

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária**

Aspectos Patológicos e Etiológicos de Salmonelose em Serpentes no Sul do Brasil

Autora: Marianna Bertolini

Porto Alegre

2019

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária**

Aspectos Patológicos e Etiológicos de Salmonelose em Serpentes no Sul do Brasil

Autora: Marianna Bertolini

**Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à Banca
Examinadora como
requisito parcial para a
obtenção da graduação em
Medicina Veterinária**

**Orientadora: Prof. Luciana
Sonne**

Porto Alegre

2019

Marianna Bertolini

SALMONELOSE EM SERPENTES: CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E
ETIOLÓGICA.

Aprovado em ____/____/____

APROVADO POR:

Profa. Dra. Luciana Sonne
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Welden Panziera
Membro da Comissão

M.V. Dr. Matheus Viezzer Bianchi
Membro da Comissão

Agradecimentos

Aos meus pais, Marcelo e Luciana, que sempre me apoiaram em cada decisão tomada nessa jornada e me incentivaram a ser uma pessoa melhor. Um agradecimento especial ao meu pai, com quem logo serei companheira de profissão, que me inspirou na minha carreira antes mesmo de eu decidir cursar veterinária e me ajudou em todo momento possível, com muitos conselhos e ensinamentos.

A Renata que, apesar de pouca vivência juntas até agora, me aceitou como uma filha e me ajudou nesse fim de curso com muito apoio.

Aos meus irmãos, Isabella, Catarina e Lorenzo, que me apoiaram durante toda a graduação, mesmo nos momentos ruins.

À minha família, em especial meu tio Giancarlo e tia Naira, que me aceitaram de braços abertos e cuidaram de mim como filha; e minhas primas Luísa e Ana Carolina, minhas segundas irmãs, que desde crianças sempre estiveram juntas do meu lado fazendo altas aventuras, mesmo com a barreira lingüística, e que sempre me apoiaram em tudo.

Às minhas amigas, Jenifer, Larissa, Keylla, Alessandra e Marcelly, que desde o primeiro semestre alegam meus dias e tornavam as aulas mais toleráveis.

À minha orientadora, professora Luciana, pelos ensinamentos e orientações dentro e fora da sala de aula, e por todas as oportunidades dadas durante o meu tempo no SPV-UFRGS. Foi uma honra trabalhar com a senhora e espero ter outras oportunidades futuras para continuar.

Aos professores Sauloe David, por todos os ensinamentos e oportunidades dados. Mostrando que é através da busca de conhecimento contínuo e trabalho honesto e duro que se faz sua carreira.

À banca, por aceitarem o convite para fazerem parte e contribuírem dessa etapa tão importante da graduação.

Ao Claiton, que não mediu esforços para contribuir com que esse trabalho pudesse existir, sempre com muita paciência e ensinamentos; e à Andréia, que também ajudou no processo de fazer com que esse trabalho existisse.

Às estagiarias do SPV-UFRGS, por toda a ajuda, paciência e companheirismo, dentro e fora do setor.

A toda equipe do SPV-UFRGS, por me acolherem e por todos os ensinamentos e oportunidades dados todos os dias.

A todos que contribuíram de alguma forma para que esse sonho pudesse ser realizado e que eu chegasse onde estou hoje.

Resumo

Salmonella spp. é uma bactéria presente na microbiota intestinal normal de répteis. Podendo ocasionar doença clínica e morte, principalmente em momentos pós-estresse. No presente trabalho realizou-se um estudo retrospectivo em busca de casos diagnosticados como salmonelose em serpentes, entre 2011 e 2018 no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após consulta dos protocolos de necropsia, foram agrupados 51 casos de necropsias de serpentes, dos quais seis casos apresentavam diagnóstico conclusivo de salmonelose e outros quatro casos demonstraram lesões compatíveis, com a condição. Nisso, a presença de *Salmonella* spp. nas lesões foi confirmada por imuno-histoquímica (IHQ), totalizando, assim, 10 casos (19,6%). Esses casos foram reavaliados e as lesões caracterizadas por sua morfologia. Todas as serpentes eram de cativeiro do gênero *Bothrops*, sendo quatro *B. jararaca*, três *B. pubescens* e três *B. alternatus*. Seis eram fêmeas e quatro machos. Em relação à idade, sete eram adultas e em três casos a idade não constava no laudo. As lesões mais frequentes foram magreza excessiva (8/10), hepatite fibrinonecrótica e/ou granulomatosa (8/9), enterocolite fibrinonecrótica e/ou granulomatosa (8/9); miocardite necrótica e heterofílica (2/10), pancreatite fibrinonecrótica ou granulomatosa (2/5), osteomielite fibrinoheterofílica (1/10), pericardite fibrinosa e piogranulomatosa (1/10) e esplenite granulomatosa (1/6). Em seis casos houve isolamento de *Salmonella enterica*, com sorotipificação das subespécies *arizonae* (3/6), *diarizonae* (1/6) e *houtenae* (1/6), além do sorotipo Typhimurium (1/6). Nos casos sem isolamento, houve imunomarcção de *Salmonella* no intestino (3/4), fígado (1/4) e coração (1/4). A salmonelose mostrou-se uma doença importante de serpentes do gênero *Bothrops* criadas em cativeiro no Rio Grande do Sul, Brasil. As principais lesões observadas foram hepatites e enterocolites fibrinonecróticas e/ou granulomatosas. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* foi a subespécie mais frequente neste estudo.

Palavras-chave: Patologia de répteis, *Bothrops* spp., *Salmonella*, hepatite, enterite, imuno-histoquímica.

Abstract

Salmonella spp. is a Gram-negative commensal bacteria of reptiles. Snakes may be asymptomatic or manifest clinical disease and death, especially in post-stress moments. A retrospective study was carried out in search of cases diagnosed as salmonellosis between 2011 and 2018 in snakes in the Veterinary Pathology Department of the Federal University of Rio Grande do Sul. After consulting the necropsy protocols, 51 reports of snake necropsies were found. Six cases had a conclusive diagnosis of salmonellosis and four other had compatible lesions with the condition, whose presence of *Salmonella* spp. was confirmed in the lesions by immunohistochemistry (IHC), thus totaling 10 cases (19.6% of the sample). These cases were reevaluated and the lesions characterized by their morphology. All snakes were from the *Bothrops* genus, being four *B. jararaca*, three *B. pubescens* and three *B. alternatus*. As for sex, six were females and four males. Regarding age, seven were adults and in three cases age was not included in the report. The most frequent lesions were wasting (8/10), fibrinonecrotic and/or granulomatous hepatitis (8/9), fibrinonecrotic and/or granulomatous enterocolitis (8/9); necrotic and heterophilic myocarditis (2/10), fibrinonecrotic or granulomatous pancreatitis (2/5), fibrinoheterophilic osteomyelitis (1/10), fibrinous and pyranranomatous pericarditis (1/10) and granulomatous splenitis (1/6). In six cases, *Salmonella enterica* was isolated, with serotyping of the *arizonae* (3/6), *diarizonae* (1/6) and *houtenae* (1/6) subspecies, in addition to the *Typhimurium* (1/6) serotype. In cases without isolation, there was immunostaining of *Salmonella* in the intestine (3/4), liver (1/4) and heart (1/4). Salmonellosis proved to be an important disease of captive bred snakes of the *Bothrops* genus in Rio Grande do Sul State, Brazil. The main lesions observed were fibrinonecrotic and/or granulomatous hepatitis and enterocolitis. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* was the most frequent subspecies detected in this study.

