous & Gurtler, 2012), embora o número de casos reportados de país para país seja muito variável. Os produtos alimentares relacionados com salmonelose são muito variados, incluindo chocolate, ovos, leite em pó para crianças, vegetais e carne de suíno ou frango (Annous & Gurtler, 2012).

Este tipo de gastroenterite pode ser causada por pelo menos 150 serotipos de *Salmonella* sp., da subespécie *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, havendo curiosamente alguns serotipos pertencentes que parecem ter maior potencial para causar doença gastrointestinal (*Typhimurium*, *Dublin* e *Cholerasuis*) A infeção é geralmente autolimitante, apresentando por regra uma duração de 2 a 5 dias, mas em 5% dos casos a bactéria torna-se invasiva e causa doença extra entérica levando ao aparecimento de bacteriemia e infeção sistêmica (Gal-Mor, Boyle & Grassl, 2014). Em indivíduos imunocompetentes a aderência e a invasão do epitélio do intestino delgado despoleta uma intensa chamada de neutrófilos ao local, o que contribui para o controlo da infeção extra-intestinal

Após recuperação, a eliminação do microrganismo pelas fezes pode persistir entre 4 (Gal-Mor, Boyle & Grassl, 2014) a 12 semanas após a infeção, sendo que menos de 10% dos humanos afetados torna-se portador assintomático por períodos mais longos (Annous & Gurtler, 2012). Crianças com idade inferior a 5 anos (Figura 3) excretam a bactéria nas fezes por um período médio de 7 semanas, que se prolonga se houver necessidade de realizar antibioterapia (Gal-Mor, Boyle & Grassl, 2014).

Figura 3 Crianças com idade inferior a 5 anos constituem um grupo de risco para a infeção por Salmonella sp. transmitida por Répteis (imagem cedida por Shirley Wiggins).



A transmissão de *Salmonella* sp. a humanos através do contacto com répteis pode dar origem a um quadro de bacteriemia, gastroenterite ligeira a grave, meningite, osteomielite, peritonite e pleurite. A transmissão de *Salmonella* sp. por répteis raramente é uma condição fatal para humanos (Chambers & Hulse, 2006), no entanto existem vários casos de doença (Meervenne et. al., 2009) e surtos (Friedman et. al., 1997) descritos, alguns deles em que a infeção teve evolução fatal.

4.1. Primeiros relatos e medidas implementadas

O primeiro caso de transmissão de *Salmonella* sp. associada a répteis foi reportado em 1943, tendo sido apontado como veículo potencial um quelónio. A ocorrência deste tipo de casos aumentou nos 20 anos seguintes, sendo que em 1963 foi reportado o primeiro caso provado de transmissão de *Salmonella* sp. por tartarugas numa criança de 7 anos de idade, que apresentava diarreia, vómitos e febre, tendo sido isolada *Salmonella* Hartford a partir da tartaruga de estimação pertencente à família (Mitchell & Shane, 2001).

Dentro do grupo dos répteis, as tartarugas tornaram-se animais de estimação muito populares devido ao seu temperamento dócil, locomoção lenta e fácil manuseamento, o que levou a que fossem considerados um bom animal de estimação para crianças. Na década de 60 e início da década de 70, esta popularidade, principalmente da Tartaruga de orelhas vermelhas (*Traquemys scripta elegans*), foi presumivelmente responsável pelo aumento do número de casos de transmissão de *Salmonella* sp. por répteis, tendo sido estimado que uma em cada

25 casas tinha um réptil como animal de companhia (Harris *et al.*, 2010) e que cerca de 18% dos casos de salmonelose que afetava crianças na faixa etária dos 1 a 9 anos de idade se devia ao contacto com tartarugas detidas como animais de estimação (Mermin *et al.*, 2004). Em 1972 foi realizado um estudo que observou uma prevalência da *Salmonella* sp. em tartarugas de aproximadamente 40% e que o uso de antimicrobianos, nomeadamente sulfato de gentamicina (Warwick *et al.*, 2001), nos ovos reduzia a prevalência em apenas 0,2% (Mitchell & Shane, 2001). Nesse mesmo ano, a “Food and Drug Administration”(FDA) implementou a certificação do estatuto de “*Salmonella-free*” para o transporte de tartarugas entre estados nos Estados Unidos da América (EUA); no entanto, este programa foi ineficiente, sendo que, segundo o CDC, 38% dos animais certificados como “*Salmonella-free*” encontravam-se infetados (Mitchell & Shane, 2001).

Anteriormente a 1975, foram implementadas várias estratégias para reduzir ou eliminar a presença de *Salmonella* sp. em tartarugas. Devido à proibição de comercialização imposta em 1975, começaram a ser exploradas um conjunto de técnicas que visavam produzir tartarugas “*Salmonella-free*”. Uma das técnicas consistia na lavagem da superfície dos ovos, sendo posteriormente realizada uma lavagem da superfície do ovo com antibiótico numa câmara de fluxo, de forma a permitir a entrada de gentamicina para o seu interior. Com este procedimento, o número de bactérias *Salmonella* sp. presentes com potencial para infectar o embrião diminuía, mas esta técnica não permitia garantir que os novos embriões tratados fossem realmente isentos de *Salmonella* sp. Mais tarde, foi descoberto que os répteis são, na sua maioria, assintomáticos quando infetados por *Salmonella* sp. e que esta pode ser excretada intermitentemente, mesmo por répteis “*Salmonella-free*”. Adicionalmente os répteis “*Salmonella-free*” desenvolveram capacidade de resistência a compostos antimicrobianos utilizados na antibioterapia destes animais. Mesmo com o tratamento realizado aos ovos antes da eclosão do réptil, devido à natureza ubiqüitária de *Salmonella* sp., provavelmente estes animais seriam infetados mais tarde através da manipulação, alimentação ou da contaminação cruzada decorrente da densidade populacional elevada (Harris *et al.*, 2010) não sendo a longo prazo realmente eficientes.

Foi testada, a administração de oxitetraciclina na água do tanque a tartarugas adultas e crias, durante 14 dias, e também o tratamento de ovos de tartaruga com oxitetraciclina e cloranfenicol, que se verificou ser eficaz apenas em ovos após um dia de ovopostura (Harris *et al.*, 2010).

Devido ao risco de transmissão ser até 23 vezes superior (Mermin, Hoar & Angulo, 1997) no que se refere a crianças com inferior a 1 ano de idade, em 1975, foi proibida a venda de tartarugas com a dimensão da carapaça inferior a 4 polegadas (aproximadamente 10,2 cm), nos EUA e também Canadá e Suécia.

Por se tratarem de animais mais pequenos, as crianças têm tendência para colocá-las na boca, devido ao facto de serem vistas como brinquedos, levando ao aumento do potencial de transmissão de *Salmonella* sp. (Harris *et al.*, 2010). Segundo a FDA, tartarugas com dimensão superior à medida estabelecida são menos manuseáveis por crianças com idade menor de 5 anos, o que diminui a frequência do contacto e risco de transmissão (Mitchell & Shane, 2001). Depois da imposição desta lei, a produção de tartarugas passou de 15 milhões para 2 milhões de tartarugas por ano, e verificou-se uma redução de 77% da incidência de salmonelose associada a tartarugas em crianças com idades entre os 1 e 9 anos (Mermin *et al.*, 2004 e Mitchell & Shane, 2001). No entanto, como esta não restringiu a exportação de tartarugas dos EUA outros países, verificou-se a presença de surtos noutros países como, por exemplo, em Porto Rico (Mitchell & Shane, 2001).

Apesar da lei estabelecida em 1975, o número de casos de salmonelose transmitida por répteis apresentou um grande aumento na década passada. Segundo a base de dados do European Surveillance System, o número de crianças com idade inferior a 3 anos infectadas com serotipos associados ao contacto com répteis aumentou (Pees *et al.*, 2010). Em 1996, o CDC estimou que os casos de transmissão de *Salmonella* sp. por répteis representavam 3-5% dos 2 a 6 milhões de casos anuais de salmonelose registados nos EUA, sendo que este aumento está provavelmente associado ao aumento na última década do número de répteis detidos como animais de estimação (Mitchell & Shane, 2001), tal como reportado pelo CDC em 2006, 2007 e 2008 (Harris *et al.*, 2010). Este aumento também se verificou na Europa (Cain & Tyre, 2009).

Entre 1989 e 1993 houve um aumento da importação de 82%, sendo que o número de répteis importados passou de 1.1 para 2.1 milhões de animais (Mitchell & Shane, 2001).

A importação de iguanas verdes (*Iguana iguana*) apresentou o maior aumento, 431% anualmente (Mitchell & Shane, 2001). A importância destes animais como veículo de transmissão de *Salmonella* sp. foi reconhecido em 1996, quando uma criança de 3 anos de idade faleceu devido a uma infeção por *Salmonella* Pomona tendo sido o mesmo serotipo isolado a partir da iguana que vivia na casa como animal de estimação, apesar de não existir contacto direto entre o réptil e a criança (Mitchell & Shane, 2001). Depois deste primeiro caso mortal seguiram-se uma série de casos de infeção de crianças com diversas idades, de indivíduos imunodeprimidos e até indivíduos saudáveis (Mitchell & Shane, 2001). Uma revogação da lei na Suécia, em 1996, levou a que o número de casos de Salmonelose transmitida por répteis triplicasse no ano seguinte por aumento do número de répteis adquiridos como animais de estimação.

Na Europa, a proibição de comercialização só ocorreu em 1997, para impedir a introdução de espécies exóticas, como é o caso de tartarugas de água doce (Warwick *et al.*, 2001). Em 2001, estima-se a presença de cerca de um milhão de répteis nos lares britânicos, o que

provavelmente contribuiu para o aumento dos casos reportados de transmissão de *Salmonella* sp. por répteis (Warwick *et al.*, 2001). Apesar de esporádicas, as ocorrências e relatos de casos continuam a existir.

A comercialização de répteis de vida selvagem capturados para comercialização é uma prática em ascensão, sendo considerado, a seguir ao comercial ilegal de drogas, o segundo maior comércio ilegal do mundo (Green, 2005).

Este facto levanta várias questões éticas e de bem-estar animal para além do levantamento de questões em relação a conservação de espécies e riscos para a Saúde Pública. No entanto, apesar de estarem presentes este tipo de preocupações continua a existir uma grande procura e pressão para adquirir algumas espécies (Green, 2005).

A grande arte da biodiversidade terrestre de répteis esta entre o Trópico de Câncer e Trópico de Capricórnio e por esta razão grande parte do número de animais capturados é proveniente de países destas regiões do mundo tendo como destino países em que existe um poder económico relativamente grande como, por exemplo, o Japão, Estados Unidos da América e a maioria dos países da Europa (Green, 2005).

Segundo dados de 2005, cerca de 82% do comércio internacional de répteis vivos abrangidos pelo CITES tinham origem nos EUA, sendo este país apontado como o maior importador de répteis para a indústria de animais de estimação (Centers for Epidemiology and Animal Health, 2001). O número de animais exportados neste país também é grande sendo uma grande percentagem dos indivíduos Tartarugas de orelhas (*Traquemyd scripta*). A sua exportação em massa foi responsável pela introdução da espécie em países da África, Ásia e Europa (sendo hoje em dia proibida a sua comercialização na europa). A exportação de répteis dos EUA tem também como objetivo satisfazer as necessidades de mercado de alimentos principalmente no Leste e Sudeste da Ásia (Green, 2005).

Estima-se que 90% dos répteis silvestres capturados morrem no primeiro ano de cativeiro sendo que as principais razões se relacionam com a ocorrência de trauma físico antes da compra ou a não satisfação de necessidades básicas de manejo ou nutricionais. Esta elevada percentagem de mortalidade pode estar relacionada também com más práticas de captura ou de acondicionamento durante o transporte, que chega por vezes a durar dias (Green, 2005). Por outro lado, mesmo quando o animal é adquirido já com sinais clínicos de doença, grande parte dos proprietários não procura ajuda veterinária em parte pelo não reconhecimento da situação e por outro lado porque o custo de tratamento acaba por ser superior a aquisição de um novo espécime (Green, 2005).

Embora exista nos dias de hoje algumas leis e proibições de comercialização em que são aplicada penas e coimas, como é o caso da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Silvestre (CITES) uma parte considerável das espécies não se encontra regulamentada (Green, 2005 e Robisson, John, Griffiths & Roberts,

2015). Existem países como é o caso da Noruega em que a manutenção de animais exóticos é proibida sob a lei do bem-estar animal (Robisson, John, Griffiths & Roberts, 2015).

Nos EUA, ocorre anualmente um número total de 1.4 milhões de casos, sendo que 74 000 resultam da exposição a répteis ou anfíbios (Berthand et. al.,2008). Em 2006, foi reportado um total de 160 649 casos de salmonelose em humanos, em 25 países da União Europeia, Bulgária, Roménia, Islândia, Liechtenstein e Noruega (Berthand et. al.,2008), não se sabendo ao certo quantos casos anuais têm transmissão associada a répteis.

Na Bélgica foram detetados aproximadamente 3 000 - 5 000 casos de infeção por *Salmonella* sp. desde 2005, incluindo casos esporádicos de salmonelose transmitida por animais. Neste país foi reportado em 2007, um caso de septicémia numa criança de 4 meses de idade causada por *Salmonella enterica* serovar Pomona, tendo sido demonstrado que a responsável pela transmissão foi a tartaruga da família (Berthand et. al.,2008).

Neste mesmo país, em Abril de 2008, foram reportados 3 casos de infeção, numa mulher de 57 anos de idade e em dois bebés com 1 e 2 meses de idade, por *S. enterica* subspécie *Arizonae*, associados a exposição a serpentes (Berthand et. al.,2008).

Na Filândia, são reportados anualmente cerca de 2 300 a 3 000 casos, estimando-se que menos de 20% sejam promovidos pelo contacto com animais. Durante o período de 2005 a 2008, foram relatados três casos de salmonelose associada a transmissão por répteis afetando: uma mulher de 50 anos de idade, uma bebé de 7 meses de idade e uma de 10 meses de idade (Berthand et. al.,2008).

Em França foram identificados 3 casos: dois deles ocorridos em 2005 e que afetaram um bebé de 8 meses e uma criança de 3 anos. Em ambos foi possível o isolamento de *S. enterica* serovar Typhimurium multi-resistente, tendo-se demonstrado que a infeção ocorreu após contacto com uma serpente e uma iguana. No terceiro caso, a infeção ocorreu numa criança de 4 anos indiretamente, através do consumo de sopa de tartaruga importada da China (Berthand et. al.,2008). De facto, os alimentos de origem animal constituem um de muitos veículos de transmissão de *Salmonella* sp. para humanos. A carne de determinadas espécies de répteis consumida por humanos pode não ser corretamente inspecionada e processada, constituindo um grande risco para a Saúde Pública (Maciel, et al., 2009).

Na Alemanha, o número de casos reportados de *Salmonella* sp. transmitida por répteis tem vindo a aumentar desde 2005. A maioria dos casos afeta crianças, por vezes com menos de 1 ano de idade, devido a transmissão direta ou indireta por de répteis que habitam na mesma casa. Entre 2006 e 2008 foi possível identificar 43 casos de salmonelose com transmissão associada a répteis, tendo sido possível associar a fonte de transmissão a Dragões-barbudos (20,9%), Ofídios de diversas espécies (27, 9%), Geckos (4,65%), Iguanas (9,3%) ou ao contacto indireto com os donos ou familiares detentores de répteis (6,97%) (Berthand et. al.,2008).

Na Letónia, apenas existe um caso reportado de transmissão de salmonelose por répteis no período de 2005 a 2008. Neste caso, que afetou uma criança de 2 anos, foi isolada *S. enterica* serovar Stanley. A via de transmissão foi oral, através ração fornecida ao réptil (Berthand et. al.,2008).

Não existem registos de casos de salmonelose transmitida por répteis na Áustria, Bulgária, Estónia, Holanda, Luxemburgo, Malta, Noruega, Portugal, Roménia e Espanha. No entanto, esta ausência de dados pode apenas significar que o risco de exposição a répteis não é avaliado. Na Noruega, existe legislação específica que proíbe a aquisição de répteis como animais de estimação, sendo necessária autorização especial (Berthand et. al.,2008).

4.2. Características da infeção transmitida por répteis

A ocorrência de salmonelose transmitida por répteis parece ser independente do contacto direto com um réptil (Mermin et. al., 2004), pois num surto relacionado com Iguanas, apenas 14% dos indivíduos afetados tiveram contacto direto com os répteis. A transmissão pode ocorrer por contacto indireto, incluindo durante a uma visita a casa de proprietários de iguanas, limpeza do terrário e contacto com ração de tartaruga aquática (Mermin et. al., 2004).

Num estudo realizado em 2014 por Winkstrom, Fernstrom, Melin & Boqvist, com o objetivo de isolar *Salmonella* sp. a partir de répteis e respetivos ambientes, foi possível o isolamento destes microorganismos em 80% das casas que continham répteis, enquanto que a percentagem de isolamento diretamente a partir de répteis foi de apenas 49% (Winkstrom et. al., 2014). O mesmo estudo refere ainda que a maior parte dos répteis são reservatórios de *Salmonella* *Salamae*, *Salmonella* *Diarizonae* e *Salmonella* *Houtenae*. (Winkstrom et. al., 2014).

4.3.Vias de Transmissão

4.3.1.Transmissão oro-fecal

A transmissão de *Salmonella* sp. ocorre principalmente através da ingestão de alimentos contaminados, incluindo carne, leite e água. Os portadores assintomáticos, incluindo os animais poiquilotérmicos, podem ser responsáveis pela disseminação ambiental.

Apesar da via oral ser a mais comum, também se encontra descrita a contaminação através dos ouvidos e olhos (Warwick et al., 2001) sendo que a limpeza dos terrários ou aquários constitui um fator de risco de transmissão para o Homem (Duijkeren & Houwers, 2000).

A transmissão pode ainda ocorrer através do contacto com urina contaminada por fezes que permaneceram na cloaca, ou através do contacto com a pele do réptil, com o ambiente onde o animal habita, incluindo gaiolas, terrários e aquários (Warwick et al., 2001).

Assim, as crianças de idade inferior a 5 anos, apresentam maior risco de contágio, porque se encontram numa fase de exploração do Mundo, principalmente através do toque com as mãos e boca em objetos e animais (Duijkeren & Houwers, 2000). Constituem ainda grupos de risco os idosos e adultos imunocomprometidos, incluindo, por exemplo, portadores de VIH, grávidas e indivíduos sujeitos a quimioterapia ou terapêuticas imunossupressoras (Warwick *et al.*, 2001).

Também existem diversos estudos que indicam que a salmonelose transmitida por répteis pode estar relacionada com o género, uma vez que parece afetar mais frequentemente indivíduos do género masculino que feminino (Mermin *et al.*, 1997).

4.3.2. Transmissão por dentada

Dentadas de ofídios, sáurios e quelónios ou arranhadelas causadas pelas unhas de lagartos ou de tartarugas devem ser consideradas como potenciais vias de infeção (Warwick *et al.*, 2001).

Embora a microbiota oral de répteis possa ser, na sua maioria, constituída por bactérias Gram positivo, tais como *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp., existem estudos que revelam a presença de bactérias de Gram negativo em ofídios com estomatite, incluindo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia*, *Providencia rettgeri*, e *Salmonella* sp.

Estas bactérias podem ser transmitidas a humanos através de dentada, existindo pelo menos dois casos descritos de lesões em humanos provocadas pela mordedura de répteis: o primeiro por uma Iguana Verde (*Iguana iguana*) e outro causado por uma Pitão-reticulada (*Python reticulatus*).

Nos Estados Unidos existem vários casos e surtos reportados de salmonelose transmitida por répteis em que não ocorreu contacto direto com o réptil (Friedman *et al.*, 1997).

