

## OCORRÊNCIA DE *Salmonella* sp. NA CLOACA DE RÉPTEIS DE COMPANHIA

OCCURRENCE OF *Salmonella* sp. IN THE CLOACA OF COMPANY REPTILES

Lais da Silveira Rosina<sup>1</sup>; Luíz Paulo Luzes Fedullo<sup>2</sup>; Cecília Riscado Pombo<sup>2</sup>; Alfredo Artur Pinheiro Junior<sup>2</sup>; Alcides Pissinatti<sup>2</sup>

### RESUMO

Cobras, tartarugas e lagartos estão cada vez mais próximos dos humanos, pois estão sendo mais procurados para serem criados como animais de companhia. Esses animais possuem uma série de microrganismos em sua microbiota, entre eles a *Salmonella* sp. A *Salmonella* é uma bactéria da família das Enterobactérias e é uma das principais responsáveis por surtos de toxi-infecções alimentares, e por isso muito importante para a saúde pública. Neste trabalho foi avaliada a ocorrência de *Salmonella* sp. em répteis criados como animais de estimação em atendimentos na Clínica Escola do UNIFESO. Para a obtenção das amostras foi realizada a confecção de um swab com uma haste de nylon, menos que o convencional para proporcionar conforto aos animais. No total foram coletadas 20 amostras, sendo 8 jabutis, da espécie *Chelonoidis carbonaria* e 12 serpentes da espécie *Pantherophis guttatus*. Dos meios de cultura utilizados aqueles que melhor isolaram essa bactéria foram o MacConckey e o *Salmonella-Shigella*. No TSI, 10% se mostraram suspeitas. Esse resultado mostra a importância da higiene das mãos após o contato direto e indireto com esses animais a fim de prevenir os riscos de contaminação.

**Palavras Chave:** Répteis. *Salmonella*. Microrganismos.

### ABSTRACT

Since snakes, turtles and lizards have become companion animals, they are closer than ever in contact with humans. These animals have microorganisms like *Salmonella* sp in their microbiota. *Salmonella* is a bacteria in Enterobacterias family which is a major concern for public health as it is a major cause of outbreaks of food poisoning. In this work, reptiles raised as pets in attendance at the UNIFESO School Clinic were tested for the occurrence of *Salmonella* sp.. In order to insurance the comfort of the animal, a smaller swab was made with a nylon rod. In total, 20 samples were collected, 8 jabutis of the species *Chelonoidis carbonaria* and 12 snakes of the species *Pantherophis guttatus*. Out of the culture medias used, the best at isolating this bacterium were MacConckey and *Salmonella-Shigella*. At TSI, 10% were suspicious. The results show the importance of hand hygiene after direct and indirect contact with these animals in order to prevent the risks of contamination.

**Keywords:** Reptiles, Salmonellae. Microorganisms

### INTRODUÇÃO:

A classe Reptilia é representada por quatro ordens: Chelonia, Squamata, Crocodylia e Rhynchocephalia (1) compreendendo mais de 7780 espécies (2). Os primeiros répteis apareceram a cerca de 300 milhões de anos, na Era Paleozoica (3). As salmonelas pertencem a um gênero de bactérias Gram-negativas altamente diverso (4) que contém mais de 2600 sorovares (4,5) e causa a salmonelose, uma doença infecto-contagiosa, mundialmente difundida que acomete várias espécies de animais domésticos, selvagens e o homem. O reservatório para o gênero *Salmonella* é o trato gastrointestinal de animais de sangue quente e frio. As fontes de infecção incluem solo

contaminado, vegetação, água e componentes de alimentos para animais (como ossos, carne e farinha de peixe), particularmente aqueles que contêm constituintes derivados de leite, carne ou ovo e as fezes de animais infectados (6). A salmonelose pode ocorrer quando a bactéria invade tecidos extra-entericos, geralmente em casos imunossupressão. O stress é a principal causa do problema em répteis de estimação, como consequência de problemas de manejo como: alimentação inadequada, temperatura ambiental muito baixa, espaço restrito, desidratação, excesso de animais no recinto, transporte prolongado, administração excessiva e/ou prolongada de drogas imunossupressoras, entre outros (7). A quantidade de répteis criados como animais de estimação aumentou

<sup>1</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária do UNIFESO – [laisrosi@gmail.com](mailto:laisrosi@gmail.com)

<sup>2</sup> Docente do curso de Medicina Veterinária do UNIFESO – [luizpaulofedullo@unifeso.edu.br](mailto:luizpaulofedullo@unifeso.edu.br)