Keywords: Reptile pathology, *Bothrops* spp., *Salmonella*, hepatitis, enteritis, immunohistochemistry.

Lista de Figuras

Figura 1: Lesões macroscópicas de salmonelose em serpentes.....	18
Figura A: Fígado da serpente 04 com nódulos amarelados multifocais, variando de 0,2 a 1 cm de diâmetro.....	18
Figura B: Fígado aumentado de volume da serpente 02, com massa de aproximadamente 12x8 cm, amarelada e com áreas avermelhadas.....	18
Figura C: Fígado da mesma serpente da figura 2. Ao corte nota-se evidenciação de múltiplas cavitações preenchidas por cáseos e fibrina.....	18
Figura D: Intestino grossa da serpente 07 com mucosa difusamente avermelhada e com nódulos amarelados multifocais na mucosa.....	18
Figura E: Intestino grosso da serpente 10 com mucosa difusamente avermelhada e placas amareladas multifocais a coalescentes sobre a mucosa.....	18
Figura F: Coluna vertebral e costelas da serpente 01 com vários nódulos branco-amarelados, medindo 1 - 4 mm de diâmetro.....	18
Figura 2: Lesões microscópicas de salmonelose em serpentes.....	20
Figura A: Fígado da serpente 02 nota-se necrose de coagulação multifocal acentuada com exsudação de fibrina e discreto infiltrado inflamatório misto de heterófilos, linfócitos e plasmócitos (HE 100x).....	20
Figura B: Fígado da serpente 04 com área nodular com necrose caseosa e agregados bacterianos ao centro, circundados por infiltrado de macrófagos (granuloma) (HE 400x).....	20
Figura C: Intestino delgado da serpente 10 com necrose difusa da mucosa, associada a deposição de fibrina, infiltrado de heterófilos, linfócitos e plasmócitos e agregados bacterianos. Há também trombose multifocal predominante em submucosa (HE 100x).....	20
Figura D: Coração da serpente 06 com epicárdio acentuadamente espessado por deposição de fibrina e infiltrado de heterófilos e macrófagos (HE 200x).....	20
Figura 3: Sorotipificação de <i>Salmonella</i> spp. em casos de salmonelose em serpentes.....	21
Figura 4: Caracterização imuno-histoquímica de salmonelose em serpentes.....	21
Figura A: Intestinos das serpente 04 e 05 com imunomarcção nas áreas de necrose da mucosa e no centro de granuloma na mucosa, respectivamente (Mach-4, AEC, 200x).....	21
Figura B: Intestinos das serpentes 04 e 05 com imunomarcção nas áreas de necrose da mucosa e no centro de granuloma na mucosa, respectivamente (Mach-4, AEC, 200x).....	21
Figura C: Fígado da serpente 04 com granuloma com imunomarcção anti- <i>Salmonella</i> spp. ao centro (Mach-4, AEC, 400x).....	21
Figura D: Coração da serpente 06 com imunomarcção anti- <i>Salmonella</i> spp. em pericárdio, com evidenciação de bacilos no interior de macrófagos e heterófilos (Mach-4, AEC, 400x).....	21

Lista de Tabelas

Tabela 1: Casos de infecção por <i>Salmonella</i> spp no período de 2011-2018 diagnosticados no Setor de Patologia da UFRGS.....	16
---	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Serpentes.....	10
1.2. Doenças de importância clínica na medicina de répteis em cativeiro.....	11
1.3. Características gerais da <i>Salmonella</i> spp.....	11
1.4. Potencial zoonótico dos répteis na transmissão de <i>Salmonella</i> spp.....	12
1.5. Objetivos.....	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3. RESULTADOS.....	15
3.1. Levantamento e reavaliação dos casos.....	15
3.2. Lesões macroscópicas.....	15
3.3. Lesões microscópicas.....	17
3.4. Microbiologia, sorotipificação e imuno-histoquímica.....	19
4. DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes

As serpentes peçonhentas no Brasil pertencem à família Viperidae e Elapidae. Na família Viperidae estão incluídos os gêneros: *Bothrops* (cruzeira, urutu), responsáveis pelos acidentes botrópicos; o gênero *Crotalus* (cascavel), responsável pelos acidentes crotálicos; e o gênero *Lachesis* (surucucu, jacutinga), no qual provocam os acidentes laquéticos. A família Elapidae é representada pelas serpentes dos gêneros *Micrurus*, conhecidas popularmente como corais ou corais-verdadeiras e são responsáveis pelos acidentes elapídicos (BLANCO & MELO 2014). Dentre esses acidentes, destacam-se os provocados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (AMARAL *et al.* 1985; TOKARNIA & PEIXOTO 2006; NOGUEIRA 2011; BLANCO & MELO 2014) e, embora raros, pelos gêneros *Lachesis* e *Micrurus* (BLANCO & MELO 2014). No Rio Grande do Sul, os acidentes botrópicos são predominantes, no qual destacam-se as espécies *Bothrops alternatus* (cruzeira, urutu), *B. jararaca* (jararaca) e *B. neuwiedi* (jararaca-pintada).

A identificação das serpentes pode ser realizada através da morfologia das espécies. Alguns aspectos morfológicos incluem: dentição, formato da cauda, presença ou ausência da fosseta loreal e desenhos presentes no corpo. As serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* possuem dentição bem desenvolvida na porção anterior e superior do maxilar (dentição solenóglifa). Já as serpentes do gênero *Micrurus* demonstram dentição proteróglifa, ou seja, dentes pequenos na porção anterior do maxilar superior. As serpentes peçonhentas, com exceção do gênero *Micrurus*, possuem a fosseta loreal, que é um orifício presente entre os olhos e a narina e funciona como um órgão termorreceptor. A característica da cauda também é diferente entre as espécies. O gênero *Bothrops* tem a cauda lisa na extremidade; o gênero *Lachesis* possui a cauda lisa, porém com pequenas escamas eriçadas na extremidade; o gênero *Crotalus* possui um chocalho ou guizo na porção final da cauda; e as serpentes do gênero *Micrurus* possuem a cauda arredondada e anéis coloridos brancos, vermelhos e pretos (NOGUEIRA 2011; BLANCO & MELO 2014). Em relação aos desenhos exibidos pelo corpo, a cruzeira (*Bothrops alternatus*) apresenta ganchos de telefones invertidos. No caso da jararaca, são observados “V” invertidos ou “V” incompletos.

Acidentes ofídicos são comuns em humanos e animais domésticos em diferentes partes do mundo e estão relacionados a diversos fatores que incluem, principalmente, clima, parâmetros ecológicos, biodiversidade, distribuição das serpentes peçonhentas, densidade populacional, atividades econômicas e tipos de habitações (OTERO-PATIÑO 2009).

Essas serpentes estão distribuídas por todo o território nacional, com algumas espécies

concentradas em certas regiões. As espécies *Bothrops alternatus*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, por exemplo, encontram-se nas regiões Sul, Sudeste e em todos exceto a Amazônia; espécies do gênero *Crotalus* são encontrados em todo o território exceto zona litorânea e áreas florestais; e do gênero *Micrurus*, em todo o território nacional (Brasil 2009).