4.3.3. Transmissão por alimentos fornecidos a répteis

Segundo o Compendium of Measures to prevent Disease with animals in Public Settings (2013), a infeção pode ocorrer apenas através do contacto com o alimento do réptil. Encontra-se descrita a transmissão por ratos frescos, fornecidos como alimento a ofídios. Por esta razão, uma das recomendações é o fornecimento exclusivo de ratos congelados aquando da alimentação da serpente.

4.3.4. Estratégias de Prevenção

Uma medida básica inclui a lavagem das mãos com sabão neutro imediatamente após o maneo de um réptil ou de contacto com o seu terrário (Maciel, *et al.*, 2009). Esta medida permite ainda evitar que os humanos sejam vetores do agente.

No caso dos veterinários ou outros profissionais que manipulam répteis, a lavagem das mãos após manipulação pode não ser suficiente (Warwick *et al.*, 2001). Além disso, alguns répteis,

como os ofídios, podem andar a vaguear pelo corpo do veterinário ou dono, passando pelos braços, pescoço e roupa, levando à disseminação do agente. (Mermin et. al., 2004).

As recomendações gerais (Tabela 3) são relevantes no caso dos répteis que apresentem diarreia, alterações na rotina ou sinais de stress (National Association of State Public Health Veterinarians Animal Contact Compedium Committee [NASPHV],2013).

Tabela 3-Algumas recomendações gerais de prevenção da transmissão de *Salmonella* sp. por répteis para humanos, segundo o CDC (adaptado de: *The center for food security & public health,2013*)

Recomendações gerais:
<ul style="list-style-type: none">• Evitar o contacto de crianças com menos de 5 anos, idosos ou pessoas imunocomprometidas devido a gravidez, neoplasia, quimioterapia, transplante de órgãos, diabetes, problemas hepáticos ou qualquer outra doença• Lavar as mãos cuidadosamente com sabão e água imediatamente após a manipulação do réptil e remoção das fezes, bem como de gaiolas ou superfícies que tenham entrado em contacto com estes animais• Não proceder à higiene dos animais ou terrários em casas de banho ou superfícies de cozinhas;• Desinfetar os aquários ou terrários com uma solução de Hipoclorito de Sódio diluída• Separar o réptil de qualquer alimento dos locais de preparação de alimentos;

Os répteis devem ter o seu alojamento próprio, sendo que o terrário ou aquário, consoante as espécies, deve ser pensado de forma a minimizar o contacto com animal de material fecal ou superfícies e recipientes não higienizados (NASPHV,2013)

Os potenciais compradores devem ser informados sobre os riscos existentes. Adicionalmente, deve ser considerada a colaboração com organizações relacionadas com saúde infantil, e também com entidades responsáveis pela Saúde Pública, de modo a que produzam material educacional sobre transmissão de *Salmonella* sp. em répteis. Deve-se ainda promover a integração destes temas no programa da escolaridade obrigatória e disponibilizar informação nos consultórios pediátricos (Harris et al., 2010).

4.4 Diagnóstico

O diagnóstico de salmonelose transmitida por répteis muitas vezes não é imediato. Uma percentagem dos casos de infeção transmitida por répteis tem resolução autolimitante e geralmente não se consegue provar a origem da infeção. Apenas em situações em que há uma franca evolução e persistência dos sintomas é que se considera a possibilidade de que a infeção seja veiculada por animais, e só se consegue chegar à fonte de transmissão quando é referida a possibilidade de contacto recente com répteis (Mermin et. al., 2004).

Em casos de Salmonelose, o isolamento pode ser realizado através de amostras fecais e de sangue, no caso de doença sistêmica (CFSPH, 2013). A identificação pode ser realizada por testes bioquímicos ou por serologia, com possibilidade de confirmação dos serotipos (CFSPH, 2013).

Os critérios para avaliação da excreção de *Salmonella* sp. referem que é necessário obter três culturas negativas realizadas a partir de amostras de fezes e distanciadas entre si por pelo menos duas semanas (Duijkeren & Houwers, 2000).

4.5. Tratamento

Em situações de infecção ocorrida em indivíduos imunocompetentes, nos quais a resolução da doença é autolimitante com sintomas entéricos ligeiros, geralmente não chega a ser instituída terapêutica. Nos casos em que os sintomas são moderados com possível evolução para graves e em que o indivíduo afetado pertence aos grupos de risco, adveve ser instituída terapêutica apropriada: fluidoterapia e antibioterapia de largo espectro, embora esta contribua para aumentar o tempo de excreção do agente (Calderón *et al.*, 2012).

Nos anos 90, os antibióticos de primeira linha usados para tratamento de Salmonelose incluíram o cloranfenicol, a ampicilina e sulfametoxazole-trimetoprim que, por terem sido amplamente difundidos, começaram a potenciar aparecimento de resistências em serotipos de *S. enterica*. Por esta razão as fluorquinolonas, como por exemplo a ciprofloxacina, passaram a constituir os antibióticos de primeira linha no tratamento da salmonelose.

A ciprofloxacina apresenta um átomo de hidrogénio na posição *para* do anel piperazínico enquanto que a enrofloxacina difere desta pela apresentação um grupo etilo na mesma posição. Esta semelhança a nível estrutural permite a conversão da enrofloxacina, após administração, rapidamente em ciprofloxacina, no caso dos mamíferos (Sousa, 2007). No caso dos gatos, por exemplo, o tempo de semi-vida após administração de enrofloxacina, por via oral, é de treze minutos sendo que após este tempo o metabolito produzido, ciprofloxacina, entra em circulação. No caso dos cães 80% da enrofloxacina administrada por via oral permanece inalterada, sendo por isso variável a percentagem de conversão estado dependente da espécie e vias de administração escolhidas, entre outros fatores. É por isso possível, observando o comportamento da enrofloxacina especular o comportamento da ciprofloxacina aquando da realização do teste de sensibilidade a antibióticos (Castela, 2013). No entanto, o aumento da resistência bacteriana em relação a estes últimos compostos levou à necessidade da administração de novos antimicrobianos como a gatifloxacina, que entretanto foi retirada do mercado. As cefalosporinas de 3ª geração são geralmente a segunda linha de compostos para tratamento da salmonelose (Calderón *et al.*, 2012), sendo os agentes preferenciais quando a terapêutica é instituída em crianças (Gal-Mor *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a azitromicina apresenta atividade contra estirpes multirresistentes a ácido nalidíxico e outros antimicrobianos.

A multiresistência antimicrobiana é particularmente comum em *Salmonella* Typhimurium e Newport, sendo que estes serotipos geralmente estas estão na origem de sintomas mais graves (Veigas, 2009).

5. Materiais e Métodos

5.1. Objectivos do estudo

A presente dissertação, teve como objectivo geral o isolamento e caracterização de *Salmonella* sp. presente na microbiota intestinal de várias espécies de répteis detidos como animais de companhia e como animais de exposição ou de coleção na zona da Grande Lisboa e Margem Sul do Tejo, até à península de Setúbal. Para tal procedeu-se à análise de amostras recolhidas por zaragatoa cloacal, no período de 8 de outubro a 31 de novembro de 2014 sendo a origem da maioria dos animais amostrados desconhecida.

Os objetivos específicos incluíram:

- I. – Isolamento e identificação *Salmonella* sp. na amostra em estudo (n=78), através de galerias de identificação bioquímica e serologia
- II. – Caracterização do perfil de resistência dos isolados a antibióticos das bactérias isoladas, através do método de difusão em disco (Kirby- Bauer).
- III. - Caracterização fenotípica da produção de fatores de virulência pelos isolados obtidos

5.2. Amostragem

Foram recolhidas um total de 78 amostras fecais por zaragatoa cloacal. As amostras foram originárias de diferentes espécies de répteis (Ofídios n=8, Saurios n=27, Quelónios n=43), de diferentes zonas geográficas na área da grande Lisboa e Margem Sul do Tejo

As amostras foram recolhidas durante a realização de consultas de rotina, consultas de reavaliação clínica, na residência dos proprietários dos animais e lojas de animais.

Antes da amostragem foi realizado um questionário ao proprietário do réptil (anexo 1).

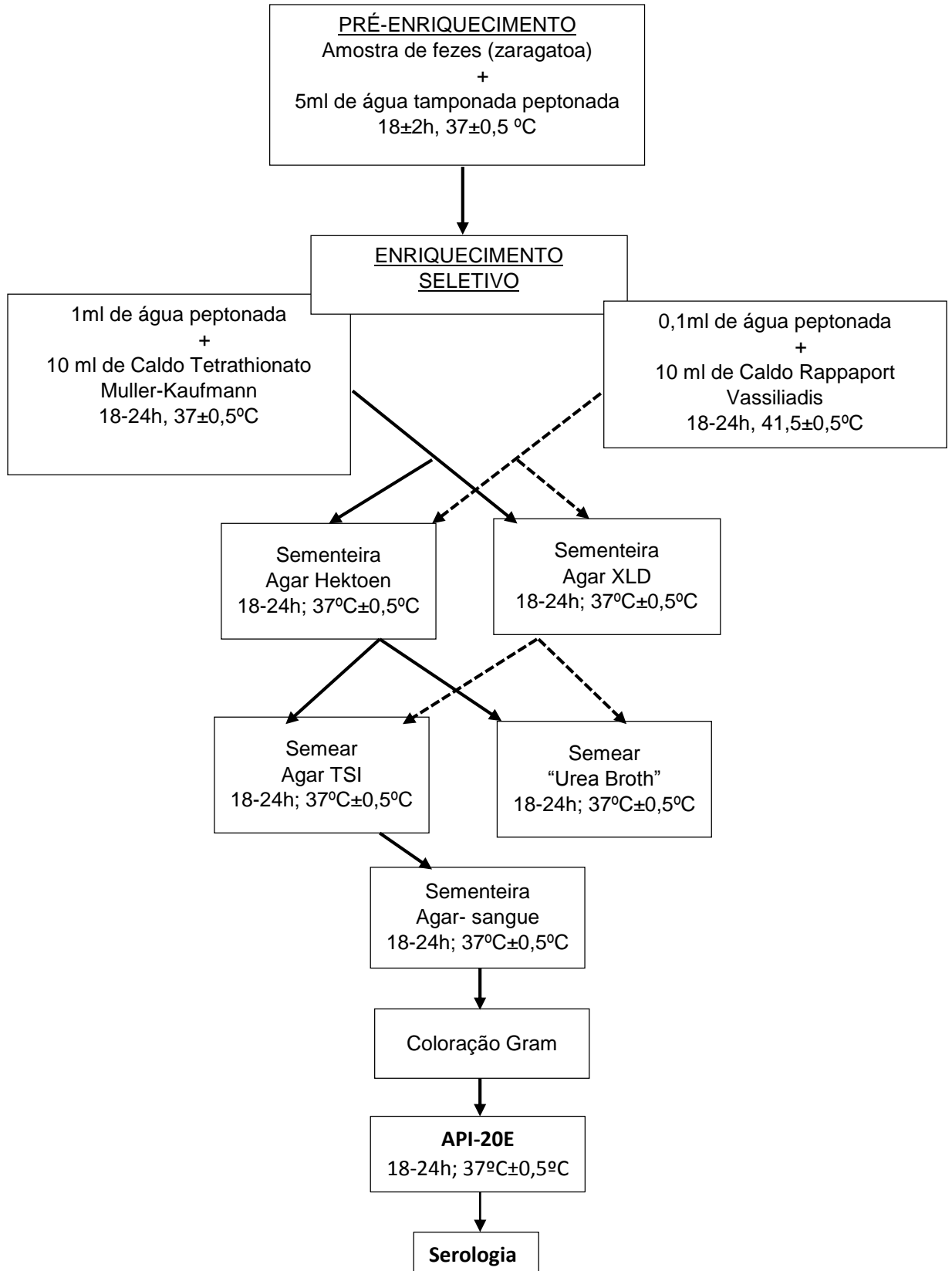
Após a recolha da amostra, esta foi mantida em refrigeração (+4°C) até ao início do processamento que ocorreu num período máximo de 48 horas.

O processamento de todas as amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa).

5.3. Isolamento e identificação de *Salmonella* sp.

O isolamento e identificação de *Salmonella* sp. foram realizados através de métodos convencionais bacteriológicos, realizados com base na utilização de meios de enriquecimento selectivos, que permitem a inibição de outros géneros bacterianos, tendo sido realizado de acordo com a representação presente no Esquema 4.

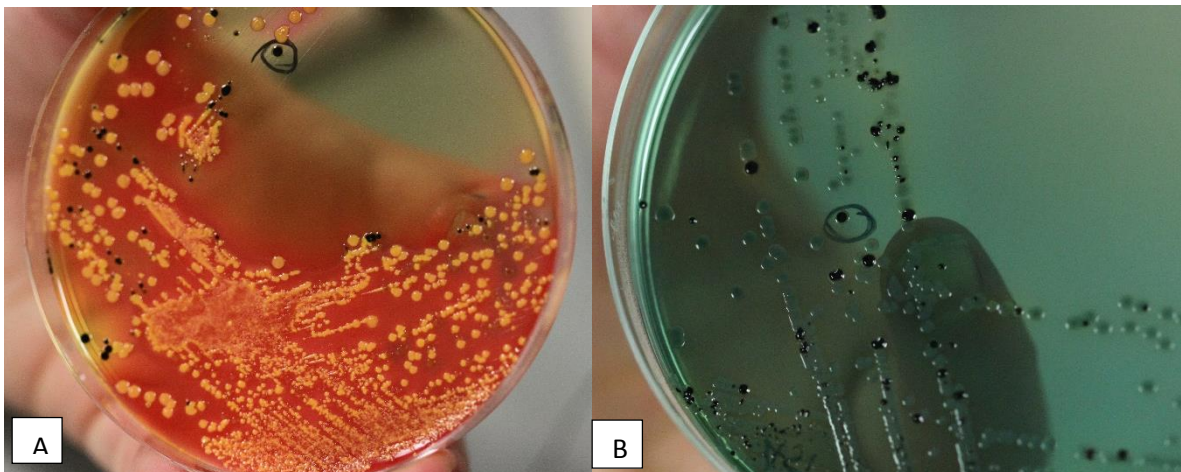
Esquema 4 - Fluxograma de isolamento de Salmonella sp. em amostras provenientes de répteis. (Adaptado de Hendriksen, 2003).



As zaragatoas cloacais foram colocadas em 5ml de água peptonada tamponada- APT (Scharlau, 02-277-500, Sentmenat, Spain), que constitui um meio de pré-enriquecimento. As amostras em APT foram homogeneizadas e incubadas durante 18 ± 2 horas, a $37\pm 0,5$ °C. Após incubação, adicionou-se 1ml da suspensão bacteriana em 10ml de Caldo Tetrathionato Muller-Kaufmann- MKTT (Oxoid, ISO:6579, Hampshire, Inglaterra) ($18-24$ h, $37\pm 0,5$ °C) e 0,1 ml de suspensão bacteriana em 10 ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, BK148HA, Hampshire, Inglaterra) ($18-24$ h, $41,5\pm 0,5$ °C).

Finalizado este período, foi realizada sementeira por esgotamento em placas de Agar Hektoen (Liofilchem, Ref 610021, Via Scozia, Itália) e Agar “Xylose Lysine Deoxicholate”- XLD (Scharlau, VWR 846670500, Barcelona, Espanha), ambos meios seletivos, incubadas posteriormente a $+37\text{°C}\pm 0,5\text{°C}$ durante 20 ± 2 horas (Figura 4).


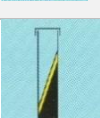
Figura 4 Aspetto de colónias sugestivas da presença de *Salmonella* sp. nas amostras testadas em Agar XLD (A) e Agar Hektoen (B).



As colónias presuntivas foram repicadas para Agar “Triple Sugar Iron”- TSI (Scharlau, Ref 01-192, Barcelona, Espanha) em gelose inclinada e incubação a $+37\text{°C}\pm 0,5\text{°C}$ durante 20 ± 2 horas. Em paralelo, também foi realizada a repicagem das mesmas colónias suspeitas para “Urea Broth” (Oxoid, Ref 227210, Le Point de Claix, França).

O padrão de crescimento bacteriano observado no agar TSI e “Urea Broth” permitiram realizar a identificação presuntiva de resultados como *Salmonella* sp. (Tabela 4), tendo sido posteriormente submetidos a confirmação através de identificação bioquímica por galerias API-20E (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France).

Tabela 4- Padrão de crescimento de alguns géneros de *Enterobacteriaceae* em Agar TSI e “Urease Broth”. (adaptado de: Quinn., Carter, Donnelly & Leonard, 2002)(+)- Reação positiva; (-)- Reação negativa

	TSI			Teste da urease	Aspeto geral
	Rampa	Fundo	Produção de H ₂ S		
Maioria das espécies de <i>Salmonella</i>	vermelha	amarela	+	-	
<i>Salmonella Cholerasuis</i>	vermelho	amarelo	-	-	
<i>Salmonella arizonae</i>	amarelo	amarelo	+	-	
<i>Proteus vulgaris</i>	amarelo	amarelo	+	+	
<i>Proteus mirabilis</i>	vermelho	amarelo	+	+	
<i>E. coli</i>	amarelo	amarelo	-	-	
<i>Shigella</i> spp.	vermelho	amarelo	-		

5.4. Serotipagem

A identificação bioquímica foi confirmada por serologia utilizando soros comerciais (Soro poli-A *Salmonella* Difco (County Clare, Ireland)).

Com o auxílio de uma ansa, procedeu-se à suspensão de uma colónia de cada isolado, obtidas a partir de culturas puras em agar-sangue com 24 horas de incubação a + 37 °C, sobre uma lâmina.

A observação de uma reação positiva corresponde à formação de agregados macroscópicos não dissociativos devido à presença de antígenos O, permitindo a confirmação da identificação dos isolados como pertencentes ao género *Salmonella*. A ausência de aglutinação com formação de uma suspensão bacteriana de aspeto leitoso e homogéneo corresponde a uma reação negativa, não permitindo confirmar a identificação dos isolados através de API-20-E.

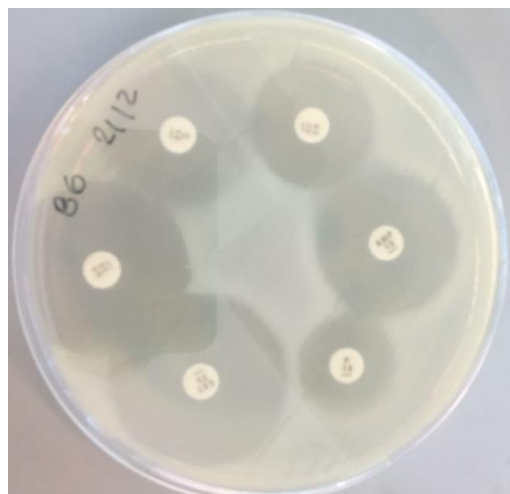
5.5 Teste de sensibilidade a antibióticos

A caracterização fenotípica do perfil de resistência antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer, de acordo com as normas estabelecidas pelo CLSI, testando 12 compostos antimicrobianos frequentemente utilizados na prática clínica de répteis e também em Medicina Humana.

Após realização de uma suspensão bacteriana, com grau de turvação de 0,5 na escala de McFarland (correspondente a uma concentração bacteriana de 1 a 2×10^8 UFC/ml), a partir de uma cultura pura semeada previamente em agar-sangue (incubação a $+ 37^\circ \text{C}$, 20 ± 2 h antes) foi realizada uma sementeira em tapete, com zaragatoa estéril, em placas de Agar Müller-Hinton (Liofilchem). Após a sementeira foram aplicados os discos correspondentes aos diferentes antibióticos selecionados previamente: Amoxicilina + Ácido clavulânico ($30 \mu\text{g}$), Ampicilina ($10 \mu\text{g}$), Penicilina (10U), Amicacina ($30 \mu\text{g}$), Gentamicina ($10 \mu\text{g}$), Cloranfenicol ($30 \mu\text{g}$), Ácido nalidíxico ($30 \mu\text{g}$), Ciprofloxacina ($5 \mu\text{g}$), Enrofloxacina ($5 \mu\text{g}$), Cefotaxima ($30 \mu\text{g}$), Tetraciclina ($30 \mu\text{g}$) e Sulfametoxazole+Trimetroprim ($25 \mu\text{g}$). Todos os antibióticos foram comercializados pela Oxoid.