1.2. Doenças de importância clínica na medicina de répteis em cativeiro

As afecções não-infecciosas mais frequentes em répteis são retenções de ovos, enfermidades nutricionais como hipovitaminose A e doença osteometabólica, traumatismos, disecdise e gota úrica. As infecciosas mais frequentes são as infecções bacterianas (pneumonias, estomatites, dermatites), dentre elas salmonelose, e ectoparasitoses (DOS SANTOS & GALLI 2017).

Em serpentes, quadros clínicos de salmonelose são comumente associados a *S. Arizona*, com uma prevalência de cerca de 78,8% de animais carreadores desse sorotipo (CHIODINI & SUNDBERG 1981), principalmente os pertencentes à subespécie III, (*arizonae* e *diarizonae*) (WARWICK *et al.* 2001; SCHRÖTER *et al.* 2004). Algumas das lesões descritas nesses animais são placas fibrinonecroticas amareladas e úlceras em botão em intestino delgado e grosso, além de granulomas e necrose hepática multifocal (ZACHARY 2016). Pode ainda chegar a outros tecidos pela via hematogena, ou decorrente de trauma em tecidos moles adjacentes, e ocasionar pneumonias, osteomielites, osteoartites, dermatites, epicardites e miocardite granulomatosa, abscessos hepáticos e, raramente, estomatites. Os principais sinais clínicos são anorexia, diarreia, perda de peso e letargia (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009; HARDT *et al.* 2016).

O diagnóstico de salmonelose em répteis vivos é feito através de coletas de *swabs* cloacais junto com a ocorrência de sinais clínicos. O resultado positivo não é sinal confirmatório de infecção, já que a bactéria faz parte da microbiota do animal. Resultado negativo também não indica ausência de infecção, pois a excreção da bactéria pode ocorrer de forma intermitente. O tratamento nem sempre é indicado, pela alta frequência de resistência antimicrobiana. Quando feito, alguns antibióticos indicados são quinolonas, cefalosporinas de última geração, gentamicina e ampicilina associada a inibidores de beta-lactamases (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009).

1.3. Características gerais da *Salmonella* spp.

Salmonelose é uma doença infectocontagiosa muito conhecida pelo potencial de transmissão por alimentos de origem animal, produtos agrícolas não-processados e água não-

tratada. Acomete tanto animais quanto o homem, é distribuída mundialmente e tem caráter zoonótico (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009). As espécies de *Salmonella* spp. são bacilos Gram-negativos pertencentes a família Enterobacteriaceae. A bactéria é aeróbio, intracelular facultativo, geralmente móvel, com flagelos e não-formador de esporos. Ela é relativamente resistente a vários fatores ambientais e apresentam a habilidade de proliferar em pH entre 7.0 e 7.5, temperatura entre 35° C a 43° C, demonstram atividade hídrica maior de 0,94 (BRASIL 2011).

São reconhecidas duas espécies atualmente (*S. bongori* e *S. enterica*), que são subdivididas pelo esquema Kauffmann-White em subespécies e sorotipos de acordo com a combinação de seus antígenos somáticos O (parede celular), como os fosfolipídios, lipopolissacarídeos e lipoproteínas; H (flagelo), que tem como função motilidade, quimiotaxia e fototaxia; e Vi (capsulares), responsáveis por proteger a bactéria da imunidade inata do hospedeiro, impedir a opsonização e aumentar a resistência de bactérias à ação do sistema complemento (SILVA 2012). Esse último está presente apenas nos sorotipos Typhi, Paratyphi C e Dublin, que podem ou não expressá-lo. Atualmente existem cerca de 2579 sorotipos de *Salmonella* spp., sendo 99,1% deles pertencente à espécie *S. enterica* (GRIMONT & WEILL 2007). Algumas são espécies específicas, como *S. Gallinarum* para aves, enquanto outras podem infectar vários outros hospedeiros, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (CARVALHO *et al.* 2014). Em 2004 foi proposta uma nova espécie, a *S. subterranea*, isolada em sedimento subterrâneo de solo com baixo pH no Tennessee, EUA, apresentando 96,4% de semelhança com *S. bongori* (SHELOBOLINA *et al.* 2004).

Salmonella spp. é um patógeno oportunista pertencente à microflora dos animais, que pode causar principalmente quadros gastrointestinais ou septicêmicos (HARDT *et al.* 2016). Os animais ainda podem ser portadores assintomáticos, sendo uma importante fonte de infecção, e podem eliminar a bactéria em situações pós-estresse. Essa migra pelo trato gastrointestinal, e pode se aderir a enterócitos e penetrá-los, resistindo à fagocitose e causando uma reação inflamatória. Em alguns casos há diarreia autolimitante com ou sem a presença de sangue, e lise das células. Além disso, a bactéria produz endotoxinas pelos lipopolissacarídeos (LPS), que causam lesões vasculares (ZACHARY 2016).

1.4. Potencial zoonótico dos répteis na transmissão de *Salmonella* spp.

Répteis são reservatórios naturais de *Salmonella* spp., e cerca de 16 e 92% de serpentes podem ser infectadas (CHIODINI & SUNDBERG 1981). As subespécies associadas com a infecção são *salamae*, *arizonae*, *diarizonae* e *houtnae* (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009). É

considerada uma doença zoonótica, possivelmente a mais importante em quelônios em cativeiro (JACOBSON 2007), com transmissão para o homem através de contato direto com fezes ou outras excreções (via de eliminação do agente). Pode estar presente em qualquer superfície em contato com o animal, incluindo o recinto e roupas usadas pelo manipulador (WARWICK *et al.* 2001). Crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos são os mais susceptíveis, com casos nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa de septicemia, meningite e até mortes devido à salmonelose transmitida por répteis (SUSUKI *et al.* 2017; BARANZELLI *et al.* 2017; GAVRILOVICI *et al.* 2017). Com a regulamentação e proibição (no caso de testudines como tigras d'água, cágados e jabutis, com carapaças menores do que 10 cm de comprimento) do comércio de répteis como *pets*, a ocorrência dessa doença tem caído significativamente (COHEN *et al.* 1980).

1.5. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo descrever os aspectos macroscópicos, microscópicos e microbiológicos dos casos de salmonelose em serpentes oriundas de necropsias realizadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV - UFRGS), no período de 2011 até 2018, bem como caracterização imuno-histoquímica para auxílio no diagnóstico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi realizado um levantamento de casos de salmonelose em serpentes, registrados nos protocolos de necropsia e arquivo fotográfico do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), entre janeiro de 2011 a dezembro de 2018. Foram selecionadas as serpentes com diagnóstico final de salmonelose, baseado em achados anatomopatológicos e microbiológicos. Adicionalmente, foram selecionados casos em o diagnóstico morfológico foi compatível com os quadros relatados na infecção por *Salmonella* spp. em serpentes, como enterites, hepatites e septicemias. Os dados levantados a partir dos protocolos de necropsia incluíram espécie, idade (aproximada), sexo, local de origem, história clínica, distribuição das lesões e resultados de cultivo bacteriano e tipificação. As espécies de serpentes foram identificadas pela caracterização morfológica com o auxílio de profissionais.