Depois da aplicação dos discos, as caixas de Petri foram incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante $20\text{h} \pm 2\text{h}$. A leitura do diâmetro do halo de incubação obtido (mm) (Figura 5) foi realizada após este período, permitindo a classificação de cada isolado como Suscetível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R) a cada composto antimicrobiano, por comparação com os valores obtidos com as tabelas estabelecidas pelo CLSI (norma veterinária 2013).

Figura 5 Teste de sensibilidade a antibióticos realizado através do método de difusão em disco..



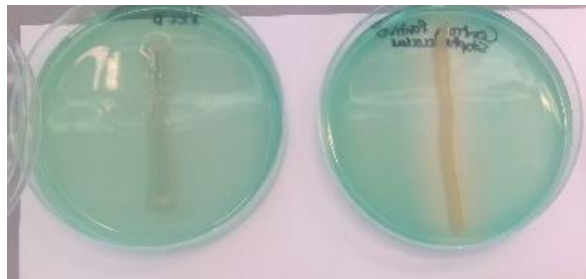
5.6. Avaliação fenotípica da produção de fatores de virulência

A caracterização fenotípica da produção dos fatores de virulência pelos isolados de *Salmonella* sp. (n=38) obtidos foi realizada através de testes em caixa de Petri.

5.6.1. DNase

Os isolados foram semeados em placas de DNase test agar (Liofilchem) suplementada com azul de toluidina 0,01%. Após sementeira foram incubadas a + 37 °C durante 48 horas, e a produção de DNase foi avaliada através da observação de um halo claro ao redor das colônias (Figura 6).

Figura 6. Placas de DNase test agar após incubação. Resultado negativo à esquerda e positivo à direita.



5.6.2. Gelatinase

Os isolados foram semeados em placas de *Gelatinase test agar* (Liofilchem) Após sementeira foram incubadas a + 37 °C durante 48 horas e finalizado o período de incubação a superfície das placas foi coberta por uma solução de cloreto de mercúrio. A produção de gelatinase foi avaliada através da observação de um halo transparente em redor das colônias (Figura 7).

Figura 7. Placa de gelatinase test agar obtida após incubação.



5.6.3. Hemolisina

A produção de hemolisina foi detetada a partir da sementeira dos isolados em placas Agar sangue (cos, Bio Mérieux) incubadas a + 37 °C durante 48 horas.

A produção de β -hemolisinas foi detetada pela presença de zonas mais claras em redor das colónias semeadas (Figura 8).

Figura 8. Presença de β -hemólise em placas de agar- sangue após o período de incubação.



5.6.4. Lipase

A atividade da lipase foi avaliada usando Spirit Blue Agar (Difco) suplementado com Tween 80 (30g/L). As placas semeadas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Após a incubação, a produção de lipase foi avaliada através da observação de um halo à volta das colónias (Figura 9.)

Figura 9. Aspecto da caixa de Petri após o período de incubação onde se pode observar a degradação lipídica total.



5.7. Isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de alimento e ambientais

O protocolo descrito em 5.3 para isolamento e identificação de *Salmonella* sp. a partir de amostras fecais de répteis foi ainda aplicado à análise de amostras de alimento e ambientais recolhidas num dos locais de amostragem.

Foram deste modo processadas as seguintes amostras:

- 20 gr de alimento vivo, baratas (n=1)
- 20 gr de substrato recolhido no terrário (n=1)
- 20 gr de substrato não utilizado (n=1).

5.8. Análise estatística

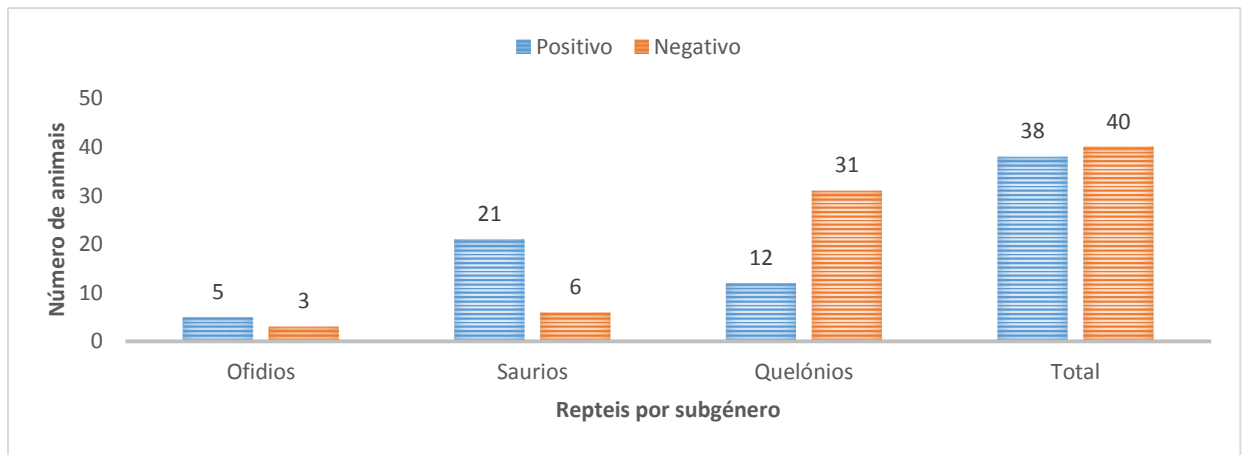
As diferentes variáveis consideradas e análise estatística foram avaliadas por Excel 2013 e com recurso ao software BioNumerics 6.6.

6. Resultados e Discussão

6.1. Amostragem e isolamento bacteriano

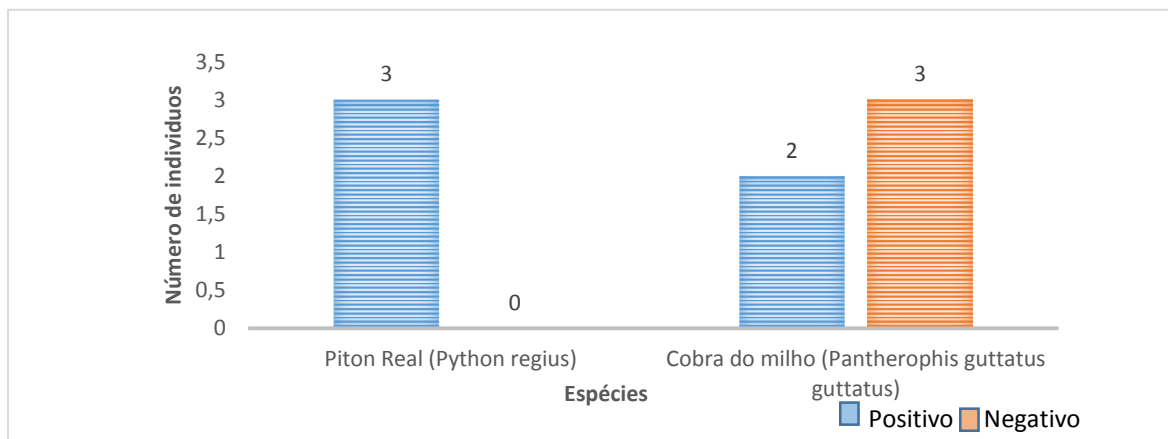
Das 78 amostras recolhidas, foi possível isolar *Salmonella* sp. a partir de 38 amostras, sendo assim a frequência de isolamento de 48,71% (38/78) (Gráfico 1).. Segundo Fornazi e Teixeira (2009), *Salmonella* pode ser isolada tanto a partir de animais de cativeiro como animais selvagens, e a taxa de isolamento também pode variar dependendo subgénero em causa.

Gráfico 1. Distribuição do número de animais amostrados por grupo taxonómico



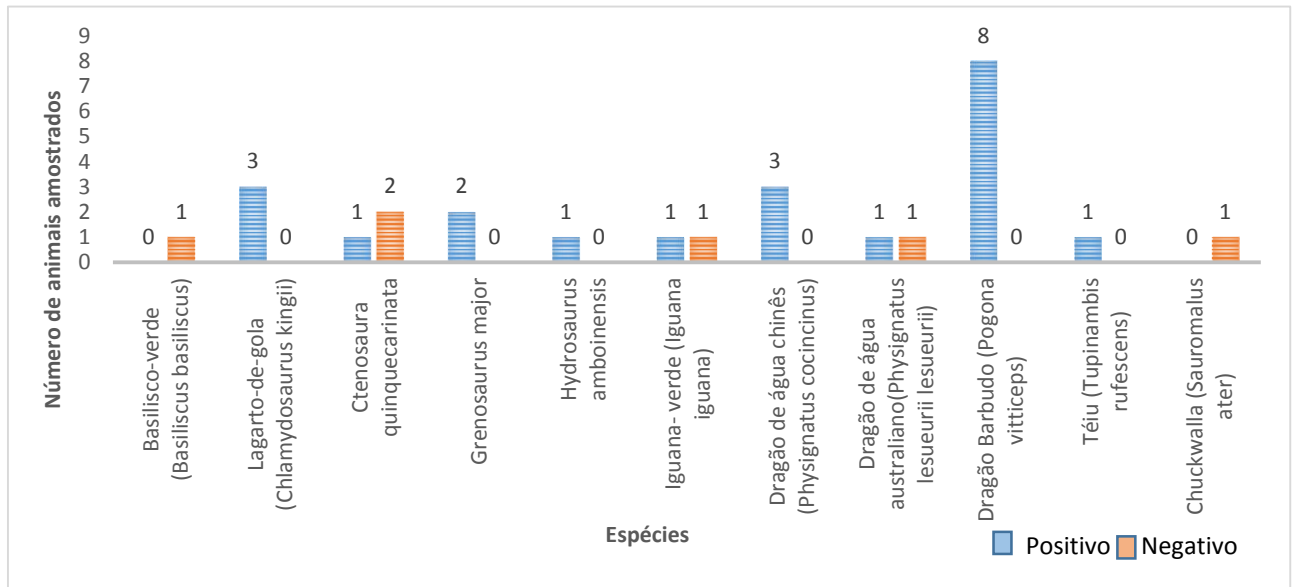
Os animais amostrados eram provenientes de diversas espécies. Em relação aos Ofídios foram recolhidas amostras de 2 espécies diferentes apenas: Pitão Real (*Python regius*) (n=3) e Cobra do milho (*Pantherophis guttatus guttatus*) (n=5), foi possível isolar *Salmonella* a partir de 3 amostras de *Python regius*, sendo que 2 animais pertencentes a espécie *Pantherophis guttatus guttatus* eram *Salmonella*-positivos (Gráfico 2). A percentagem de isolamento neste subgénero foi de 62,5% (5/8).

Gráfico 2 Distribuição dos ofídios amostrados por espécie



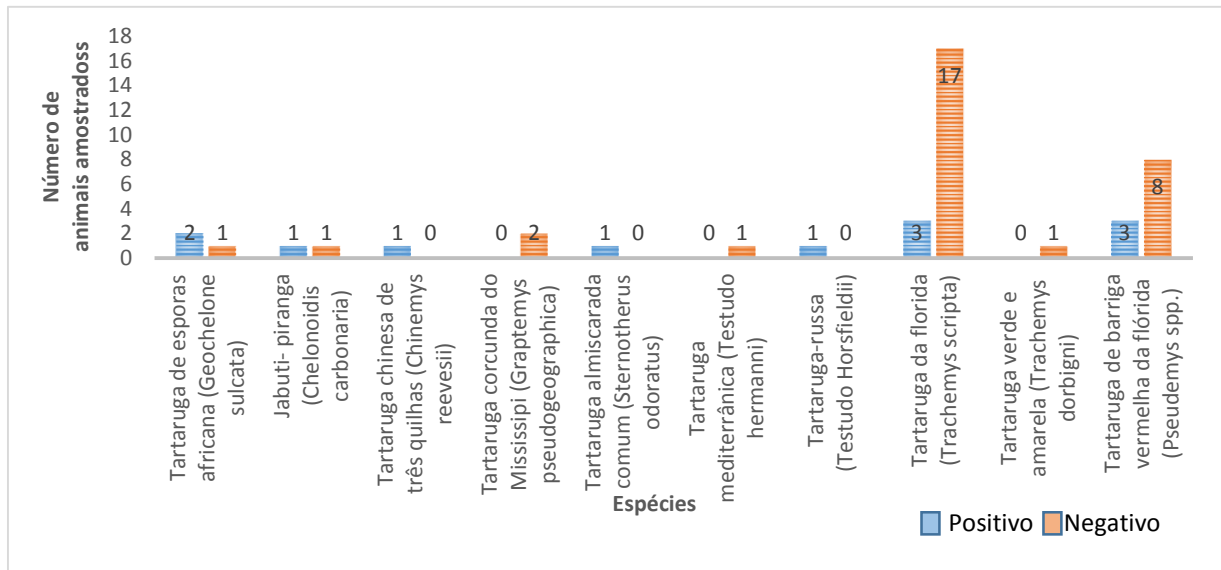
No caso dos Saurios, foram amostrados animais provenientes de 11 espécies diferentes: Basilisco-verde (*Basiliscus basiliscus*) (n=1), Lagarto-de-gola (*Chlamydosaurus kingii*) (n=3), Iguana negra (*Ctenosaura quinquecarinata*) (n=3), *Grenosaurus major* (n=2), *Hydrosaurus amboinensis* (n=1), Iguana verde (*Iguana iguana*) (n=2), Dragão de água chinês (*Physignatus cocincinus*) (n=3), Dragão de água australiano (*Physignatus lesueurii lesueurii*) (n=2), Dragão Barbudo (*Pogona vitticeps*) (n=8), Téiu (*Tupinambis rufescens*) (n=1) e Chuckwalla (*Sauromalus ater*) (n=1). Foi possível isolar *Salmonella* sp. em 21 das 26 amostras provenientes de Saurios (Gráfico 3). A percentagem de isolamento neste subgênero foi de 80,7 (21/26).

Gráfico 4 Distribuição dos Saurios amostrados por espécie



Foram recolhidas amostras provenientes de 10 espécies de quelônios: Tartaruga de esporas africana (*Geochelone sulcata*) (n=3), Tartaruga mediterrânica (*Testudo hermanni*) (n=1), Tartaruga-russa (*Testudo horsfieldii*) (n=1), Jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) (n=2), Tartaruga chinesa de três quilhas (*Chinemys reevesii*) (n=1), Tartaruga corcunda do Mississippi (*Graptemys pseudogeographica*) (n=2), Tartaruga almiscarada comum (*Sternotherus odoratus*) (n=1), Tartaruga verde e amarela (*Trachemys dorbigni*) (n=1), Tartaruga da Flórida (*Trachemys scripta*) (n=20) e Tartaruga de barriga vermelha da Flórida (*Pseudemys spp.*) (n=11) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Distribuição dos quelónios amostrados por espécie



A percentagem de isolamento deste subgénero foi de 27,9% (12/43).

De acordo com estes autores, a taxa de isolamento a partir de tartarugas pode variar entre 12,1% a 85%, em serpentes de 16 a 92% e em lagartos de 36 a 77% (Fornazi & Teixeira, 2009).

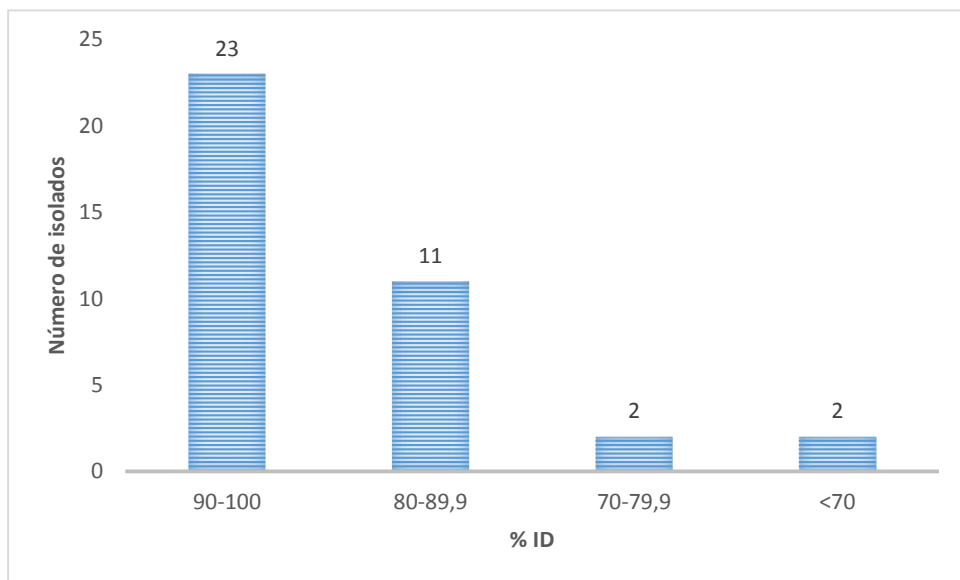
Variações sazonais podem ser responsáveis pelas taxas de isolamento baixas no caso dos quelónios, sobretudo na época que atecede a brumação (Corrente *et al.*, 2004). Além disso, as variações na imunidade parecem influenciar o controlo da infeção de diversos agentes. Estudos realizados por Pasmans e Haesebrowck (2004) em que seis tartarugas (*Trachemys scripta elegans*) foram infetadas experimentalmente por via oral com *Salmonella enterica* serovar Muercher, demonstrou-se que quando os animais eram mantidos a +37°C, *Salmonella* apresentava capacidade para atravessar a barreira intestinal e colonizar o fígado e o baço (2/6). De facto, em condições normais de temperatura (+26°C), *Salmonella* adere com sucesso ao muco intestinal de Quelónios, mas quando esta sobe para +37°C, a capacidade de adesão diminui significativamente. Quando as tartarugas são mantidas à temperatura ambiental ótima para a espécie, as bactérias não têm capacidade de invadir a parede intestinal eficientemente. Este mecanismo de invasão dependente da temperatura ajuda a explicar, qual a razão pela qual *Salmonella* sp. não é um agente patogénico primário do tracto digestivo da maioria dos répteis.

Segundo o boletim meteorológico sazonal referente ao outono de 2014 (setembro, outubro e novembro) em Portugal Continental foi possível constatar que na altura do ano em que foi realizada a colheita das amostras, a temperatura foi 2 °C mais elevada que no ano 2000, sendo a média do mês de outubro, por exemplo, + 17,6 °C (+1,4°C superior à considerada normal) sendo a média da temperatura mínima de + 12,8 °C e máxima de + 22,5 °C.

Também a época do ano em que foram recolhidas as amostras (período do ano que antecede à brumação) pode ter condicionado a percentagem de isolamento. Num estudo realizado na Alemanha e Áustria, uma taxa de isolamento de *Salmonella* baixa em Quelónios foi justificada pelo facto de as amostras terem sido colhidas num período em que as tartarugas não se alimentam, em novembro e dezembro (Geue & Loschner, 2002).

Em relação aos resultados obtidos em API-20E foi possível obter uma percentagem de identificação muito boa (90-100%) em 23 dos isolados obtidos, uma boa percentagem de identificação (80-89,9%) em 11 dos isolados obtidos e 4 dos isolados com percentagens de identificação baixas (<70%) (Gráfico 5). Foi possível ainda obter a identificação como *Salmonella* sp. (n=21) e *Salmonella choleraesuis* subsp. *Arizonae* (n=17).

Gráfico 5. Resultados obtidos em API-20E dos isolados obtidos.



6.2 Serotipagem

A serotipagem foi realizada com o objetivo de confirmar os resultados de identificação através das galerias bioquímicas API 20-E.