Após a seleção inicial dos casos, esses foram reavaliados. Para isso, os blocos de parafina foram utilizados para obtenção de cortes com 3 µm de espessura, os quais foram submetidos à coloração de rotina de hematoxilina-eosina (HE). Como nem todos os casos haviam todos os órgãos disponíveis nas lâminas para avaliação histológica, a proporção de casos com lesão em cada órgão foi inferida de acordo com o número de casos em que aquele órgão estava presente, com exceção dos ossos, que são coletados para histologia apenas quando apresentam alterações macroscópicas. Em casos em que havia lesões compatíveis com a salmonelose, mas que não havia isolamento da bactéria, os cortes teciduais com alterações foram submetidos à imuno-histoquímica (IHQ) anti-*Salmonella* spp. A técnica de IHQ consistiu de recuperação antigênica com protease XIV (Sigma[®]), seguida da utilização de anticorpo primário policlonal anti-*Salmonella* spp. (Biogenesis[®]) na diluição de 1:1000 *overnight*. Para amplificação da reação foi utilizado como anticorpo secundário o polímero Mach-4, e como cromógeno, o 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (BiocareMedical[®]). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Meyer.

Casos que não havia o cultivo microbiológico e/ou a marcação positiva na imuno-histoquímica foram excluídos deste estudo.

3. RESULTADOS

3.1. Levantamento e reavaliação dos casos

De janeiro de 2011 a dezembro de 2018 foram realizadas no SPV-UFRGS um total de 51 necropsias de serpentes, sendo o gênero de maior casuística o *Bothrops* sp., com 41 espécimes examinados. Desses, 14 eram *B. pubescens* (27,5%), 11 *B. jararaca* (21,6%), 10 *B. alternatus* (19,6%) e seis *B. neuwiedi* (*B. diporus*) (11,7%).

Foram levantados 10 casos de serpentes com diagnóstico conclusivo ou lesões sugestivas de salmonelose durante o período de 2011-2018 (19,6% da casuística de necropsias de serpentes). Foram encontrados quatro *B. jararaca* (40%), três *B. alternatus* e três *B. pubescens* (30%, cada). A idade das serpentes foi informada em sete dos 10 laudos, e todas eram adultas. Seis eram fêmeas (60%) e quatro eram machos (40%). Sobre os locais de origem desses animais, todos eram oriundos de cativeiro, sendo sete da Fundação Zoobotânica (FZB - Porto Alegre, RS) (70%), e o restante do Centro de Informação Toxicológica (CIT - Porto Alegre, RS), Zoológico de Passo Fundo (Passo Fundo, RS) e Núcleo de Conservação e Reabilitação de Animais Silvestres, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Preservas, UFRGS-Porto Alegre, RS), com um caso de cada instituição. As informações individuais de cada caso, incluindo espécie da serpente, principais lesões e bactéria identificada, se encontram na Tabela 1.

3.2. Lesões macroscópicas

Na necropsia dessas serpentes, as alterações mais frequentes foram magreza excessiva (8/10 - 80%), lesões hepáticas (8/10 - 80%), entéricas (8/10 - 80%), na coluna vertebral (1/10 - 10%) e coração (1/10 - 10%). As alterações hepáticas constituíam-se de áreas puntiformes (Fig. 1A) e grandes áreas branco-amareladas de até 12 cm de diâmetro, por vezes com conteúdo caseoso ao centro (Fig. 1B-C). No intestino delgado e grosso a mucosa estava difusamente avermelhada e havia nódulos amarelados de 0,5 cm em média (Fig. 1D), além de deposição de fibrina e placas amareladas multifocais (Fig. 1E). Na coluna vertebral da serpente 01 foram observados nódulos branco-amarelados de 1 - 4 mm de diâmetro, que envolviam os corpos vertebrais, discos intervertebrais, costelas e musculatura adjacente (Fig. 1F). O epicárdio da serpente 6 estava moderadamente espessado e com deposição de material fibrilar amarelado (fibrina).

Tabela 1: Casos de infecção por *Salmonella* spp. no período de 2011-2018 diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.

Caso	Espécie	Diagnóstico morfológico	Bacteriologia	IHQ¹
1	<i>B. alternatus</i>	Osteomielite fibrino-heterofílica	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	NR*
2	<i>B. jararaca</i>	Hepatite fibrinonecrótica; Miocardite necrótica e heterofílica	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	NR
3	<i>B. pubescens</i>	Hepatite granulomatosa; Enterite fibrinonecrótica e granulomatosa; Pancreatite granulomatosa	NR	+ (intestino)
4	<i>B. jararaca</i>	Hepatite fibrinonecrótica e granulomatosa; Colite fibrinonecrótica	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	NR
5	<i>B. pubescens</i>	Hepatite fibrinonecrótica e granulomatosa; Enterocolite fibrinonecrótica	NR	+ (intestino, fígado)
6	<i>B. jararaca</i>	Pericardite fibrinosa e piogranulomatosa; Enterocolite fibrinonecrótica e granulomatosa	NR	+ (pericárdio)
7	<i>B. pubescens</i>	Encefalite heterofílica focal; Colite fibrinonecrótica; Miocardite necrótica e heterofílica; Hepatite fibrinonecrótica e granulomatosa	NR	+ (intestino)
8	<i>B. jararaca</i>	Hepatite fibrinonecrótica; Esplenite granulomatosa; Enterite fibrinonecrótica	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	+ (intestino)
9	<i>B. alternatus</i>	Hepatite fibrinonecrótica; Pancreatite fibrinonecrótica; Enterocolite fibrinonecrótica	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	NR
10	<i>B. alternatus</i>	Hepatite fibrinonecrótica; Enterocolite fibrinonecrótica	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	NR

1: Imuno-histoquímica. *NR: não realizada, +: imunomarcagem positiva.

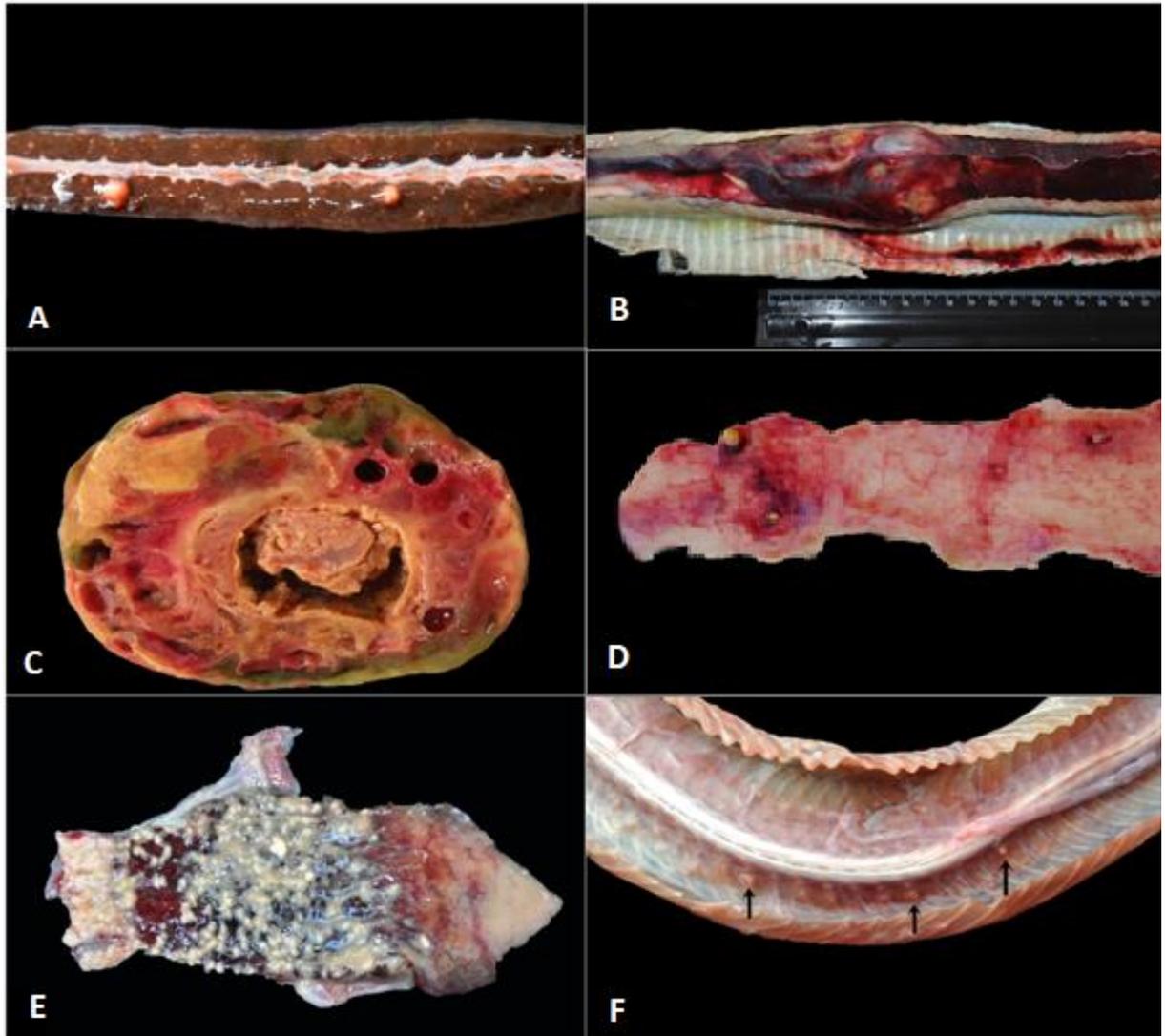


Figura 1: Lesões macroscópicas de salmonelose em serpentes. **A.** Fígado da serpente 4 com nódulos amarelados multifocais, variando de 0,2 a 1 cm de diâmetro. **B.** Fígado aumentado de volume da serpente 2, com massa de aproximadamente 12x8 cm, amarelada e com áreas avermelhadas. **C.** Fígado da mesma serpente da figura 2. Ao corte nota-se evidenciação de múltiplas cavitações preenchidas por cáseos e fibrina. **D.** Intestino grosso da serpente 7 com mucosa hiperêmica e com nódulos amarelados multifocais na mucosa. **E.** Intestino grosso da serpente 10 com mucosa difusamente avermelhada e placas amareladas multifocais a coalescentes sobre a mucosa. **F.** Coluna vertebral e costelas da serpente 1 com vários nódulos branco-amarelados, medindo 1 - 4 mm de diâmetro (setas).

3.3. Lesões microscópicas

Na avaliação histológica, as lesões foram observadas no fígado (8/9 - 88%), intestinos delgado e grosso (8/9 - 88%), coração (3/10 - 30%), pâncreas (2/5 - 40%), coluna vertebral, cérebro (1/5 - 20%) e baço (1/6 - 16%). As lesões hepáticas apresentavam dois padrões distintos, que frequentemente foram observados concomitantemente. O primeiro padrão foi visualizado em 7/9 (77%) serpentes, e era caracterizado por áreas multifocais a coalescentes de necrose de coagulação, associadas a deposição de fibrina e infiltrado inflamatório misto de

heterófilos, linfócitos e plasmócitos discreto a acentuado (Fig. 2A). O segundo padrão era caracterizado pela formação de granulomas compostos por uma área central de necrose caseosa, circundada por infiltrado de macrófagos, células gigantes multinucleadas e discreta proliferação de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 2B). Esse padrão foi observado em 4/9 serpentes (44%) e, em três delas, era concomitante ao primeiro padrão. Em ambos os padrões observaram-se agregados bacterianos bacilares intralesionais. Outras alterações hepáticas secundárias, como degeneração gordurosa e colestase também foram frequentes.

As lesões de intestino delgado e grosso também apresentaram dois padrões distintos; o primeiro padrão, visto em 8/9 serpentes (88%), era caracterizado por áreas multifocais de necrose da mucosa, com deposição de fibrina, infiltrado inflamatório composto predominantemente de heterófilos, hemorragia e trombose em submucosa (enterite e colite fibrinonecróticas; Fig. 2C). O segundo padrão, observado em 2/9 serpentes (22%), correspondeu à formação de granulomas na mucosa e submucosa, semelhantes aos descritos no fígado. As lesões cardíacas observadas foram miocardite necrótica e heterofílica multifocal (2/10; 20%) e um caso com pericardite fibrinosa e piogranulomatosa difusa (1/10; 10%; Fig. 2D). Na avaliação do pâncreas, foi observado um caso de pancreatite fibrinonecrótica multifocal moderada (1/5; 20%) e outro de pancreatite granulomatosa multifocal discreta (1/5; 20%). Outras lesões observadas em uma única oportunidade cada foram osteomielitefibrinoheterofílica multifocal moderada (1/10; 10%), encefalite heterofílica focal (1/5; 20%) e esplenite granulomatosa difusa acentuada (1/6; 16%).