A serotipagem foi realizada apenas após a realização do TSA e da caracterização fenotípica dos fatores de virulência já indicados, por esta razão, todos os dados a seguir assinalados referem-se aos 38 isolados confirmados por API-20E.

Desta serotipificação resultou que em 6 dos 38 isolados obtidos verificou-se que não houve reação de aglutinação, que corresponde a um resultado positivo. Assim sendo, dos isolados testados apenas se confirma que 32 dos 78 inicialmente testados são realmente *Salmonella* sp. Deste modo, a taxa real de frequência de isolamento foi de 41,02% (32/78).

Estes resultados confirmam a necessidade de realizar a confirmação serológica após a identificação bioquímica dos isolados obtidos a partir de amostras biológicas de répteis.

Figura 10- Resultados obtidos por serotipagem: Resultado positivo (à esquerda) e resultado negativo (à direita).



6.3 Fatores que podem condicionar a excreção de *Salmonella* sp.

Com o objetivo de avaliar a influência de possíveis fatores de risco na excreção de *Salmonella* sp., foi realizado um questionário anteriormente à colheita, com o objetivo de registrar os seguintes aspectos em relação a cada animal: idade, número de pessoas com contacto diário, tipo de alimentação, se foi adquirido recentemente, desparasitado, se se encontrava em hibernação e se tinha sido sujeito a antibioterapia prévia. Considerou-se como recentemente adquirido todos os animais adquiridos há menos de 3 meses.

Neste estudo não foi considerada a variável género. No entanto, segundo Mondal e Rai (1999) as hormonas sexuais femininas e masculinas possuem uma atividade inibitória do sistema imunitário por influência da atividade dos macrófagos, embora esta atividade também esteja relacionada como a temperatura sendo mais elevada a + 25 °C. Não foi possível avaliar estatisticamente a influência das condições ambientais em que o animal se encontrava (dimensões do terrário e aquário, número de indivíduos alojados conjuntamente, disponibilidade de aquecimento ou luz UV ou habitação no interior ou no exterior) na excreção de *Salmonella*. O questionário realizado encontra-se representado no Anexo I. As percentagens relativas aos registos efectuados por questionário encontram-se representadas na Tabela 5.

Tabela 5 Avaliação dos fatores de risco associados à excreção de *Salmonella* sp. nos animais amostrados

	1 pessoa	57,89% (22/38)
Contacto	2 pessoas	23,68% (9/38)
Diário	3 pessoas	2,63% (1/38)
(nº de pessoas)	4 pessoas	2,63% (1/38)
	5 pessoas	13,16% (5/38)
Desparasitação	Sim	50% (19/38)
	Não	50% (19/38)
Hibernação	Sim	10,52% (4/38)
	Não	89,48% (34/38)
Recentemente adquirido	Sim	7,89% (3/38)
	Não	92,11% (35/38)
Doença recente	Sim	7,89% (3/38)
	Não	92,11% (35/38)
Antibióterapia	Sim	10,53% (4/38)
	Não	89,47% (34/38)

O contacto com um grande número de pessoas representa, muitas vezes, um aumento da manipulação e este estímulo pode desencadear um acréscimo de stress e consequentemente um aumento da frequência de excreção de *Salmonella* sp. Esta situação é frequente em animais de exposição ou de zoo, em que a manipulação e exposição são muito frequentes. O mesmo acontece com animais recentemente adquiridos. Dado que os répteis têm um período de adaptação muito prolongado, a modificação do ambiente é também um evento desencadeador de stress. O stress influencia os níveis de catecolaminas sendo responsável pelo seu aumento. As catecolaminas têm atividade imunossupressora, influenciando a capacidade de resposta imunitária do réptil (Roy & Ray, 2004).

Nos indivíduos amostrados, apenas 3 apresentavam doença manifesta ou recente relativamente ao momento da colheita; no entanto, nenhum apresentava nestas condições não apresentava sintomas, sistémicos ou outros, compatíveis com salmonelose.

No entanto, é importante referir que geralmente a resistência à infeção aumenta com a idade do animal (Fornazi & Teixeira, 2009). Estes indivíduos têm maior número de oportunidades de contacto com o agente, o que permite a produção de uma resposta humoral mais eficiente e consequentemente o controlo da infeção.

Relativamente à distribuição etária dos animais *Salmonella*-positivos, não foi possível estabelecer uma correlação referente à idade dos animais amostrados e o isolamento de *Salmonella* a partir das amostras colhidas (Gráfico 6 e 7).

Gráfico 6 Distribuição etária dos animais amostrados em que o isolamento foi negativo

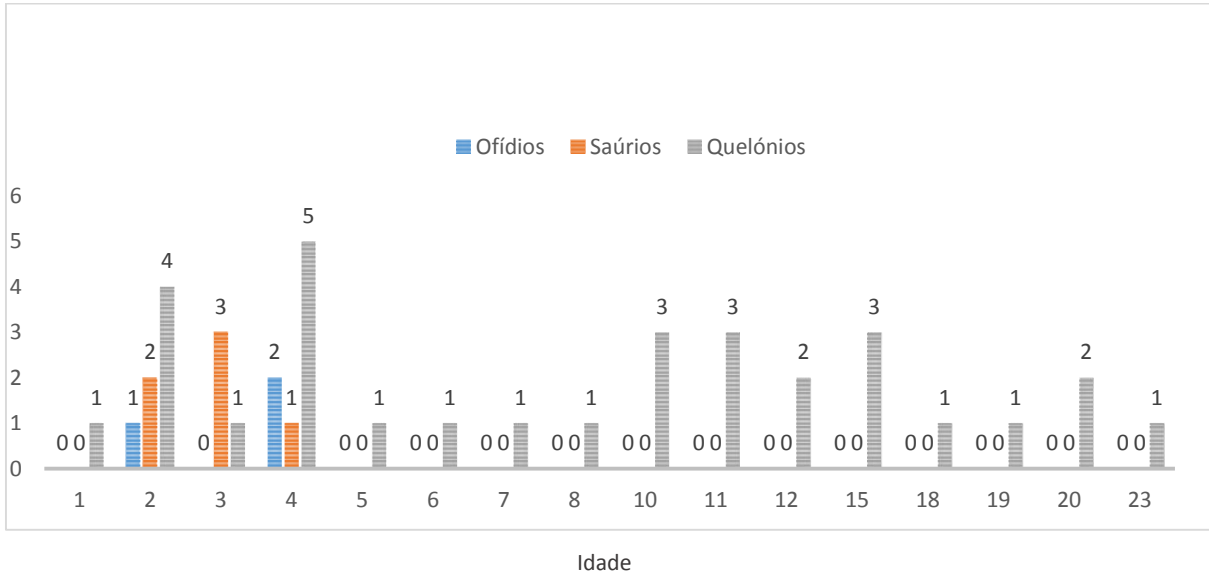
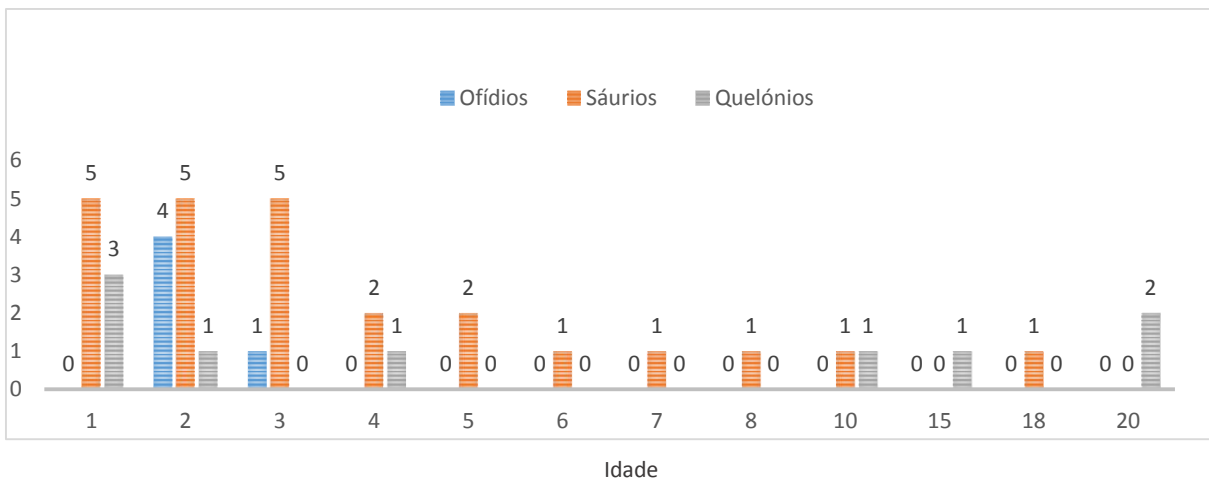


Gráfico 7 Distribuição etária dos animais amostrados em que o isolamento foi positivo

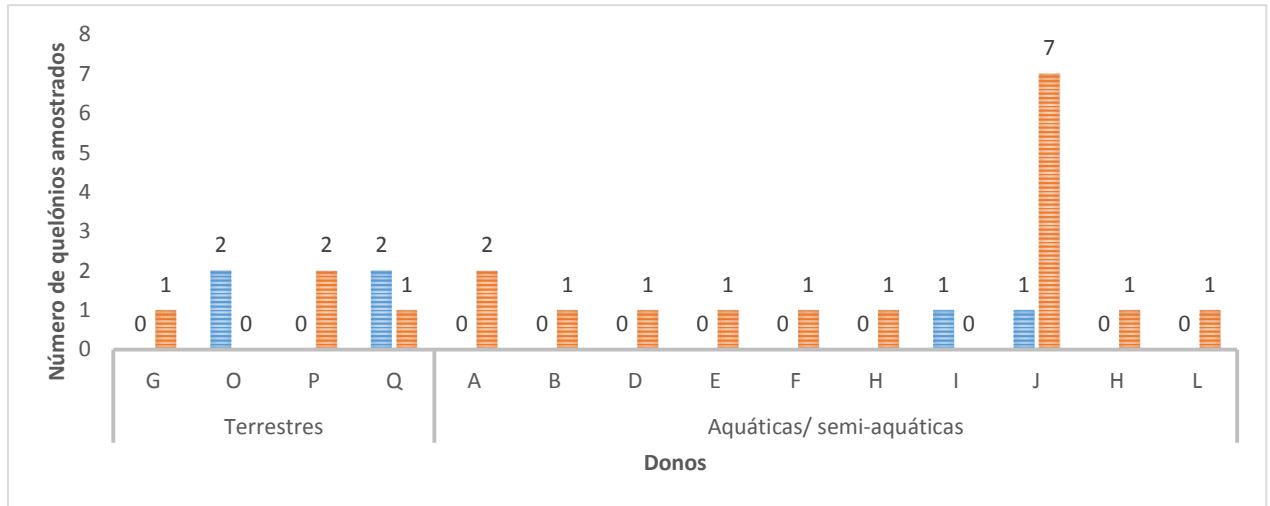


Outro fator que pode condicionar a excreção de *Salmonella* é a presença de um ou mais indivíduos no mesmo espaço. Quando temos apenas um réptil alojado num espaço com as condições ideais não existe competição pelo espaço, pela fonte de luz /aquecimento ou pela fonte de alimento (Mader, 2006).

A introdução de novos répteis, mesmo que sejam da mesma espécie, pode desencadear condições de stress e propiciar a excreção de *Salmonella* sp. Embora o número de répteis existentes num terrário ou aquário não tenha sido avaliado, vários autores afirmam que o

aparecimento de relações de competição e o estabelecimento de uma hierarquia pode levar a um aumento de excreção de *Salmonella* sp. por alguns répteis.

Gráfico 8 Distribuição do número de quelônios amostrados por dono



No entanto, basta que um coabitante excrete *Salmonella* sp., para que ocorra contaminação ambiental e para que os répteis que estejam em contacto direto apresentem maior probabilidade de se infectarem (Cain & Tyre, 2009). O mesmo acontece em situação de sobrepopulação pois o número de indivíduos presentes no mesmo espaço pode influenciar a taxa de excreção de *Salmonella* sp..

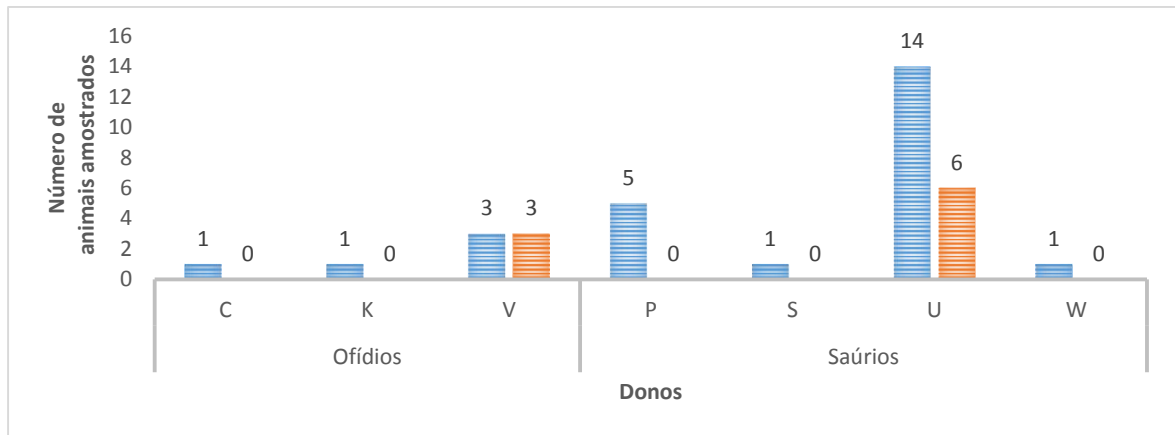
Neste estudo, a maioria dos donos (76%) não possuíam mais de 2 de répteis, alojados conjuntamente. No entanto, nalgumas situações o número de répteis existentes no mesmo espaço era considerável (Donos J, gráfico 8; Donos P e U, gráficos 8 e 9).

A desparasitação parece também ter influência na excreção de *Salmonella* sp. por répteis. Um estudo realizado em 2012 (Dipineto et. al., 2012) que relaciona a prevalência de isolamento de *Salmonella* sp. com a presença de oxiurídeos encontrou uma correlação positiva entre estes dois agentes.

Outro estudo realizado em Itália, em 53 tartarugas, demonstrou que existe uma correlação significativa entre estes dois agentes. Recomenda-se assim a desparasitação dos animais, uma vez que várias espécies de oxiurídeos colonizam normalmente as tartarugas, e embora raramente sejam considerados patológicos, infeções massivas podem promover a anorexia

em tartarugas no período pós-hibernante, influenciando a resposta imunitária do animal e consequentemente a sua capacidade para impedir o desenvolvimento de salmonelose.

Gráfico 9 Distribuição do número de saúrios e ofídios amostrados por dono



Relativamente às condições de colheita das amostras, estas foram colhidas em circunstâncias muito diferentes: durante consultas de rotina (ROTINA), durante consultas para tratamentos (CONSULTA), na sua própria habitação (ANIMAL DE COMPANHIA) ou ainda a partir de répteis de exposição permanente em Lojas de animais (LOJA DE ANIMAIS). Os dados relativos às condições de colheita para as amostras em que foi possível isolar *Salmonella* sp. estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6- - Percentagens relativas de isolamento distribuídas pelas condições de colheita

Condições de colheita	Isolamento
Loja de animais	15,79% (6/38)
Rotina	26,32% (10/38)
Consulta	2,63% (1/38)
Animal de companhia	55,26% (21/38)

Apesar de o número de animais amostrados nas diferentes condições não ser igual verificou-se uma tendência para uma maior taxa de isolamento nos animais classificados como ANIMAIS DE COMPANHIA. A explicação para esta tendência pode relacionar-se com as condições de stress e com a distribuição do número de répteis por dono já anteriormente referidas.

6.4. Teste de sensibilidade a antibióticos

Os antibióticos a utilizar no TSA foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: classe e mecanismos de atuação de cada um experiência dos colegas que exercem clínica

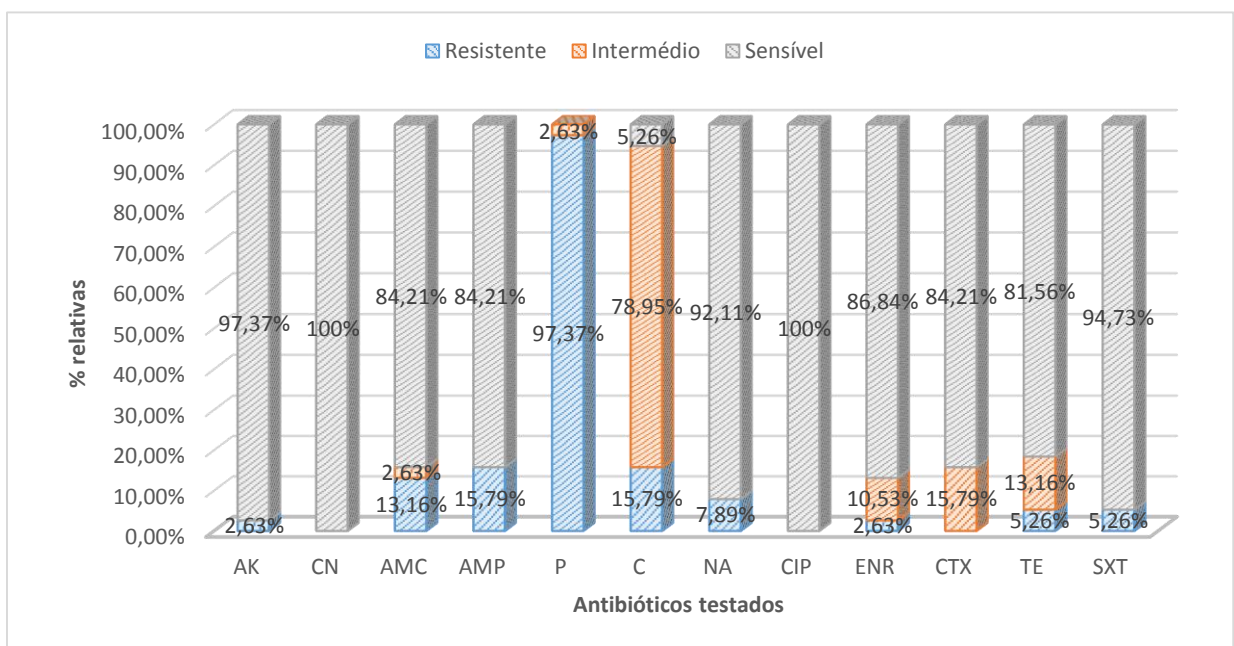
de animais exóticos, pesquisa bibliográfica e respeitando a disponibilidade comercial em Portugal.

Estão descritos como antibióticos de 1ª escolha mais utilizados em medicina humana para tratamento de enterite não complicada o cloranfenicol, neomicina, ampicilina, amoxicilina, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazole (Duijkeren & Houwers, 2000). É de realçar que embora a sua utilização tenha sido abrangente e a nível mundial, o cloranfenicol possui propriedades mielossupressoras e por esta razão foi retirada do mercado.

O uso de fluorquinolonas está descrito para os casos de Salmonelose não sistémica em Humanos, sendo também de referir que o uso de ciprofloxacina neste tipo de infeções reduz o tempo de duração da excreção (Duijkeren & Houwers, 2000). Em casos de Salmonelose transmitida por répteis foi já utilizado Ceftriaxona (Meervenne et. al., 2009)

Os isolados testados apresentavam 100% de sensibilidade à gentamicina e à ciprofloxacina, e percentagens elevadas de sensibilidade à amicacina (97,37%), sulfametoxazole+ trimetoprim (94,73%) e ácido nalidíxico (92,11), enrofloxacina (86,84%), amoxicilina+ ácido clavulânico (84,21%), ampicilina (84,21%) e cefotaxima (84,21%). Dos restantes antibióticos testados, penicilina G foi a que originou uma percentagem maior de resistência (97,37%), não havendo nenhum isolado que apresentasse sensibilidade a este antimicrobiano. Os isolados apresentavam ainda uma sensibilidade intermédia (78,95%) ao cloranfenicol, sendo que apenas 5,26% dos isolados testados são sensíveis a este composto antimicrobiano.