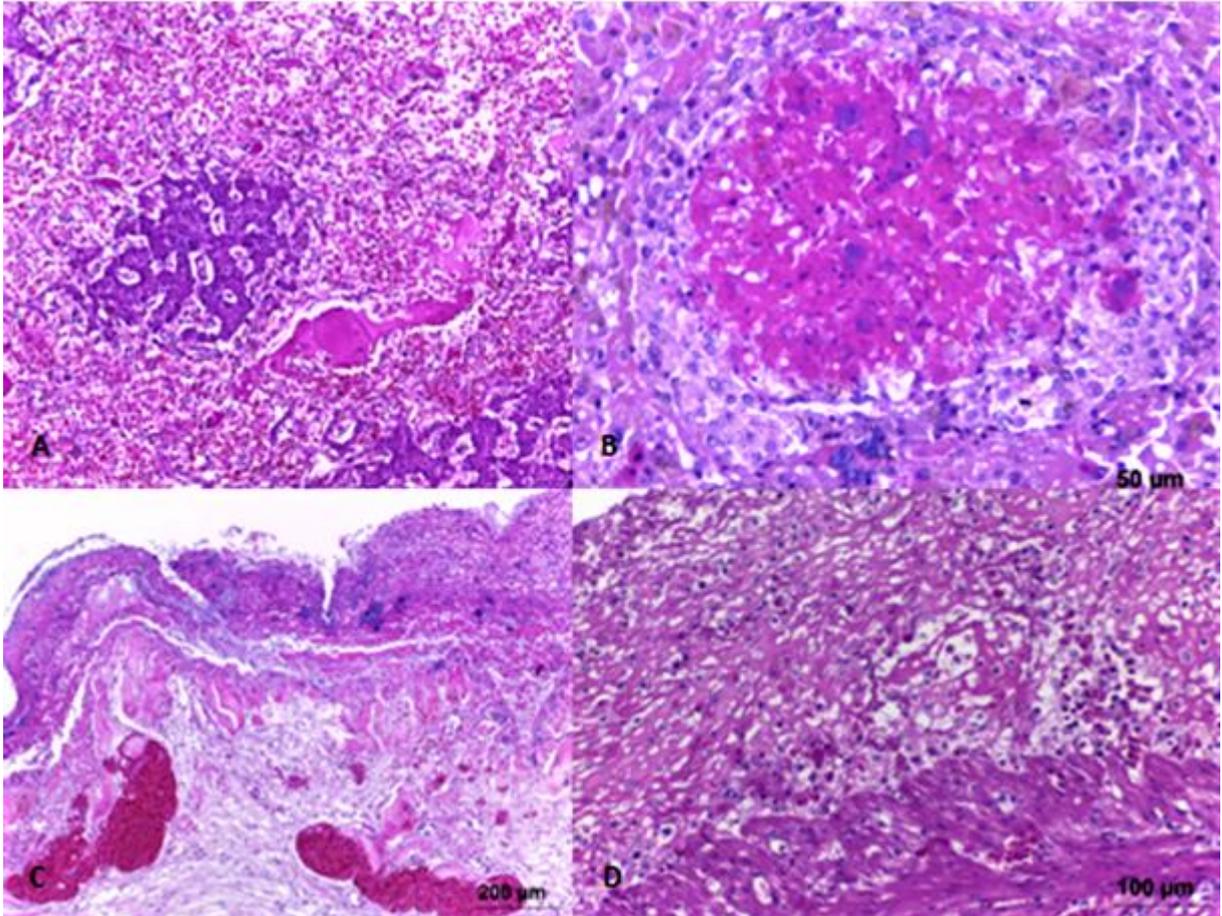
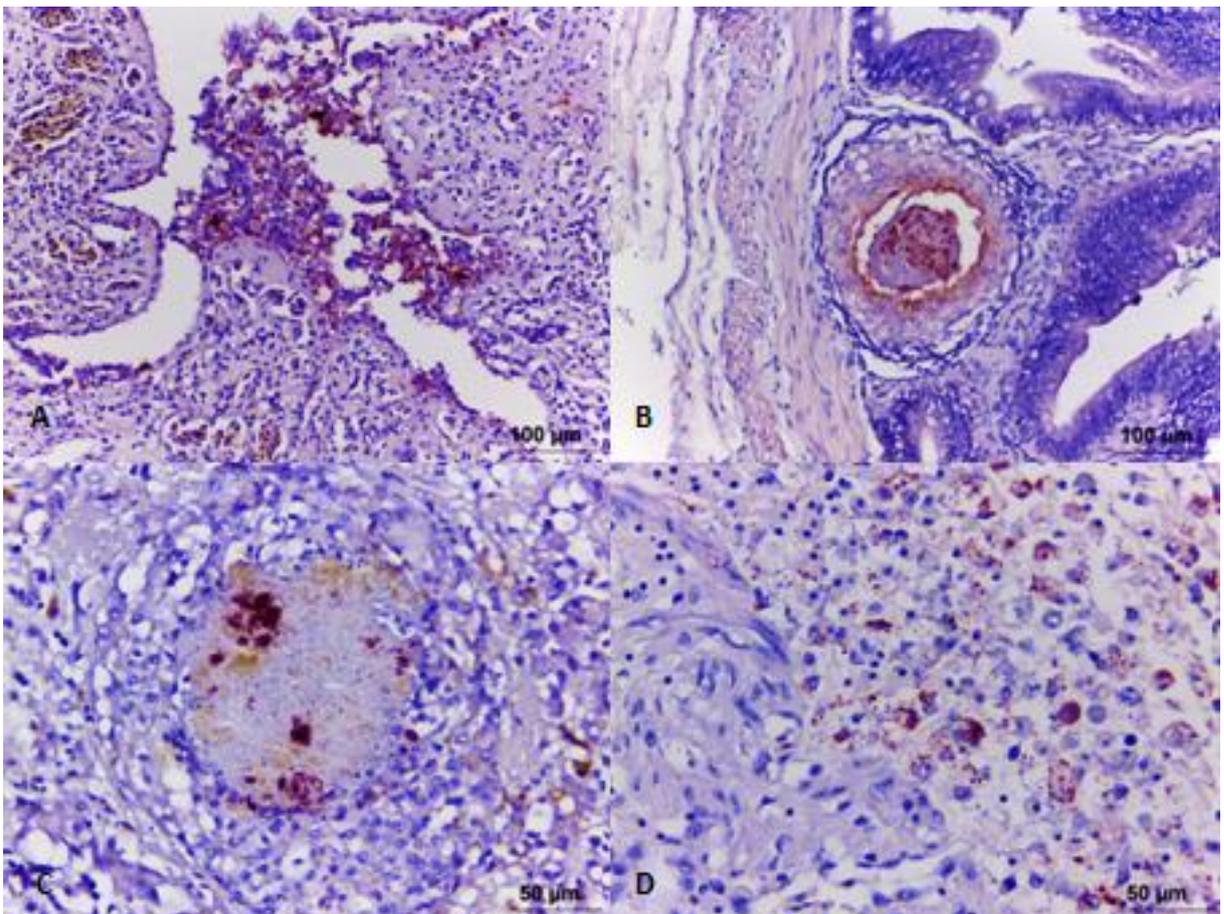
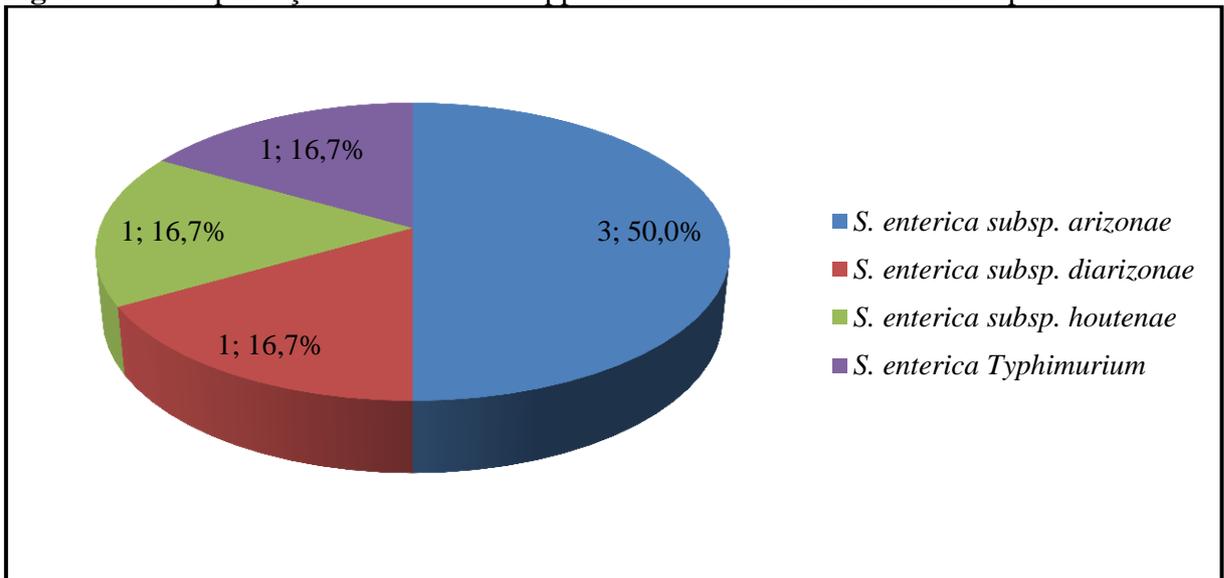