Gráfico 10 - Perfil de suscetibilidade dos isolados Salmonella sp. em estudo relativamente a 12 compostos antimicrobianos. (AK-Amicacina ;CN-Gentamicina;AMC-Amoxicilina+ ácido clavulânico;P-penicilina;C-Cloranfenicol; NA-Ácido nalidixico; CIP-Ciprofloxacina; ENR-Enrofloxacina; CTX-Cefotaxima;TE-Tetraciclina;SXT-Sulfametoxazole-trimetoprin)



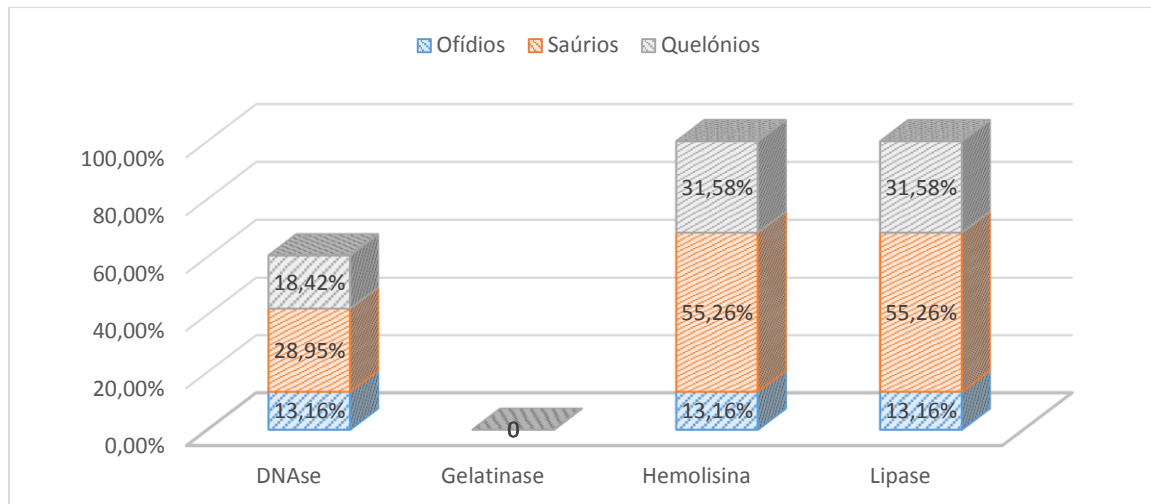
Quatro isolados apresentam resistência a dois compostos antimicrobianos e 6 isolados apresentam perfis de multirresistência, que se caracteriza pela resistência a três ou mais compostos antimicrobianos com modo de ação distinta.

6.5. Fatores de virulência

A capacidade de produção de fatores de virulência foi avaliada por método fenotípicos através de testes em placa e foi possível observar que 60% (23/38) dos isolados se apresentavam como produtores de DNase e que a totalidade dos isolados eram produtores de hemolisina e lipase (100%) (Gráfico 11).

Nenhum dos isolados apresentou capacidade de produzir a gelatinase.

Gráfico 11 Resultados obtidos em testes em placa referentes a avaliação dos fatores de virulência dos isolados obtidos



Os resultados obtidos indicam que todos os isolados obtidos possuem capacidade de causar lise e necrose celular de eritrócitos e outras células e capacidade de degradação de moléculas lipídicas. Em relação a DNase, a capacidade de produção desta enzima não ocorre em nenhum dos isolados. A ausência de produção de gelatinase sugere que os isolados obtidos não teriam capacidade de degradar gelatina, colagénio, entre outros.

6.6. Dendrograma

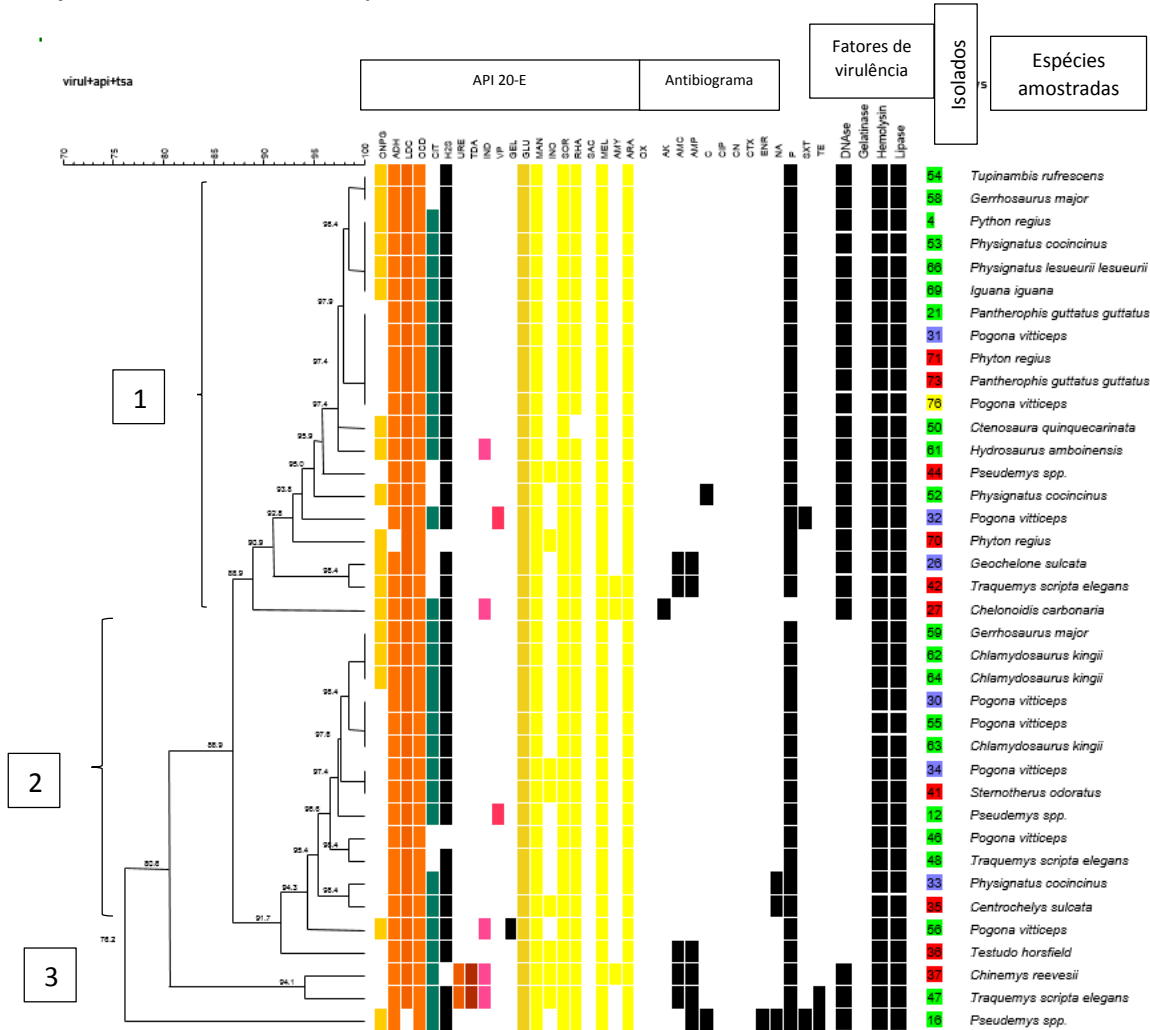
A partir dos dados obtidos a nível laboratorial e das informações resultantes do questionário realizado a cada proprietário foi possível criar uma base de dados em Excel que foi posteriormente importada para o programa BioNumerics com o objetivo de conjugar as diferentes variáveis (resultados API 20-E, TSA, fatores de virulência e dados do questionário)

e formar grupos em que as características fossem semelhantes dando origem assim a um dendrograma (Figura 11).

Pode-se observar a formação de 3 grupos principais sendo que no grupo mais pequeno (3) onde se encontram os animais amostrados cujo resultado do TSA permitiu classificá-los como multirresistente. O grupo 1 apresenta como principal característica todos os isolados serem produtores de DNases enquanto que no grupo 2 não possui nenhum animal cujo isolado obtido apresenta-se produção de DNases.

Não foi possível obter uma conclusão sobre as características gerais dos isolados uma vez que não parece haver associação óbvia entre a altura em que foi realizada a colheita (Animal de estimação, rotina, consulta ou loja de animais), a espécie e os resultados laboratoriais obtidos. Uma das razões para este facto pode estar relacionada com a falta de homogeneidade da amostra e com o pequeno número de isolados obtidos. Por estas razões os resultados obtidos não podem ser extrapolados para os répteis em geral.

Figura 11. Dendrograma obtido com auxílio do BioNumerics 6.6 (coluna isolados: AZUL- Animais de loja VERDE-Animal de companhia; VERMELHO- Rotina; AMARELO- Consulta



Embora não tenham sido avaliadas as condições de habitação de cada réptil amostrado durante as recolhas, foi possível observar que alguns dos donos não se encontram devidamente informados sobre as melhores práticas de manejo ou deficiências que podem ocorrer nos terrários ou aquários. A proximidade da habitação do réptil de cozinhas ou a sua localização em quartos de crianças podem ter importância na transmissão de salmonelose por répteis. Por estas razões, foi elaborado um documento com as informações básicas que pudessem contribuir para minimizar as deficiências existentes (em ANEXO III).

6.7. Isolamento de *Salmonella* sp. a partir de alimento vivo- Baratas

Uma vez que o alimento que é fornecido aos animais ou o substrato usado nos terrários e aquários podem constituir veículos potenciais de transmissão de *Salmonella*, procedeu-se à pesquisa deste microorganismo em amostras de alimento vivo (barata), substrato ambiental e substrato não utilizado, recolhido apenas num proprietário onde a percentagem de isolamento a partir de répteis foi elevada (80%). Esta recolha permitiu garantir assim que não existiam variações nas condições ambientais e desparasitação, de modo a se poderem tirar conclusões acerca de vias potenciais de contaminação.

Não foi possível isolar *Salmonella* sp. a partir de nenhuma destas 3 amostras analisadas, não se podendo assim confirmar que o alimento ou substrato fornecidos aos répteis insetívoros fossem as fontes de contaminação dos animais.

Embora geralmente os microorganismos que afetam os animais reflitam a sua dieta e habitat, os estudos disponíveis referentes a répteis referem apenas a alimentação com roedores. Nestes casos, os répteis que se alimentam de ratos apresentam um risco estatisticamente significativo de excreção de *Salmonella* sp. (Pfleger et. al., 2003).

7. Conclusão

A informação disponível sobre a caracterização de *Salmonella* sp. em répteis é relativamente escassa, principalmente a nível europeu, embora os primeiros relatos remontem a 1939. A grande diversidade de répteis existente e a possibilidade de existência de relações comensais a nível da microbiota intestinal destes animais podem ser algumas das razões que contribuíram para que até há pouco tempo este tema não tenha sido muito investigado. Apesar desta dificuldade, o tema tem tido mais destaque por parte da comunidade científica nos últimos anos.

Este trabalho visou pesquisar a presença de *Salmonella* sp. em répteis mantidos como animais de estimação na área da grande Lisboa e Margem Sul do Tejo e avaliar o perfil de antibiorresistência nas bactérias isoladas.

Este resultado não é surpreendente, uma vez que o aparecimento de resistência antimicrobiana encontra-se geralmente associado à administração abusiva e por vezes incorrecta de antibióticos.

No entanto, os níveis de antibiorresistência em isolados provenientes de répteis podem vir a aumentar num futuro próximo, caso não sejam tomadas medidas que visem a prevenção para a transmissão e a correta implementação de terapêutica antimicrobiana. Verificou-se uma percentagem alta de sensibilidade antimicrobiana (superior a 80%) nos isolados testados, em relação à gentamicina, ciprofloxacina, amicacina, sulfametoxazole+ trimetoprim, ácido nalidíxico, enrofloxacina, amoxicilina+ ácido clavulânico, ampicilina e cefotaxima, pelo que estes poderiam ser considerados opções terapêuticas no caso se verificar a existência de salmonelose. Em relação a Penicilina G esta apresentou uma elevada percentagem de resistência aos isolados testados. À semelhança da Penicilina G, o Cloranfenicol não seria uma opção terapêutica a considerar, não só pelos resultados obtidos, mas também pelos efeitos secundários que advêm do seu uso.

A produção de hemolisina por todos os isolados demonstra uma grande capacidade de provocar lise celular. A produção de lípase demonstra que, todos os isolados, teriam capacidade de degradar a camada fosfolipídica da membrana celular. A produção de DNase por 60% dos isolados indica a capacidade de destruição das ligações fosfodiéster das cadeias de DNA. A existência da produção destas enzimas e toxina contribui para o sucesso da invasão e colonização bacteriana.

Existem alguns dados que referem que o número de répteis cativos tem aumentado nos últimos anos, embora não existam dados estatísticos concretos que nos permitam determinar qual é o número de répteis existentes como animal de estimação e a verdadeira dimensão do risco de transmissão para os humanos. A legislação existente em Portugal em relação à

aquisição de um réptil apenas se refere a estatuto de proteção da espécie e não aos riscos existentes para a saúde pública. O desconhecimento por parte da maioria da população sobre os riscos envolvidos na aquisição de um réptil pode contribuir, a longo prazo, para o aumento de casos de salmonelose transmitida por répteis. Em Portugal é muito fácil adquirir um animal exótico, no entanto esta facilidade de aquisição geralmente não vem acompanhada de informação básica sobre manuseio ou estratégias de prevenção necessárias para a não transmissão de Salmonelose e outras zoonoses.

Infelizmente, os dados obtidos nesta dissertação não podem ser extrapolados para a população de répteis existente nem podemos afirmar qual a dimensão do risco existente para a população em geral. A obtenção de uma maior amostragem e mais homogénea conjuntamente com a aplicação de outras técnicas, como o PCR, poderiam contribuir para uma caracterização mais abrangente deste microrganismo.

É necessária a continuação do trabalho desenvolvido no sentido de se obter uma caracterização mais completa deste microrganismo em répteis. A elaboração desta dissertação contribuiu para o despertar de um grande interesse sobre o tema em questão, em parte pela existência de questões em aberto ainda nos dias de hoje. Seria de todo vantajoso e estimulante a continuação do trabalho já iniciado existindo o interesse da construção de uma carreira nas áreas abrangentes por este tema.

A transmissão de *Salmonella* sp. por répteis é um fenómeno provável que não deve ser subestimado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Annous, B., Gurtler, J. (2012). *Salmonella- Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*. Croacia: Intech
- Asten A., Dijk, J. (2005). *Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp.. FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44, 251-259
- Berthand, S., Rimhanen-Finne, R., Weill, F., Rabsch, W., Thornton, L., Perevoscikovs, J., Pelt, W., Heck, M. (2008). *Salmonella infectious associated with reptiles: the current situation in Europe*. *Eurosurveillance*, vol.13; 4-6
- Cain, C., Tyre, D. (2009). *Incidence of Salmonella on Reptiles in the Pet Trade*. *Rurals: Review of Undergraduate in Agricultural and life Sciences*, vol.4 (1)
- Calderón, L., Delgado, P., Urbano, M., Coy, F. (2012). *Resistance of Salmonella to conventional antimicrobials for their treatment*. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Vol 7, n1
- Casela, H. (2013). *Contribuição para o estudo da utilização terapêutica da antibióticos na clínica de animais de companhia*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária
- Catálogo de Prácticas de laboratorio para la docencia en Microbiología (2008). Acedido em: 25 de Novembro de 2015. URL: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practic-as-de-microbiologia/indice/identificacion-bacteriana/capacidad-hemolitica>
- Centers for Epidemiology and Animal Health (2001). *A Reptile and Amphibian Communities in the United States*, South Howes, USA
- Chambers, D., Hulse, A. (2006). *Salmonella serovars in the herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania*, *Applied and Environmental microbiology*, p. 3771-3773
- Cooper, E., Klumpam, A., Zapata, A. (1985). *Biology of Reptilia*, vol.14, Morphology academic Press, Nova Iorque
- Corrente, M., Madio, A., Friedrich, K., Greco, G., Desario, C., Taglibue, S., D'Incau, M., Campolo, M., Buonavoglia, C. (2004). *Isolation of Salmonella strains from reptile faeces and comparison of different culture media*. *The society for applied microbiology*, 96, 709-715
- Dipineto, L., Capasso, M., Maurelli, M., Russo, T., Pepe, P., Capone, G., Fioretti, A., Cringoli, G., Rinaldi, L. (2012). *Survey of co-infection by Salmonella and Oxyurids in tortoises*. *BMC Veterinary Research*, 8:69

- Duijkeren, E., Houwers, D. (2000). *A critical assessment of antimicrobial treatment in uncomplicated Salmonella enteritidis*. *Veterinary microbiology*, 73, 61-73
- El Ridi, R., Badir, N., El Rouby, S. (1981). *Effect of seasonal variations on the immune system of the snake, Psammophis schokari*. *JExp Zool* 216:357–365.
- Encarnação, C. (2013). *Comparação de perfis de virulência de isolados de Escherichia coli de cadela associados a piómetra, cistite e de origem fecal*. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa
- Erhardt, M., Dersh, P. (2015). *Regulatory principles governing Salmonella and Yersinia virulence*. *Frontiers in Microbiology*. Volume 6, Artigo 949
- European Food Safety Authority – EFSA. Committed to ensuring that Europe's food is safe
Acedido em: 12 de Novembro de 2015.
URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/factsheetsalmonella>
- Evans, EE, Cowles, RB. (1959). *Effect of temperature on antibody synthesis in the reptile Disposaurus dorsalis*. *Proc Soc Exp BiolMed* 101:482–483.
- Fornazi, F., Teixeira, C. (2009). *Salmonelose em répteis: aspectos epidemiológicos, clínicos e zoonóticos*. *Veterinária e Zootecnia*. V. 16, n.1, mar., p.19-25
- Friedman, C., Torigian, C., Shillam, P., Hoffman, R., Heltzel, D., Beebe, J., Malcolm, G., DeWitt, W., Hutwagner, L., Griffin, P. (1997). *An outbreak of salmonellosis among children attending a reptile exhibit at a zoo*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta
- Gal-Mor, O., Boyle, E., Grassl, A. (2014). *Same species, different diseases: how and why typhoidal and non typhoidal Salmonella entericaserovars differ*. *Frontiers in microbiology*, Vol.5, 391
- Geue, L., Loschner, U. (2002). *Salmonella enterica in reptiles of German and Austrian origin*, *Veterinary microbiology*
- Green, J. (2005). *Detailed Discussion of Trade in Wild-Caught Reptiles*. *Animal Legal & Historical Center*, Animal Legal & Historical Center, United States
- Jaffredo, T., Fellah, J., Dunon, D. (2005). *Immunology of Birds and Reptiles*. *Encyclopedia of life sciences*
- Hareramadas, B., Rai, U. (2001). *Thymic structural changes in relation to seasonal cycle and testosterone administration in Wall lizard Hemidactylus flaviviridis (Ruppell)*. *Indian J. Exp. Biol*, 39:629-635

- Hareramadas, B., Renbhotkar, G., Rai, U. (2004). *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in Wall lizard Hemidactylus flaviviridis*. Gen Comp Endocrinol, 135:293-299
- Harris, J., Neil, K., Behraves, C., Sotir, M., Angulo, F. (2010). *Recent Multistate outbreaks of Human Salmonella infections acquired from turtles: a continuing public health challenge*. Food Safety, 50:554-9
- Hendriksen, R.S. (2003). Laboratory protocols- level 1 *Training Course Isolation of Salmonella. Global Salm- Surv*, 4th Ed.
- Instituto da Conservação da Natureza (2008). *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal*. Assírio & Alvim
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.(IPMA, I.P.) acessado em: 29 de Novembro de 2015. URL: <https://www.ipma.pt/pt/index.html>
- Jacobson, E.(2007) *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles- Color Atlas and Text*. Boca Raton:Taylor& Francis Group
- Maciel, B., Argôlo Filho, R., Nogueira, S., Dias, J., Rezende, J. (2009). *High Prevalence of Salmonella in Tegu Lizards (Tupinambis merianae), and Susceptibility of Serotypes to Antibiotics*. Zoonoses Public Health, 57, e26- e 32
- Mermin, J., Hoar, B., Angulo, F. (1997). *Iguanas and Salmonella Marina infection in Children: A reflection of the Increasing Incidence of Reptile-associated Salmonellosis in United States*. American Academy of Pediatrics
- Mader (2006), *Reptile Medicine and Surgery- 2ªed*, Elsevier, Missouri
- Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., Koehler, J., Marcus, R., Angulo, F. (2004). *Reptiles, Amphibians, and Human Salmonella Infection: A population- Based, Case- control Study*. Clinical Infectious Disease. 38 (Suppl 3): S253-61
- Meervenne, E., Botteldoorn, N., Lokietek, S., Vattlet, M., Cupa, A., Naranjo, M., Dierick, K., Bertrand, S. (2009), *Turtle-associated Salmonella septicaemia and meningitis in 2-month-old baby*, Journal of Medical Microbiology, 58, 1379- 1381
- Mitchell, M., Shane, S. (2001). *Salmonella in Reptiles*. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Vol. 10, nº 1, pag 25-35
- Mondal S., Rai U. (1999). *Sexual dimorphism in phagocytic activity of wall lizard's splenic macrophages and its control by sex steroids*. Gen Comp Endocrinol 116:291–298.

- Mondal S., Rai U. (2002b). *Dose and time-related in vitro effects of glucocorticoid on phagocytosis and nitrite release by splenic macrophages of wall lizard Hemidactylus flaviviridis*. *CompBiochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132:461–470.
- National Association of State Public Health Veterinarians Animal Contact Compedium Committee (2013). *Compedium of Measures to Prevent Disease Associated with animals in Public Settings, 2013*. *Vet Med Today*, Vol.243, No.9
- Oliveira, A., Sola, M., Fiestel, J., Moreira, N., Oliveira, J. (2013). *Salmonella enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade*. Goiânia, Enciclopédia Biofísica
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., Pantchev, N. (2007). *Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian*. *The Veterinary Journal* 175, 53-68
- Pasmans. F., Haesebrouck, F., (2004). *Salmonella* in reptiles, in *Proceedings of the 7th International symposium on the Pathology and Medicine of Reptiles and Amphibians*, Berlin, Germany.
- Papich, M. (2010). *Saunders Handbook of Veterinary Drugs - Small and large animal-3ª Edição*, Carolina do Norte, Elsevier
- Pees, M., Rabsch, W., Plenz, B., Fruth, A., Prager, R., Simon, S., Schmidt, V., Munch, S., Braun, P. (2010). *Evidence for the transmission of Salmonella from reptiles to children in Germany, July 2010 to October 2011*. *Euro surveill*; 18(46)
- Pfleger, S., Benyr, G., Sommer, R., Hassl, A. (2003). *Pattern of Salmonella excretion in amphibians and reptiles in vivarium*. *Int. J. Hyg. Environ. Helath* 2006, 53-59
- Quinn, P., Carter, M., Markey, B., Carter, G. (1999). *Veterinary clinical microbiology*. London, Elsevier
- Quinn, P., Markey, B., Carter, M., Donnelly, W., Leonard, F. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Iowa State University Press, Iowa.
- Robison, J., John, F., Griffiths, R., Roberts, D. (2015). *Captive Reptile Mortality Rates in the Home and Implications for the Wildlife Trade*. *PLOS ONE* 10(11).
- Roy, B., Rai. U. (2004). *Dual mode of catecholamine action on splenic macrophage phagocytosis in wall lizard, Hemidactylus flaviviridis*. *Gen Comp Endocrinol* 136:180–191.
- Sandmeier, F., Tracy, C., DuPré, S., Hunter, K. (2012). *A trade-off between natural and acquired antibody production in a reptile: implications for long-term resistance to disease*. *Biol Open*, 1(11): 1078–1082.

- Seixas, R., Machado, J., Bernardo, F., Vilela, C., Oliveira, M. (2014) *Biofilm formation by Salmonella enterica serovar 1,4, [5], 12:i:- Portuguese isolates: A phenotypic, Genotypic and Socio-geographic Analysis*. Curr Microbiolol 68:670-677
- Seixas, R. (2011). *Phenotypic and genotypic characterization of virulence traits of Staphylococci from animal origin*. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Sousa, I.(2007). *Interacção da Enrofloxacina com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas*. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- The center for food security & public health (2013). *Reptile, associated Salmonellosis*. Acedido em 3 de Novembro de 2015 em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/reptile_associated_salmonellosis.pdf
- Veigas, S. (2009). *Alterações do estado de saúde associados a alimentação: Contaminação microbiológica dos alimentos*. Ministério da Saúde: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
- Warwick, C., Lambiris,A., Westwood, D., Steedman, C. (2001). *Reptile- related salmonellosis*. Journal of the Royal Society of Medicine
- Winkstrom,V., Fernstrom, L., Melin, L., Boqvist, S. (2014). *Salmonella isolated from individual reptiles and environmental samples from terraria in private households in Sweden*. Biomed Central, 56:7
- World Health Organization (2007). *Critical Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial Resistance due to Non-Human Antimicrobial Use*. Copenhaga: Department of food safety, Zoonoses and Foodborne Diseases.
- Yang, S., Park, K., Seo, K., Besser, T., Yoo, H., Noh, K., Kim, S., Lee, B., Kook, Y., Park, Y. (2001). *Multidrug-resistant Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis identified by multiplex PCR from animals*, J vet sci, 2(3): 181-8
- Zagyansky, YA.(1973). *Phylogenesis of the general structure of immunoglobulins rigidity of 7S and restricted flexibility of 17S immunoglobulins of the tortoise, Testudo horsfieldii*. FedEurop Biochem Soc Let 35:309–312.

ANEXOS

ANEXO I

QUESTIONÁRIO:

Isolamento de Salmonella spp. em Répteis

RESUMO DO PROJETO

ESPÉCIE

NOME CIENTÍFICO

IDADE

APRESENTOU SINAIS DE DOENÇA RECENTEMENTE?

Não Sim Quais os sintomas? _____

REALIZOU ANTIBIOTERAPIA RECENTEMENTE ?

Não Sim Qual? _____

QUAL O NÚMERO DE PESSOAS QUE CONTACTA DIARIAMENTE COM O RÉPTIL (MANUSEAMENTO, ALIMENTAÇÃO OU OUTRAS ACTIVIDADES)?

1 pessoa 2 pessoas 3 pessoas 4 pessoas 5 pessoas Mais que 5 pessoas

FOI RECENTEMENTE ADQUIRIDO (ÚLTIMOS 3 MESES)?

Não Sim

CASO NÃO TENHA SIDO ADQUIRIDO RECENTEMENTE, GERALMENTE HIBERNA?

Não Sim

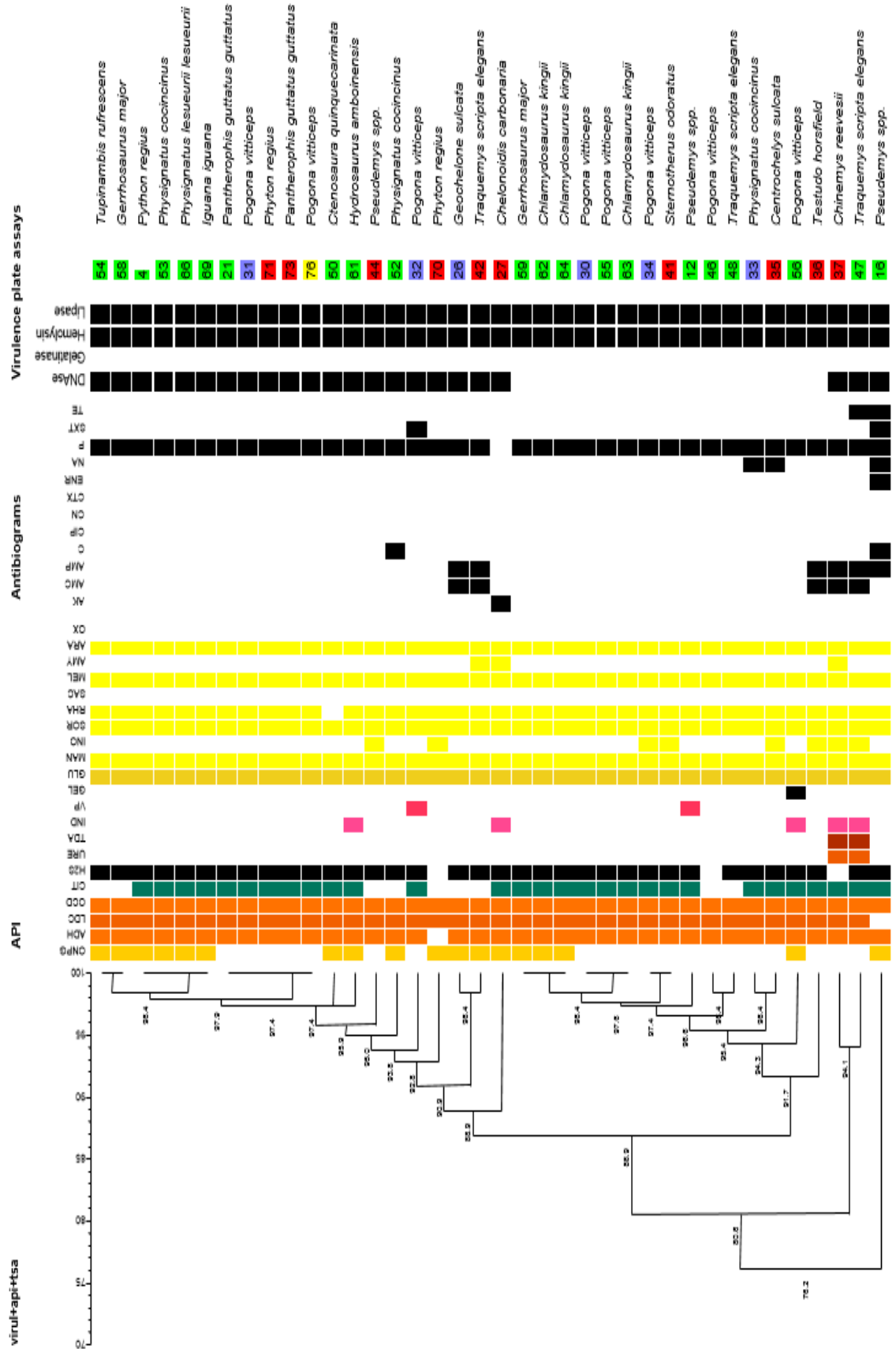
ALGUMA VEZ O SEU RÉPTIL FOI DESPARASITADO?

Não Sim Se respondeu sim, quando foi a última vez? _____

QUE TIPO DE ALIMENTOS FORNECE COM MAIS FREQUÊNCIA AO SEU RÉPTIL?

FIM DE QUESTIONÁRIO

ANEXO II
Dendrograma



ANEXO III

Artigo referente a publicação na Magazine da Sociedade Portuguesa de Microbiologia

Magazine da SPM 2015 (4) 17.07



Salmonella em Répteis: Um problema real para a saúde pública?

Ana Carvalho, Ana Reisinho, Manuela Oliveira

Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa

*correspondência: accarvalho@fmv.ulisboa.pt

O género *Salmonella* inclui bactérias patogénicas mundialmente conhecidas por causarem doença gastrointestinal nos humanos, bem como noutros animais, incluindo mamíferos, aves e répteis. Os sinais de salmonelose são muito variados. Os animais podem não apresentar qualquer sinal clínico visível, desenvolver doença gastrointestinal ou infeção generalizada que pode atingir vários órgãos, levando à morte. Existem casos descritos, desde o século XX, de transmissão de *Salmonella* por répteis incluindo tartarugas, lagartos e serpentes. Embora a opinião pública associe estes animais a esta bactéria, qual a sua verdadeira importância? Uma vez que a aquisição de répteis como animais de companhia aumentou nos últimos anos, é importante avaliar o risco para a saúde pública através da transmissão de salmonela aos humanos, e conhecer os grupos de risco e as estratégias de prevenção.

O que é a Salmonelose?

A Salmonelose é uma doença infeto-contagiosa gastrointestinal, causada por bactérias pertencentes ao género *Salmonella*, família *Enterobacteriaceae*, que apresentam distribuição mundial. *Salmonella* afeta tanto humanos como animais domésticos e silvestres (Fomazari e Teixeira, 2009; Seixas et al., 2014), apresentando carácter zoonótico, o que significa que pode ser transmitida dos animais para os humanos (Oliveira et al., 2010 e 2012; Gal-Mor et al., 2014; Seixas et al., 2014).

Entre as espécies pertencentes a este género, *Salmonella enterica* destaca-se pela sua importância na medicina humana e veterinária (Quinn et al., 2011). Esta espécie inclui várias subespécies relevantes, como *S. enterica* spp. *enterica*, isolada principalmente de humanos e animais de sangue quente. Existem outras subespécies de grande importância também isoladas do ambiente e de animais poiquilotérmicos que não têm mecanismos internos de regulação da temperatura do corpo. Estas subespécies incluem *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S.*

enterica subsp. *indica*, sendo as duas primeiras frequentemente isoladas a partir de répteis (Souza et al., 2014).

Importância dos répteis como portadores sintomáticos e assintomáticos

Os répteis são um importante reservatório de *Salmonella*. Tal como os outros membros da família *Enterobacteriaceae*, esta bactéria faz parte do ambiente intestinal da maioria dos répteis, apresentando uma alta prevalência de isolamento que pode atingir os 90% (Fomazari e Teixeira, 2009).

A principal via de transmissão de *Salmonella* entre animais e os humanos é a via fecal-oral (Meervenue et al., 2009). No entanto, existem outras vias de transmissão a ter em conta, tais como o contacto com superfícies ou objetos contaminados por fezes ou através de mordedura que pode ocorrer durante a manipulação destes animais (Kelsey et al., 1997) (Figura 1).

Nos casos das tartarugas (Abalém de Sá e Solari, 2001) e serpentes (Benis et al., 2006) a transmissão pode ser vertical, ocorrendo da progenitora para a descendência durante a formação do ovo, ou durante a postura dos ovos em solo contaminado.



www.spmicrobiologia.pt



Fig. 1. Uma correcta manipulação tem como objectivo a segurança tanto do réptil como do manipulador e visa indução do menor stress possível ao animal. A contenção da cabeça da Iguana Verde (*Iguana iguana*), como mostra a figura, tenta evitar a mordedura por parte do animal.



Fig. 2. O ambiente de um réptil em cativeiro deve ser semelhante ao ambiente selvagem, nomeadamente na presença de esconderijos, locais para trepar e temperatura e humidade comparáveis às encontradas no ambiente natural. No terrário deste dragão barbudo (*Pogona vitticeps*) são recriadas estas condições.

Embora a grande maioria dos répteis esteja colonizado por *Salmonella*, a excreção deste agente para o ambiente através das fezes pode ocorrer de forma intermitente, e não contínua, ao longo do tempo, o que torna difícil a sua deteção.

A colonização dos animais pode ser assintomática, isto é, sem sintomas. O desenvolvimento de doença depende de vários fatores, incluindo a higiene dos recintos e a idade do animal. Os animais mais idosos tendem a ser mais resistentes à infecção sendo geralmente portadores assintomáticos (Figura 2).

O sistema imunitário do animal também tem um papel importante no desenvolvimento de salmonelose, pois funciona como uma barreira ao desenvolvimento de doença, sendo condicionado por vários fatores tais como a dieta alimentar, densidade populacional, ocorrência de condições de stress, temperatura e humidade ambiente inapropriadas, outras doenças concomitantes ou administração de medicamentos imunodepressores (NASPHV, 2013) (Figura 3).

Quando a barreira imunitária do réptil é quebrada, as bactérias podem transpor a

parede do intestino e disseminarem-se por via sanguínea, atingindo vários órgãos e conduzindo a uma infecção generalizada que pode levar à morte do animal, designada por septicémia.

Geralmente a disseminação de salmonela no organismo leva ao aparecimento de sintomas nos animais, que são neste caso denominados por portadores sintomáticos. Estes sintomas podem incluir diarreia, perda de apetite, perda de peso e letargia, embora alguns animais possam apresentar apenas lesões na pele com vesículas crostosas e exsudativas. Os animais com sintomas de infecção devem ser isolados e o seu dono ou tratador deve procurar assistência veterinária.

Fatores de risco de transmissão para os humanos

Os principais grupos humanos de risco, ou seja, os indivíduos mais suscetíveis de desenvolver doença, são as crianças até aos 5 anos de idade, idosos, indivíduos imunocomprometidos e grávidas (Meervenne et al., 2009).





Fig. 3. A alimentação deve ser fornecida frequentemente e adaptada à idade e necessidades nutricionais de cada espécie, como ocorre nestas duas tartarugas russas (*Testudo horsfieldii*). Após a alimentação as taças que foram usadas para este efeito devem ser lavadas. O alimento que não foi consumido deve ser removido.

Embora se encontrem descritos casos de transmissão de *Salmonella* de répteis para humanos, esta via de transmissão não parecia ser inicialmente muito relevante, tal como demonstrado por um estudo realizado entre 2000 e 2007 em Inglaterra, onde menos de 1% dos isolados de *Salmonella* spp. foram transmitidos aos humanos através de répteis (Alken et al., 2010). No entanto, este panorama mudou nos últimos anos, durante os quais se observou um aumento da popularidade dos répteis como animais de companhia e, conseqüentemente, um aumento do número de casos de salmonelose transmitida por estes animais. De acordo com um estudo recente, realizado também em Inglaterra, cerca de 25% das crianças com salmonelose com idade inferior a 5 anos contactou com répteis antes do aparecimento dos sintomas (Mayor, 2014). Uma parte significativa da percentagem referida abrange crianças com idade até 1 ano, provavelmente por levarem com muita frequência objetos e as mãos à boca.

Dentro da grande variedade de répteis existentes, as tartarugas são provavelmente

os animais mais populares, por serem na sua maioria de comportamento dócil, de locomoção lenta e fácil manipulação. Esta elevada popularidade faz com que estes animais se encontrem frequentemente associados a casos de transmissão de *Salmonella* para humanos (CDC, 2014).

É importante referir que os casos de salmonelose em humanos transmitida por répteis apresentam geralmente um período de recuperação até 5 vezes mais longo comparado com salmoneloses de origem alimentar, observando-se uma maior necessidade de hospitalização nestes casos. Isto deve-se ao facto de estes indivíduos poderem desenvolver uma forma mais invasiva da doença, que se pode traduzir por bacteriemia, meningite e colite, quando comparados com outros doentes com salmonelose não transmitida por répteis (Mayor, 2014). A maior virulência destas salmonelas deve-se a diferenças nas estruturas da superfície bacteriana e na capacidade de invasão celular (Fierer e Guiney, 2001).

Como evitar a transmissão: medidas preventivas

Um animal portador assintomático não deve ser sujeito a tratamento com antibióticos com o objetivo de eliminar o agente. De facto, a administração indevida e abusiva de antibióticos pode promover a alteração da população bacteriana natural do intestino do animal afetando assim o seu equilíbrio e aumentar o tempo de excreção do agente (Meerverne et al., 2009). A administração de antibióticos a animais clinicamente saudáveis pode ainda promover a seleção das bactérias resistentes, prejudicando o sucesso do tratamento da salmonelose humana, caso ocorra transmissão.