Figura 2: Lesões microscópicas de salmonelose em serpentes. **A.** Fígado da serpente 2: nota-se necrose de coagulação multifocal acentuada com exsudação de fibrina e discreto infiltrado inflamatório misto (Hematoxilina-Eosina [HE] 100x). **B.** Fígado da serpente 4 com área nodular com necrose caseosa e agregados bacterianos ao centro, circundados por infiltrado de macrófagos (granuloma) (HE, 400x). **C.** Intestino delgado da serpente 10 com necrose difusa da mucosa, associada a deposição de fibrina, infiltrado de heterófilos, linfócitos e plasmócitos e agregados bacterianos. Há também trombose multifocal predominantemente em submucosa (HE 100x). **D.** Coração com epicárdio da serpente 6 acentuadamente espessado por deposição de fibrina e infiltrado de heterófilos e macrófagos (HE 200x).

3.4. Microbiologia, sorotipificação e imuno-histoquímica

No presente estudo, em 60% dos casos havia informação nos protocolos de necropsia sobre cultivo bacteriológico e sorotipificação. Desses, a subespécie de maior frequência foi a *S. enterica* subsp. *arizonae* (3/6 - 50%), seguida pelas subespécies *diarizonae*, *houtenae* e pelo sorovar Typhimurium (1/6 -16,7% cada; Fig. 3). Nos casos sem isolamento, houve imunomarcagem de *Salmonella* spp. no intestino (3/4; Fig. 4A-B), fígado (1/4; Fig. 4C) e coração (1/4; Fig. 4D).

Figura 3: Sorotipificação de *Salmonella* spp. em casos de salmonelose em serpentes.



Figuras 4: Caracterização imuno-histoquímica de salmonelose em serpentes. **A - B.** Intestinos das serpentes 4 e 5 com imunomarcações nas áreas de necrose da mucosa e no centro de granuloma na mucosa, respectivamente (200x). **C.** Fígado da serpente 4 com granuloma demonstrando imunomarcações anti-*Salmonella* spp. ao centro (400x). **D.** Coração da serpente 6 com imunomarcações anti-*Salmonella* spp. em pericárdio, com evidência de bacilos no interior de macrófagos e heterófilos (400x).

4. DISCUSSÃO

Todas as serpentes deste estudo eram oriundas de cativeiro e presume-se que situações estressantes tenham sido frequentes, sejam por captura, mudança de recinto, mudança brusca na dieta e doenças imunodepressoras anteriores. A maior parte dos relatos de salmonelose em répteis advém de animais em cativeiro, mas a ocorrência da doença em animais de vida livre também é possível (LUKAC *et al.* 2015; PEDERSEN 2009).

Salmonella spp é um micro-organismo normal da microbiota intestinal, com 90% ou mais dos répteis sendo carreadores (WARWICK 2001). Porém constitui-se uma importante causa de morte em serpentes e, neste estudo, correspondeu a 19,6% da casuística de necropsias de serpentes em oito anos de estudo. Dependendo da homeostase do organismo do animal e das condições de manejo, ambiência e alimentação, o réptil pode viver o resto de sua vida sem manifestar a doença e em excretar a bactéria. Entretanto, pode ocorrer crescimento exacerbado da bactéria, culminando em lesões entericas e disseminação hematogena da bactéria, que ocasionaria lesões sistêmicos (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009; ZACHARY 2016; HARDT *et al.* 2016).

O número de casos de salmonelose em fêmeas foi maior quando comparado ao de casos em machos (60% fêmeas e 40% machos), mas não se pode afirmar que existe uma predileção sexual (BASTOS 2012). Houve um aumento de casos de salmonelose em serpentes no ano de 2015 (5/10 - 50%), e desses casos, quatro serpentes eram provenientes do mesmo local (Fundação Zoobotânica - FZB), indicando um possível surto, embora o cultivo da bactéria só tenha sido realizado em um caso. Casos oriundos da FZB foram os mais frequentes (70%), demonstrando a importância dessa fundação no aprimoramento dos estudos clínicos na medicina veterinária de silvestres.

As principais alterações patológicas observadas nos casos deste estudo foram a condição corporal ruim, hepatite e enterocolite fibrinonecróticas, além de granulomas, principalmente no fígado e intestinos. Essas alterações são comumente descritas na literatura (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009; BASTOS 2012; CLANCY *et al.* 2016; HARDT *et al.* 2016). Lesões como osteomielites e pericardites também foram encontradas e não são comuns nos casos da doença em serpentes (FORNAZARI & TEIXEIRA 2009; BASTOS 2012; DE SOUZA *et al.* 2014; CLANCY 2016). A imuno-histoquímica mostrou-se uma ferramenta importante para confirmação do diagnóstico em casos em que há lesões características, mas não há isolamento bacteriano.

No presente estudo, a subespecie *arizonae* foi o isolado mais frequente, seguida pela *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* Typhimurium. Dados

semelhantes são descritos por Warwick *et al.* (2001) e Bastos (2012), que relatam as subespécies *arizonae* e *diarizonae* como as mais comuns. Sobre a subespécie *diarizonae*, estudos mostram uma alta prevalência desse sorotipo (SCHRÖTER *et al.* 2004), com um relato de caso onde 92,8% dos isolados em espécimes de *B. jararaca* adultas sadias correspondiam a essa subespécie (BASTOS *et al.* 2008). A subespécie *houtenae* também é um isolado comum em répteis de cativeiro (LUKAC *et al.* 2015; PEDERSEN 2009). Estudos com serpentes de vida livre, nos quais se investigaram os isolados encontrados em *swabs* cloacais ou amostras de intestino, demonstraram uma grande prevalência de positividade por *Salmonella* spp., em especial da subespécie *diarizonae* (ZAJAC *et al.* 2016).

No estudo de Whitten e colaboradores (2015), foi feito um levantamento de casos de salmonelose humana associada a répteis nos anos de 1996 até 2011. Foi constatada a presença de várias subespécies e sorotipos em um mesmo período de surto, com maior prevalência da subespécie *enterica*. Houve casos também com as subespécies *houtenae*, *arizonae* e *diarizonae*. No estudo de RAMOS e colaboradores (2019), realizou-se *swabs* cloacais em diversas espécies de reptéis, incluindo serpentes, e 50% dos isolados de *S. enterica* correspondiam a essas três subespécies. Todas essas subespécies e sorotipos foram encontrados neste presente estudo.