Para prevenir a transmissão de *Salmonella* dos répteis para os humanos foi proposta a



Magazine da SPM 2015 (4) 17.07

criação de animais sem o agente, que contudo se revelou não oferecer resultados satisfatórios (Warwick et al., 2001). Assim, o primeiro passo para diminuir a probabilidade da ocorrência de salmonelose transmitida por répteis consiste em implementar medidas que diminuam a probabilidade de multiplicação bacteriana no réptil. Devem ser adotadas medidas de higiene, aplicadas tanto ao espaço que o réptil habita como aos seus manipuladores. É recomendada a limpeza periódica do terrário ou aquário com lixívia diluída e a eliminação dos dejetos e limpeza do substrato (Mcarthur et al., 2004). No caso de répteis aquáticos, a colocação de uma bomba de filtragem concebida para aquários de répteis e mais potente do que as bombas de aquarofilia, pode ajudar a manter a qualidade da água e contribuir para o bem-estar do réptil e diminuir a manifestação de doença. Recomenda-se também a disponibilização de um recipiente separado com água, onde o réptil possa ser alimentado uma vez por dia, de modo a evitar a presença de alimento não consumido na água, contribuindo para uma menor degradação da qualidade da água. Durante a limpeza deverão sempre ser utilizadas luvas, e a lavagem do terrário ou aquário não deve ser efetuada na cozinha ou casa de banho, sendo aconselhado realizá-la no exterior da habitação (Figura 4).

Por outro lado, os animais que coabitem com animais infetados mas que não apresentem sintomas, podem ser portadores assintomáticos e continuar a excretar a bactéria. Estes animais são responsáveis pela contaminação do ambiente, de outros animais que partilhem o mesmo terrário, ou até dos seus proprietários, constituindo veículos muito importantes para a disseminação da doença.

Para prevenir a transmissão zoonótica de *Salmonella*, os manipuladores deverão proceder à lavagem das mãos com sabão neutro após manipulação do réptil, adotar

uma estratégia de contenção apropriada e evitar condições que perturbem o animal aquando da manipulação, de modo a diminuir a probabilidade de mordedura ou da ocorrência de ferimentos (CDC, 2014).



Fig. 4. A limpeza e manutenção do ambiente de cada réptil deve ser periódica e o manipulador deve ter em conta medidas preventivas importantes, tais como, a realização da limpeza em locais apropriados para este efeito e o uso de luvas

Conclusões

Embora os répteis sejam frequentemente portadores de *Salmonella* e a possibilidade de transmissão desta bactéria para os humanos seja uma realidade, este é um problema que pode ser gerido e controlado. Assim, recomenda-se que antes da adoção de um réptil como animal de companhia, os futuros proprietários se informem relativamente às condições ideais de alojamento, métodos de manipulação e higienização ambiental e necessidades básicas do animal, não só para evitar a contaminação dos animais com *Salmonella* e desenvolvimento de doença, mas também para prevenir a transmissão desta bactéria aos manipuladores e ao ambiente. Esta informação pode ser obtida nas lojas de animais ou junto dos médicos veterinários.



Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio dos Professores Luís Tavares e António Ferreira

da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Temos ainda a agradecer a Dona Sofia de Sousa que nos permitiu o acesso à sua colecção de répteis.

Referências

- Abalém de Sá, I., Solari, A. 2001. *Salmonella* in brazilian and imported pet reptiles. *Braz J Microbiol* 32: 293 -297.
- Alken, A. M., Lane, C., Adak, G. K. 2010. Risk of *Salmonella* infection with exposure to reptiles in England, 2004-2007. *Euro Surv* 15(22):pii=19581.
- Benis, D., Grupka, L., Liamthong, S., Folland, D., Sykes, J. 2006. Clonal relatedness of *Salmonella* isolates associated with invasive infections in captive and wild-caught rattlesnakes. *Vet Microbiol* 120:300-307.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2014. *Salmonella* Homepage: 2014 Outbreaks. URL: <http://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2014.html>. Acedido a 20 de Maio de 2015.
- Fierer, J., Guiney, D. G. 2001. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 107(7): 775-780.
- Fornazari, F., Teixeira, C. 2009. Salmonelose em répteis: aspectos epidemiológicos, clínicos e zoonóticos. *Veterinária e Zootécnia* 11: 19-25.
- Gal-Mor, O., Boyle, E., Grassl, A. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol* 5: 391.
- Kelsey, J., Ehrlich, M., Hendersons, S. 1997. Exotic Reptile Bites - Review. *Am J Emerg Med* 15: 538-537
- Mayor, S. 2014. Over a quarter of *Salmonella* cases in English children are caused by pet reptiles, study finds. *BMJ* 349: g7798.
- McArthur, S., Wilkinson, R., Meyer, J. 2004. *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Ames, Iowa, Blackwell Publishing Ltd.
- Meervenne, E., Botteldoorn, N., Lokietek, S., Vatlet, M., Cupa, A., Naranjo, M., Dierick, K., Bertrand, S. 2009. Turtle-associated *Salmonella* septicaemia and meningitis in 2-month-old baby. *J Med Microbiol* 58: 1379- 1381.
- NASPHV (National Association of State Public Health Veterinarians). 2013. Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public settings. *Vet Med Today* 243: 9.
- Oliveira M., Pedroso N. M., Sales-Luís T., Santos-Reis M., Tavares L., Vilela C. L. 2010. Antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from Eurasian Otters (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Portugal. *J Wildl Dis* 46: 1257-1261.
- Oliveira M., Vieira-Pinto M., Martins da Costa P., Vilela C. L., Martins C., Bernardo F. 2012. Occurrence of *Salmonella* spp. in samples from pigs slaughtered for consumption: A comparison between ISO 6579:2002 and 23S rRNA Fluorescent *In Situ* Hybridization method. *Food Res Int* 45: 984-988.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C. 2011. *Microbiology and Microbial Disease* (2 ed.). United States: Willey- Blackwell.
- Seixas, R., Machado, J., Bernardo, F., Vilela, C. L., Oliveira, M. 2014. Biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- portuguese isolates: a phenotypic, genotypic and socio-geographic analysis. *Curr Microbiol* 68: 670-677.
- Souza, S., Casagrande, R. A., Guerra, P. R., Cruz, C., Veit, E., Cardoso, M., Driemeier, D. 2014. Osteomyelitis caused by *Salmonella enterica* serovar Derby in *Boa constrictor*. *J Zoo Wildl Med* 45(3): 642-644.
- Warwick, C., Lambiris, A., Westwood, D., Steedman, C. 2001. Reptile related Salmonellosis. *J R Soc Med* 94: 124-126.



ANEXO IV

Folhetos informativos para donos (Lagartos, Cobras e serpentes, Tartarugas terrestres e Tartarugas aquáticas e semi-aquáticas).

Substratos

Podem ser utilizados diversos substratos. A utilização de substratos muito húmidos, secos, ácidos, básicos ou com muitos detritos podem dar origem a problemas dermatológicos ou respiratórios. O substrato ideal é aquele sendo barato é também agradável esteticamente, fácil de limpar, absorvente e digerível caso seja ingerido, como por exemplo, tapetes, lascas de madeira de cipreste ou faia e papel desfiado (este não aconselhado para cobras pequenas)

Iluminação e termorregulação

A iluminação natural (preferível e direta) ou artificial é imprescindível para a manutenção do metabolismo do cálcio (UVB) e síntese de vitamina D (UVA). Nunca deixar o réptil numa caixa de vidro ao sol, o sobreaquecimento é rápido e pode levar à morte do mesmo.

Quando o réptil estiver no exterior, proteger com uma rede, de eventuais predadores (roedores e aves).

O tempo de exposição solar depende do tipo de réptil e da estação do ano, nos répteis tropicais 11h de Inverno e 13h de Verão, nos restantes répteis, 9h de Inverno, 12 de Primavera/Outono e 15h de Verão.

Como fonte de calor, pode usar-se tapetes ou lâmpadas de aquecimento, estas últimas com proteção de rede e a distância adequada são mais benéficas, porque evitam a desidratação e queimaduras térmicas. Nunca deixar as lâmpadas ligadas durante 24 horas.

Limpeza e desinfeção

Retire o réptil e coloque numa caixa de transporte. Evitar limpar na cozinha ou casa de banho, se possível faça no exterior. Remover toda a matéria orgânica para que o desinfetante tenha uma ação efetiva. Lavar todas as superfícies, recipientes da comida e água também, com uma solução de hipoclorito de sódio diluída (Lixívia) na proporção de 30 ml/litro de água, deixando atuar 10 minutos. Lavar novamente com água limpa e enxaguar com papel limpo e descartável.

Lavar sempre as mãos, com sabão neutro, após a limpeza do terrário ou contacto direto com o réptil, tigelas ou outras superfícies que tenham estado em contacto com o réptil.



Osmorregulação

Espécies florestais necessitam de humidade relativa mais alta (mantida com o auxílio de humidificador e vaporizadores), as espécies desérticas necessitam de humidade relativa mais baixa.

Humidade relativa elevada juntamente com temperaturas altas, sem uma ventilação eficiente, pode causar um rápido desenvolvimento bacteriano.

Aquisições e socialização

Antes de adquirir um novo réptil informe-se até que ponto é possível a socialização de vários membros da mesma espécie. Existem espécies que não conseguem conviver com outras, preferindo ser mais solitárias.

O alojamento de machos da mesma espécie leva frequentemente à existência de lutas e mesmo quando não são alojados machos conjuntamente pode desenvolver-se uma situação de competição pelo alimento ou áreas de aquecimento. Recomenda-se que seja feito sempre um período de quarentena mínimo de 30 dias a 3 meses quando se adquire um novo indivíduo.



Cobras e Serpentes

Os cuidados básicos do seu réptil



Cobra do leite, Cobra do milho e Piton-real

Antes de adquirir

Informe-se, sobre a biologia da espécie que tem em vista. Assegure que pode satisfazer as condições de alojamento e alimentação, não só enquanto juvenil mas também enquanto adulto. Procure também saber informações sobre a longevidade, temperamento, socialização e ainda o estatuto de proteção (CITES I,II ou III). Prepare tudo antes da chegada do novo membro.

Depois de adquirir

Mudanças de habitação ou rotina são sempre stressantes para os répteis, e estes podem demorar algum tempo até se adaptarem a um novo ambiente.

Durante este período de adaptação aconselha-se a que os recipientes e estruturas do terrário não sofram alterações e que a alimentação seja homogênea, adequada e oferecida rotineiramente.

Aconselha-se que mantenha especial vigilância neste período crítico, e que limite a manipulação do seu réptil ao estritamente necessário. Se após uma semana houver pouca actividade ou continuar sem comer, consulte um Médico Veterinário de animais exóticos.

Desparasitação

A desparasitação interna e externa deve ser feita de uma forma regular e sempre que necessário. A infestação do habitáculo e do réptil com ácaros é frequente quando é fornecido alimento não congelado previamente.

Brumação

Devem ser bem alimentados no Verão e Outono e após esta altura o fornecimento de alimento deve cessar e a temperatura ambiente descer 10 a 14 °C gradualmente. A água deve ser mudada com frequência.

Só deve ser realizada se a cobra estiver saudável e com boa condição corporal.

Elaborado por:

- Ana Carina Branco Carvalho

Alimentação

Todas as espécies são carnívoras no entanto existem espécies com dietas quase especializadas (lesmas, ovos, ovas de peixe, térmitas). Por esta razão pode ser difícil satisfazer todas as suas necessidades nutricionais ou apenas com a grande força de vontade de muitos donos.

Podem fazer parte da sua dieta em cativeiro ratos e outros roedores e aves principalmente. Devem ser dados grilos e peixe ocasionalmente de forma a aumentar o valor nutricional do alimento fornecido. Deve-se também fornecer ocasionalmente um suplemento de cálcio e vitaminas.

No caso das cobras é aconselhado que o alimento seja já fornecido sem vida, e no caso dos ratos estes devem ter sido previamente congelados, dado que alimento vivo pode originar ferimentos nas cobras. Para além de se evitar ferimentos, a congelação, também vai levar a morte de eventuais parasitas e bactérias patogénicas que possam estar na presa.

Na grande maioria das espécies é aconselhado a existência de uma taça de água suficientemente larga de forma a permitir que a cobra submerja o seu corpo mas que não deve ser muito funda, principalmente no caso dos juvenis. Para além de ser usada para beber, esta água constitui na maioria dos indivíduos um meio de defecação pelo que se aconselha a sua mudança diária.

Terrário

Existem muitos tipos de terrários, e feitos de diversos materiais, desde caixas de plástico, aquários alterados em fibra de vidro ou madeira. No entanto deve-se ter em conta os seguintes requisitos:

- Impermeável;
- Fácil acesso para alimentação, limpeza e monitorização;
- Área suficiente que permita alguma atividade.

Referências Bibliográficas: - Mader (2006), *Reptile Medicine and Surgery-2ªed, Elsevier, Missouri*

- Jacobson, E.(2007) *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles- Color Atlas and Text.* Boca Raton: Taylor& Francis Group

Recomenda-se que cada cobra tenha um terrário independente. Desta forma não existe competição pela comida ou fonte de luz.

As medidas aceitáveis nas cobras têm em conta o seu tamanho, ou seja, comprimento do terrário igual ao comprimento do réptil, e a largura igual a metade do comprimento do réptil. A longevidade destes répteis é muito variada, assim sendo, os terrários devem ter em conta que estes facilmente chegam aos 10 anos e que vão precisar de mais espaço à medida que crescem.

Cobra do leite (*Lampropeltis triangulum*)



Têm uma longevidade de 15 a 30 anos, alimentam-se à base de minhocas, lagartos e ratos pequenos.

O Terrário deverá ter as seguintes características, tamanho mínimo (120Litros), e temperatura (25-30°C e na zona quente 38-40°C).

Cobra do milho (*Pantherophis guttata*)



Têm uma longevidade de 10 anos, alimentam-se à base de ratos recém nascidos (1-2 dias de vida) ou ratos adultos pequenos. Em juvenil alimentar 5-7 dias e em adultos 7-10 dias.

O Terrário deverá ter as seguintes características, tamanho mínimo (80Litros), humidade relativa (30-50%) e temperatura (21-29°C).

Piton-real (*Python regius*)



Têm uma longevidade de 20-30 anos, alimentam-se durante a noite à base de ratos congelados ou ratazanas em adultos. Em juvenil alimentar 7-10 dias e em adultos 2-3 semanas.

O Terrário deverá ter as seguintes características, tamanho mínimo (80-120Litros), humidade relativa (50-80%) e temperatura (noite 24°C, de dia 26-29°C e zona quente 38-40°C).

Substratos

Podem ser utilizados diversos substratos. A utilização de substratos muito húmidos, secos, ácidos, básicos ou com muitos detritos pode dar origem a problemas dermatológicos ou respiratórios. O substrato ideal é aquele sendo barato é também agradável esteticamente, fácil de limpar, absorvente e digerível caso seja ingerido, como por exemplo, jornais, serradura, ou casca de árvores indicadas para esta utilização..

Iluminação e termorregulação

A iluminação natural (preferível e direta) ou artificial é imprescindível para a manutenção do metabolismo do cálcio (UVB) e síntese de vitamina D (UVA). Nunca deixar o réptil numa caixa de vidro ao sol, o sobreaquecimento é rápido e pode levar à morte do mesmo.

Quando o réptil estiver no exterior, proteger com uma rede, de eventuais predadores (roedores e aves).

O tempo de exposição solar depende do tipo de réptil e da estação do ano. Nos répteis tropicais 11h de Inverno e 13h de Verão, nos restantes répteis, 9h de Inverno, 12 de Primavera/Outono e 15h de Verão.

Como fonte de calor, pode-se usar tapetes ou lâmpadas de aquecimento, estas últimas com proteção de rede e a distância adequada são mais benéficas, porque evitam desidratação e queimaduras térmicas. **Nunca deixar as lâmpadas ligadas 24h.**

Limpeza e desinfeção

Retire o réptil e coloque numa caixa de transporte. Evite limpar o habitáculo na cozinha ou casa de banho. Se possível faça-o no exterior. Remova toda a matéria orgânica para que o desinfetante tenha uma ação efetiva. Lave todas as superfícies, recipientes da comida e água também, com uma solução de hipoclorito de sódio diluída (Lixívia) na proporção de 30 ml/litro de água, deixando atuar cerca de 10 minutos. Lave novamente com água limpa e enxague com papel limpo e descartável.

Após limpeza do terrário ou contacto direto com o réptil e acessórios, lave sempre as mãos, com sabão neutro.



Osmorregulação

Espécies florestais necessitam de humidade relativa mais alta (mantida com o auxílio de humidificadores e/ou vaporizadores), enquanto que as espécies desérticas necessitam de uma humidade relativa mais baixa.

Humidade relativa alta juntamente com temperaturas elevadas, com ausência de ventilação eficiente, leva a um rápido desenvolvimento bacteriano.

Aquisições e socialização

Antes de adquirir um novo réptil informe-se sobre a possibilidade de socialização com outros membros da mesma ou outras espécies. Existem espécies que são preferencialmente solitárias e por isso não toleram convivência com outras.

O alojamento de machos da mesma espécie leva frequentemente à existência de lutas, e mesmo quando alojados animais de diferentes géneros pode desenvolver-se uma situação de competição pelo alimento ou áreas de aquecimento.

Recomenda-se que seja feito sempre um período de quarentena mínimo de 30 dias a 3 meses quando se adquire um novo indivíduo.



Lagartos

Os cuidados básicos do seu réptil



Dragão-barbudo, *Uromastix* spp. e Iguana verde

Antes de adquirir

Informe-se, sobre a biologia da espécie que tem em vista. Assegure que pode satisfazer as condições de alojamento e alimentação, não só enquanto juvenil mas também enquanto adulto. Procure também saber informações sobre a longevidade e dimensão da espécie, temperamento e socialização e ainda o estatuto de proteção (CITES I,II ou III).

Quando tiver tomado a sua decisão prepare tudo antes da chegada do novo membro.

Depois de adquirir

Mudanças de habitação ou rotina são sempre stressantes para os répteis, e estes podem demorar algum tempo até se adaptarem a um novo ambiente.

Durante este período de adaptação, aconselha-se a que os recipientes e estruturas do terrário não sofram grandes alterações e que a alimentação seja homogénea, adequada e oferecida rotineiramente. No entanto, durante os primeiros dias pode haver ingestão de menos alimento ou praticamente nenhum.

Aconselha-se que mantenha especial vigilância neste período crítico, e que limite a manipulação do seu réptil ao estritamente necessário. Se após uma semana houver pouca atividade ou continuar sem comer, consulte um Médico Veterinário de animais exóticos.

Desparasitação

A desparasitação interna: no caso do Omnívoros e Carnívoros/ Insetívoros, recomenda-se que esta seja realizada pelo menos de 6 em 6 meses e no caso dos Herbívoros pelo menos de 12 em 12 meses, ou sempre que se justifique.

A desparasitação externa deve ser feita de uma forma regular, dado que a infestação da habitação e do réptil com ácaros é uma situação muito difícil de controlar e eliminar.

Roedores fornecidos como alimento fresco podem ser potenciais veículos de infestação com ácaros, pelo que devem ser fornecidos após congelação prévia.

Elaborado por:

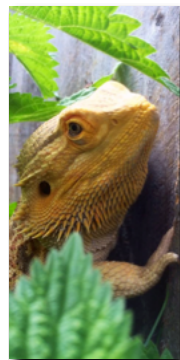
- Ana Carina Branco Carvalho

Alimentação

A alimentação do seu réptil deve ser **homogénea** em textura e tamanho. Alimentos de tamanho inadequado são difíceis de digerir e dão origem a obstruções no aparelho digestivo. **Alimentos frescos** são sempre preferíveis a rações comerciais.

Uma alimentação inadequada, em quantidade e a nível nutricional, é responsável pelo aparecimento de cerca de **90% das doenças em répteis** que vivem em cativeiro. Alterações repentinas na alimentação podem ser fonte de stress para o animal. **Em juvenil alimentar diariamente e em adulto a cada 1-2 dias.**

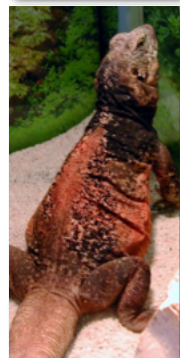
Atenção: Alimentos refrigerados há muito tempo podem estar contaminados por fungos ou bactérias patogénicos. No entanto alimentos congelados têm digestibilidade aumentada, mas quando a congelação é efetuada por períodos superiores a 6 meses tem uma perda nutritiva alta associada. Todos os alimentos fornecidos tem que ser livres de pesticidas.



Dragão-barbudo

(*Pogona vitticeps*)

- Grilos, tenebrios, gafanhotos, moscas, cigarras, bichos-da-seda e traças;
- Folhas verdes (alface romana, dente de leão, folhas de mostarda, folhas de beterraba, espinafres, coentros) devendo dar-se pellets como parte da dieta;
- Suplementar com cálcio (diário em juvenis e 2x/semana em Adultos) e vitaminas semanalmente.



Lagarto Uromastix

(*Uromastix* spp.)

- Ervilhas, lentilhas, feijão-verde e milho;
- Suplementado com cálcio em pó e uma mistura de verduras (alface romana, couve, dente de leão);
- No caso dos juvenis o alimento pode ser picado de forma a diminuir o tamanho das partículas. Deve ser fornecido um suplemento vitamínico semanalmente.



Iguana verde

(*Iguana iguana*)

- 40-45% de plantas/folhas ricas em cálcio tais como folhas de nabiça, folhas de mostarda, folhas e flores de dente de leão, salsa, coentros;
- 40-45% de outros vegetais: feijão-verde, ervilhas, abóbora, batata doce, pimento. Alface pode ser oferecida mas tem um baixo valor nutritivo. Deve-se fornecer com moderação espinafres, acelga, beterraba, couve, couve chinesa, folhas de brócolos;
- Podem alimentar-se esporadicamente de pequenos insectos;
- Alfafa é uma boa fonte proteica pelo que pode ser fornecida na forma de pellets (vendidos em lojas de

animais);

- Pode ser fornecidos em pequena quantidade e ocasionalmente fruta (figos, papaia, melão, maçã, pêssegos, ameixa, morangos, banana e kiwi);

- Suplementação de cálcio por casca de choco no mínimo 4-5x/semana nos juvenis e 2-3x/semana no caso dos adultos (fácil de adquirir em lojas de animais e supermercados).

Terrário

O seu réptil não deve andar solto pela casa, as perdas térmicas são elevadas, sofrem com maior frequência traumas e fogem mais facilmente.

O terrário deverá oferecer o maior espaço útil, pois o seu réptil irá crescer. No caso de espécies arborícolas deverá ter em conta a altura do terrário, enquanto nas restantes deverá ter em conta o comprimento e largura, a altura deve ser suficiente para ter a lâmpada de aquecimento e UVs. Deve ter sempre vários esconderijos, no caso de uma espécie arborícola esta necessita de ramos e estruturas para trepar.

Espécies	Longevidade (anos)	Área mínima aceitável	Humida de relativa	Temperatura
Dragão-barbudo	10-15	60x120 cm (por adulto)		Dia: 27°C, Noite: 21°C Zona quente: 32-35°C
Lagarto Uromastix	10-20	área bastante ampla a outdoors	15-30%	Dia: 27°C, Noite: 21°C Zona quente: 43-46°C
Iguana verde	Até 20	2mx2mx1 m	70-80%	Dia: 25-29°C Noite: 22°C

Referências Bibliográficas: - Mader (2006), *Reptile Medicine and Surgery-2ªed*, Elsevier, Missouri

- Jacobson, E.(2007) *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles- Color Atlas and Text*. Boca Raton: Taylor& Francis Group

Substratos

Em aquários podem ser usadas pedras grandes (as pequenas podem ser confundidas com alimento) no fundo ou como suporte para descanso fora de água.

Como passam muito tempo dentro de água é inevitável o acúmulo de fezes dentro de água, e por sua vez desenvolvimento de bactérias e fungos patogénicos. Estes estão muitas vezes na origem do aparecimento de lesões cutâneas. A mudança periódica da água e o uso de bombas de água adequadas para aquários com répteis (com maior potência do que as usadas para peixes) contribuem para a diminuição da incidência deste tipo de lesões.

Iluminação e termorregulação

A iluminação natural (preferível e direta) ou artificial é imprescindível para a manutenção do metabolismo do cálcio (UVB) e síntese de vitamina D (UVA). Nunca deixar o réptil numa caixa de vidro ao sol, o sobreaquecimento é rápido e pode levar à morte do mesmo.

Quando o réptil estiver no exterior, proteger com uma rede, de eventuais predadores (roedores e aves).

O tempo de exposição solar depende do tipo de réptil e da estação do ano. Nos répteis tropicais 11h de Inverno e 13h de Verão, nos restantes répteis, 9h de Inverno, 12 de Primavera/Outono e 15h de Verão.

Como fonte de calor, deve ter lâmpada de aquecimento. **Nunca deixar as lâmpadas ligadas 24h.**

Limpeza e desinfeção

Retire o réptil e coloque numa caixa de transporte. Evite limpar o habitáculo na cozinha ou casa de banho. Se possível faça-o no exterior. Remova toda a matéria orgânica para que o desinfetante tenha uma ação efetiva. Lave todas as superfícies, recipientes da comida e água também, com uma solução de hipoclorito de sódio diluída (Lixívia) na proporção de 30 ml/litro de água, deixando atuar cerca de 10 minutos. Lave novamente com água limpa e enxague com papel limpo e descartável.

Após limpeza do aquário ou contacto direto com o réptil e acessórios, lave sempre as mãos, com sabão neutro.



Aquisições e socialização

Antes de adquirir um novo réptil, informe-se sobre a possibilidade de socialização com outros membros da mesma ou outras espécies.

No caso das tartarugas aquáticas ou semi aquáticas existem algumas espécies que são agressivas, não só para membros de outras espécies mas também com membros da própria espécie, pelo que devem ser alojadas sozinhas. Exemplos, Tartaruga-vibora (*Chelydra serpentina*), Tartaruga de carapaça mole (*Apalone spp.*), Tartaruga cabeçuda chinesa (*Platysternon megacephalum*).

Deve-se também ter em atenção que qualquer tartaruga pode morder o seu dono.

Recomenda-se um período de quarentena mínimo de 30 dias a 3 meses sempre que adquirido um novo indivíduo.



Tartarugas Semi-Aquáticas e Aquáticas

Os cuidados básicos do seu réptil



Tartaruga de orelhas e Tartaruga da lama

Antes de adquirir

Informe-se, sobre a biologia da espécie que tem em vista. Assegure que pode satisfazer as condições de alojamento e alimentação, não só enquanto juvenil mas também enquanto adulto. Procure também saber informações sobre a longevidade da espécie, temperamento e socialização e ainda o estatuto de proteção (CITES I,II ou III), bem como o tamanho em adulto.

Quando tiver tomado a sua decisão prepare tudo antes da chegada do novo membro.

Depois de adquirir

Mudanças de habitação ou rotina são sempre stressantes para os répteis. Estes podem demorar algum tempo até se adaptarem a um novo ambiente.

Durante este período de adaptação, aconselha-se a que os recipientes e estruturas do terrário não sofram grandes alterações e que a alimentação seja homogénea, adequada e oferecida rotineiramente. No entanto durante os primeiros dias pode haver ingestão de menos alimento ou praticamente nenhum.

Aconselha-se que mantenha especial vigilância neste período crítico, e que limite a manipulação do seu réptil ao estritamente necessário. Se após uma semana houver pouca atividade ou continuar sem comer, consulte um Médico Veterinário de animais exóticos.

Desparasitação

A desparasitação interna: no caso dos Omnívoros e Carnívoros/ Insetívoros recomenda-se que esta seja realizada pelo menos de 6 em 6 meses. No caso dos Herbívoros, pelo menos de 12 em 12 meses, ou sempre que se justifique.

A desparasitação externa deve ser feita de uma forma regular, dado que a infestação da habitação e do réptil com ácaros é uma situação muito difícil de controlar e eliminar.

Elaborado por:

- Ana Carina Branco Carvalho

Alimentação

A alimentação do seu réptil deve ser **homogénea** em textura e tamanho, alimentos de tamanho inadequado são difíceis de digerir e estão na origem de obstruções no aparelho digestivo. Deve-se fornecer uma mistura homogénea de alimentos variados, impedindo a escolha dos alimentos. **Alimentos frescos** são sempre preferíveis a rações comerciais.

Uma alimentação inadequada, em quantidade e a nível nutricional, é responsável pelo aparecimento de cerca de **90% das doenças em répteis** que vivem em cativeiro. Alterações repentinas na alimentação podem ser fonte de stress para o animal. **Em juvenil alimentar diariamente e em adulto a cada 1-2 dias.**

Atenção: Alimentos refrigerados há muito tempo podem estar contaminados por fungos ou bactérias patogénicos. No entanto alimentos congelados têm digestibilidade aumentada, mas quando a congelação é efectuada por períodos superiores a 6 meses têm uma perda nutritiva alta associada. Todos os alimentos fornecidos tem que ser livres de pesticidas. Preferem ser alimentados na água. De maneira a sujar o menos possível a água do aquário, podem ser alimentados num recipiente à parte, com alguma quantidade de água e após o período de alimentação devem regressar ao aquário.

No caso das tartarugas carnívoras deve fazer parte da sua dieta proteína animal (80%), vegetais (15%) e fruta (5%). Cada espécie tem preferências por determinados alimentos, pelo que deverá variar bastante o tipo de alimento fornecido, e aconselha-se sempre a fazer uma mistura homogénea dos vários alimentos aconselhados.

Para as tartarugas herbívoras recomenda-se uma dieta variada e rica em vegetais (90%), fruta (5%) e proteína animal (5%). Os tradicionais camarões secos são muito pobres em nutrientes, pelo que deve evitá-los. Pode ainda oferecer granulado próprio para tartarugas. As necessidades nutricionais variam à medida que crescem, sendo na fase juvenil preferencialmente carnívoras e à medida que ficam adultos necessitam de maior quantidade de vegetais.

Referências Bibliográficas: - Mader (2006), *Reptile Medicine and Surgery-2ªed*, Elsevier, Missouri

- Jacobson, E.(2007) *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles- Color Atlas and Text*. Boca Raton: Taylor& Francis Group

Aquário

O seu réptil não deve andar solto pela casa, as perdas térmicas são elevadas, sofrem com maior frequência traumas e fogem mais facilmente.

Preferencialmente de forma retangular por oferecer um maior espaço útil e diminuir a probabilidade de lesão. Assim sendo, os tradicionais mini aquários com palmeira não são de todo adequados para a sua tartaruga. Aconselha-se que adquira um aquário com dimensões suficientes e se possível a pensar que o seu reptil vai crescer.

Espelhos ou superfícies refletoras podem causar feridas ou lesões faciais pelo que não devem existir.

Deve estar sempre presente um ou vários esconderijos no aquário, podendo um ser a superfície e outro debaixo de água.

Espécies	Longevidade (anos)	Área mínima aceitável	Temperatura
Tartaruga de orelhas (<i>Traquemys scripta</i>)	15-30	70x30x30cm	Água: 21-26°C Zona quente: 18-29°C
Tartaruga da lama (<i>Kinosternon sp.</i>)	10-15	80L. Profundidade mínima: 5-10cm (Juvenil) e 20-30 (Adulto)	Água: 24-25°C Zona quente: 25°C



Substratos

Podem ser utilizados diversos substratos. A utilização de substratos muito húmidos, secos, ácidos, básicos ou com muitos detritos pode dar origem a problemas dermatológicos ou respiratórios. O substrato ideal é aquele sendo barato é também agradável esteticamente, fácil de limpar, absorvente e digerível caso seja ingerido, como por exemplo, jornais, serradura, ou casca de árvores indicadas para esta utilização.

Iluminação e termorregulação

A iluminação natural (preferível e direta) ou artificial é imprescindível para a manutenção do metabolismo do cálcio (UVB) e síntese de vitamina D (UVA). Nunca deixar o réptil numa caixa de vidro ao sol, o sobreaquecimento é rápido e pode levar à morte do mesmo.

Quando o réptil estiver no exterior, proteger com uma rede, de eventuais predadores (roedores e aves).

O tempo de exposição solar depende do tipo de réptil e da estação do ano. Nos répteis tropicais 11h de Inverno e 13h de Verão, nos restantes reptéis, 9h de Inverno, 12 de Primavera/Outono e 15h de Verão.

Como fonte de calor, pode-se usar tapetes ou lâmpadas de aquecimento, estas últimas com proteção de rede e a distância adequada são mais benéficas, porque evitam desidratação e queimaduras térmicas. **Nunca deixar as lâmpadas ligadas 24h.**

Limpeza e desinfeção

Retire o réptil e coloque numa caixa de transporte. Evite limpar o habitat na cozinha ou casa de banho. Se possível faça-o no exterior. Remova toda a matéria orgânica para que o desinfetante tenha uma ação efetiva. Lave todas as superfícies, recipientes da comida e água também, com uma solução de hipoclorito de sódio diluída (Lixívia) na proporção de 30 ml/litro de água, deixando atuar cerca de 10 minutos. Lave novamente com água limpa e enxague com papel limpo e descartável.

Após limpeza do terrário ou contacto direto com o réptil e acessórios, lave sempre as mãos, com sabão neutro.



Osmorregulação

Espécies de climas desérticos tem geralmente mecanismos hidrorregulação que impedem perdas de água desnecessárias. No entanto, a presença de uma taça de água permanentemente no interior do terrário permite a manutenção da humidade relativa.

Aquisições e socialização

Antes de adquirir um novo réptil informe-se sobre a possibilidade de socialização com outros membros da mesma ou outras espécies.

No caso das tartarugas terrestres, é provável existir agressividade entre machos da mesma espécie. Destaca-se com especial atenção:

- Tartarugas desérticas (*Geocholone pardais*, *Testudo horsfieldii*)
- Tartaruga de esporas africana (*Centrochelys sulcata*)

Mesmo quando existe mais que uma tartaruga e ambos não são machos, deve-se ter atenção ao comportamento de competição por alimento e zona quente, podendo ser necessário duplicar a zona de alimentação e a zona quente.



Tartarugas Terrestres

Os cuidados básicos do seu réptil

Tartaruga-mediterrânica, Tartarugas Norte Americanas e *Geochelone* spp.

Antes de adquirir

Informe-se, sobre a biologia da espécie que tem em vista. Assegure que pode satisfazer as condições de alojamento e alimentação, não só enquanto juvenil mas também enquanto adulto. Procure também saber informações sobre a longevidade da espécie, temperamento e socialização e ainda o estatuto de proteção (CITES I,II ou III). A longevidade das tartarugas terrestres é elevada na generalidade das espécies ,podendo ultrapassar os 100 anos. Quando tiver tomado a sua decisão prepare tudo antes da chegada do novo membro.

Depois de adquirir

Mudanças de habitação ou rotina são sempre stressantes para os répteis, e estes podem demorar algum tempo até se adaptarem a um novo ambiente.

Durante este período de adaptação, aconselha-se a que os recipientes e estruturas do terrário não sofram grandes alterações e que a alimentação seja homogénea, adequada e oferecida rotineiramente. No entanto durante os primeiros dias pode haver ingestão de menos alimento ou praticamente nenhum. Aconselha-se que mantenha especial vigilância neste período crítico, e que limite a manipulação do seu réptil ao estritamente necessário. Se após uma semana houver pouca atividade ou continuar sem comer, consulte um Médico Veterinário de animais exóticos.

Desparasitação

A desparasitação deve ser feita de uma forma regular e sempre que se justifique. No caso dos Omnívoros e Carnívoros recomenda-se que esta seja realizada pelo menos de 6 em 6 meses e no caso dos Herbívoros pelo menos de 12 em 12 meses.

Brumação

Tem que estar saudáveis e apresentar um peso apropriado para a idade e espécie. Espécies tropicais não podem brumar. Geralmente dura 3 meses, à temperatura de 4-10°C sendo necessário vigiar periodicamente a tartarua.

Elaborado por:

- Ana Carina Branco Carvalho

Alimentação

A alimentação do seu réptil deve ser **homogénea** em textura e tamanho: alimentos de tamanho inadequado são difíceis de digerir e dão origem a obstruções no aparelho digestivo. Deve fornecer uma mistura homogénea de alimentos variados, impedindo a escolha dos alimentos. **Alimentos frescos** são sempre preferíveis a rações comerciais.

Uma alimentação inadequada, em quantidade e a nível nutricional, é responsável pelo aparecimento de cerca de **90% das doenças em répteis** que vivem em cativeiro. Alterações repentinas na alimentação podem ser fonte de stress para o animal. **Em juvenil alimentar diariamente e em adulto a cada 1-2 dias.**

Atenção: Alimentos refrigerados há muito tempo podem estar contaminados por fungos ou bactérias patogénicos. No entanto, alimentos congelados têm digestibilidade aumentada, mas quando a congelação é efectuada por períodos superiores a 6 meses tem uma perda nutritiva alta associada. Todos os alimentos fornecidos têm que ser livres de pesticidas.

Porções gerais da dieta

(podem variar consoante a espécie)

Tartarugas omnívoras: vegetais (85%), fruta (10%) e proteína animal (5%)

Tartarugas herbívoras: vegetais (90%), fruta (8%) e proteína animal (2%)

Alimentos que se podem fornecer em maior quantidade:

dente-de-leão;

hibiscos;

Alimentos que **não devem ser dados** em grande quantidade:

couve, couve de Bruxelas, brócolos, couve-chinesa e rabanete;

espinafre, beterraba, aipo;

Fruta (evitar bananas e uvas)

Alimentos **potencialmente tónicos:**

abacate;

beringela;

flores tónicas (tulipas, azáleas, narcisos.

Terrário

O seu réptil não deve andar solto pela casa, as perdas térmicas são elevadas, sofrem com maior frequência traumas e fogem mais facilmente.

Para tartarugas terrestres é preferível um terrário que respeite as dimensões adequadas em comprimento e largura sendo que altura deve ser apenas suficiente que respeite a distância lâmpada-tartaruga.

Deve estar sempre presente um ou vários esconderijos, principalmente se este alojar mais que um indivíduo.

Espécies	Área mínima aceitável	Temperatura
“Box turtle” (<i>Terrapene sp.</i>) Tartaruga de caixa	120x60x38 cm	22-24°C Zona quente: 29-31°C
Tartaruga-Leopardo (<i>Geochelone pardalis</i>)	Espaço exterior, ou interior 120x240cm /adulto	Dia: 28-30°C, Noite: 24°C Zona quente: 32°C
Tartaruga-mediterrânica (<i>Testudo hermanni</i>)	Se possível no exterior	Dia: 21-27°C, Noite: 18-24°C Zona quente: 30°C
Tartaruga-russa (<i>Testudo horsfieldii</i>)	Se possível no exterior, quando a temperatura não o permite, aconselha-se um terrário de vidro opaco com capacidade de 180Litros e com abstrato com 30cm de profundidade	Dia: 21-27°C, Noite: 18-24°C Zona quente: 18-24°C Lâmpada de UVB e UVA no interior

Principais causas de doença

Sistema imunitário: apresenta variações sazonais e a sua resposta varia com as condições fornecidas;

Stress: sempre presente quando não são asseguradas as condições do terrário, alimentação ou excesso de manipulação.

Alimentação: quando fornecidos alimentos inapropriados para a idade ou espécie.

Referências Bibliográficas: - Mader (2006), *Reptile Medicine and Surgery-2ªed, Elsevier, Missouri*

- Jacobson, E.(2007) *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles- Color Atlas and Text.*Boca Raton: Taylor& Francis Group