A ausência de alguns órgãos para avaliação histológica, assim como a não realização de cultivo bacteriano em alguns dos casos foram limitações neste estudo. A ausência de dados ou materiais são comuns em estudos retrospectivos realizados a partir do arquivo de laboratórios de diagnóstico.

Neste trabalho demonstrou-se a variabilidade de lesões e sorotipos envolvidos em casos de salmonelose em serpentes de cativeiro. As informações geradas destacam a ocorrência e apresentação clínica e patológica dessa enfermidade, o que contribui para a suspeita da doença por parte de responsáveis por criatórios, médicos veterinários clínicos de animais silvestres e também aqueles que trabalham com diagnóstico anatomopatológico e bacteriológico.

5. CONCLUSÃO

A salmonelose mostrou-se uma doença frequente de serpentes adultos do gênero *Bothrops* criadas em cativeiro no Rio Grande do Sul, Brasil. As principais lesões observadas foram hepatites e enterocolites fibrinonecróticas e/ou granulomatosas. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* foi a subsespécie mais frequente neste estudo. A imuno-histoquímica foi uma ferramenta importante para confirmação do diagnóstico em casos suspeitos mas sem isolamento do agente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C.F.S., SILVA, O.A., GOODY, P. & MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. Jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 877-885, 1985.
- BARANZELLI, A. *et al.* The snake raiser lung: An unusual cause of *Salmonella enterica* subspecies *arizonae* pneumonia. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 47, n. 6, oct., p. 424 - 425. 2017
- BASTOS, H.M *et al.* Prevalence of Enterobacteria in *Bothrops jararaca* in São Paulo State: Microbiological Survey and Antimicrobial Resistance Standards. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 30, n. 3, out., p. 321 - 326. 2008.
- BASTOS, H.M. Salmonella Associated with Snakes (Suborder Serpentes). In: Annous B & Gurtler J. **Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies**. 1ª ed., Rijeka: InTech. 2012. cap. 4, p. 81-99.
- BLANCO, B.S. & MELO, M.M. Animais peçonhentos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 75, p. 1-77, 2014.
- BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed., Brasília, 2009. p 787 - 792.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilancia em Saúde. Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de Salmonella spp.:** Diagnóstico Laboratorial do gênero *Salmonella* spp. Brasília, 2011. p 9.
- CARVALHO, V.M. Colibacilose e Salmonelose. In: CUBAS, Z.A., SILVA, J.C.R. & CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. 2ª ed., São Paulo: Roca. 2014. cap. 69, p 1394 - 1396.
- CHIODINI, R.J & SUNDBERG, J.P. Salmonellosis in Reptiles: a Review. **American Journal of Epidemiology**. v. 113, n. 5, may, p. 494 - 499. 1981.
- CLANCY, M.M., NEWTON, A.L. & SYKES, J.M. Management of Osteomyelitis Caused by *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* in a Taylor Cantil (*Agkistrodon bilineatus taylori*) Using Amikacin Delivered via Osmotic Pump. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 47, n. 2, jun., p. 691 - 694. 2016.
- COHEN, M.L. *et al.* Turtle-Associated Salmonellosis in the United States. **JAMA**. v. 243, n 12, mar., p. 1247 - 1249. 1980.
- DA SILVA, R.L. **Sistemas de Liberação Controlada de Quitosana Contendo Antígeno Capsular Vi de Salmonella spp.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará. Belém, 2012.
- DE SOUZA, S O. *et al.* Osteomyelitis caused by *Salmonella enteric* serovar Derby in *Boa constrictor*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 45, n. 3, set., p. 642-644. 2014.
- Doenças comuns que atingem répteis. **Melhores Amigos**, SD. Disponível em: <http://portalmelhoresamigos.com.br/doencas-comuns-que-atingem-repteis/>. Acesso em: 27 de nov. de 2019.
- DOS SANTOS, G.O & GALLI, G.R.O. Afecções que acometem serpentes cativas mais frequentemente. **Conexão Eletrônica**. v. 14, n. 1, p. 1748 - 1757. 2018.

FORNAZARI, F & TEIXEIRA, C.R. Salmonelose em Repteis: Aspectos epidemiológicos, clínicos e zoonóticos. **Veterinária e Zootecnia**. v. 16, n. 1, mar., p. 19 - 25, 2009.

GAVRILOVICI, C *et al.* "Message from a turtle": otitis with *Salmonella arizonae* in children: Case report. **Medicine**. v. 96, n. 44, nov., p. 1 - 5.2017.

GRIMONT, P.A.D. & WEILL, F.X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars**. 9th ed. Paris: Institut Pasteur, 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. France, 2007.p 13.

HARDT, I. *et al.* Doença do Corpúsculo de Inclusão e Espondilite por *Salmonella* sp. em uma *Boa constrictor constrictor*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 37, n. 9, set., p. 984 - 990, 2017.

JACOBSON, E.R. Bacterial Diseases of Reptiles. **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text**. 1^a ed., Boca Raton: CRC Press. 2007. cap. 10, p 461 - 526.

LUKAC, M., PEDERSEN, K., & PRUKNER-RADOVCIC, E. Prevalence of *Salmonella* in Captive Reptiles from Croatia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 46, n. 2, jun., p. 234 - 240, 2015.

MOREIRA, N.M. **Métodos de Tipificação de *Salmonella* sp.** 2012. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2012.

NOGUEIRA, R.M.B. Lagartas e serpentes. In: NOGUEIRA, R.M.B; ANDRADE, S.F. **Manual de Toxicologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2011.p. 295-315.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 998-1011, 2009.

Pedersen, K. *et al.* Serovars of Salmonella from captive reptiles. **Zoonoses and Public Health**. v. 56, n. 5, jun., p. 238 - 242. 2009.

RAMOS, C.P. *et al.* Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. **Bio Med Research International**. v. 2019, n. 49, maio, p. 1 - 9. 2019.

SHELOBOLINA, E.S. *et al.* Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranean* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 5, may, p. 2959 - 2965. 2004.

SCHRÖTER, M. *et al.* Pet Snakes as a Reservoir for *Salmonella enteric* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a Prospective Study. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 1, jan., p. 613 - 615. 2004.

SUSUKI, A. *et al.* Purulent Pericarditis with *Salmonella enterica* subspecies *arizonae* in a Patient with Type 2 Diabetes Mellitus. **Internal Medicine**. v. 56, n. 16, aug., p. 2171 - 2174. 2017.

TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D. & GOERING, R.V. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **SHEA Position Paper**. v. 18, n. 6, jun., p. 429. 1997.

TOKARNIA, C.H. & PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de morte de bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.

WARWICK, C. *et al.* Reptile-related Salmonellosis. **Journal of the Royal Society of Medicine.** v. 94, mar., p 124 - 126. 2001.

WHITTEN, T. *et al.* Reptile-Associated Salmonellosis in Minnesota, 1996–2011. **Zoonoses and Public Health.** v. 62, n. 3, may, p. 199 - 208. 2015.

ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult.** 6^a ed., St. Louis: Elsevier. 2016. cap.4, p 159 - 160.

ZAJĄC, M. *et al.* Free-living snakes as a source and possible vector of *Salmonella* spp. and parasites. **European Journal of Wildlife Research.** v. 62, n. 2, abr., p. 161 - 166. 2016.