e conseqüentemente o risco de infecções transmitidas por estes animais também cresceu. De acordo com Harris e colaboradores (8), a salmonelose em humanos associada à tartarugas foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos em 1963, embora tenha sido relatado na Grã-Bretanha mais de 10 anos antes. Humanos podem infectar-se com *Salmonella* por contato direto e/ou indireto com fezes de répteis; foi demonstrado que simplesmente ter um réptil no ambiente familiar aumenta o risco de infecção (9). Infecções por *Salmonella* associadas a répteis são mais prováveis a desencadear doença invasiva (10), mais comumente leva a hospitalização (11) e com maior frequência envolvem bebês (9) do que outras infecções por *Salmonella* (10). A salmonelose dos animais pode ser controlada através de estrita atenção aos protocolos para reduzir a propagação de qualquer agente contagioso que possa ser encontrado nas fezes a hospedeiros suscetíveis (6). Tratar infecções por *Salmonella* sp. ou não gera polêmicas, pois a ocorrência de resistência aos antimicrobianos é comum (12). Além do mais, o tratamento pode somente evitar a excreção das salmonelas no ambiente, e não a eliminar do animal, dificultando a avaliação da eficácia do tratamento (13). Portanto, se um animal positivo para *Salmonella* sp. não apresentar sinais clínicos, o tratamento não é justificado (7,12). Recomenda-se a utilização de antimicrobianos somente nos casos de doença ativa (14). Os dados sobre a transmissão de doenças entre pessoas e répteis são escassos no Brasil, ao contrário do que ocorre em países desenvolvidos como os Estados Unidos, que possuem sistemas eficientes de notificação de doenças infecciosas (14).

### OBJETIVOS:

Este trabalho objetivou verificar a ocorrência de *Salmonella* sp. em répteis criados como pet, em função do aumento do número de animais criados como tal, bem como o risco que pode submeter a população humana a contaminação por salmonela.

### METODOLOGIA:

Este trabalho dispensa a aprovação da CEUA, de acordo com o deliberado na contextualização do anexo da Resolução Normativa nº 22 (25/6/2-15) do CONCEA.

Coleta das Amostras: Os animais utilizados neste experimento são criados como pet, no momento da coleta estavam saudáveis e não apresentavam sinais de quaisquer enfermidades, sejam elas parasitárias ou infectocontagiosas. No total, foram coletadas 20

amostras, sendo 8 jabutis, todos da espécie *Chelonoidis carbonaria* e 12 serpentes da espécie *Pantherophis guttatus*. As coletas foram realizadas nos dias 08/06/2019, 10/06/2019 e 02/07/2019, na Clínica Escola do UNIFESO, após passarem por um atendimento clínico. Esta coleta foi realizada com o auxílio de um *swab* de produção própria. Depois de esterilizado o *swab* foi introduzido por via cloacal, mantido e rotacionado dentro da cloaca do animal por aproximadamente trinta segundos, imediatamente acondicionados em meio de transporte *Stuart*, sob refrigeração e analisadas no laboratório de Microbiologia Veterinária da própria instituição.

Confecção dos Swabs: Estes swabs foram confeccionados para garantir melhor conforto para os animais na hora da coleta, já que a anatomia deles não proporciona um bom uso de swabs convencionais, mais ainda quando esses são filhotes. As hastes são flexíveis e de nylon (Figura 1 A). Foram obtidas através de uma vassoura comprada exclusivamente para esse fim. Depois de cortadas, as hastes foram passadas no bico de Bunsen a fim de formar um pequeno abaulamento em uma das extremidades (Figura 1 B), com o objetivo prender o algodão (Figura 2). A quantidade de algodão foi ajustada conforme a necessidade, e este foi utilizado apenas para cobrir a terminação. Antes de realizar a coleta foi necessário agrupá-los de três em três, em envelopes esterilizáveis para que possam passar por esse processo na autoclave (Figura 3). A esterilização ocorreu em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos.

Isolamento e Identificação das Bactérias: Para favorecer o crescimento *Salmonella* sp. as amostras foram incubadas em caldo Tetrionato enriquecido com 1,5ml de solução de verde brilhante a 0,1% e com 3ml de iodo-iodeto de potássio. Esta mistura modificou a coloração do caldo TT, originando um caldo de coloração turquesa. O objetivo de realizar esta preparação é fazer um enriquecimento seletivo. Depois de adicionados o iodo-iodeto de potássio e a solução de verde brilhante ao caldo tetrionato, o mesmo foi separado em tubos contendo 5ml da solução em cada. Cada tubo foi identificado e os *swabs* com as amostras foram inseridos nos tubos e ficaram na estufa a 37°C por 24 horas. Após a incubação as amostras foram semeadas em placas com ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar Xilose Lisina Desoxilato (XLD), e ágar MacConkey (MC), pelo método do esgotamento depois incubadas em estufa bacteriológica a 37±1°C por 18 a 24 horas. Após esse período, as placas com crescimento de colônias mistas, que também apresentaram colônias sugestivas de *Salmonella* sp. foram repicadas nos mesmos ágares

para um melhor isolamento. Quanto a testes bioquímicos, as colônias suspeitas foram inoculadas em tubos contendo ágar Triple Sugar Iron (TSI) inclinado. A semeadura ocorreu com o auxílio de uma agulha bacteriológica, a colônia é introduzida até a profundidade do ágar, furando o centro da gelosa e depois a amostra é estriada na superfície inclinada. Os tubos foram identificados e permaneceram na estufa a 37°C por 24h.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Neste estudo, não foi utilizado meio de pré-enriquecimento pois não haviam condições desfavoráveis ao crescimento de *Salmonella* spp. no momento da coleta. Esta ação também se justifica pelo fato de que de acordo com Siebeling, Neal e Granberry (15) o pré-enriquecimento com caldo de lactose antes do enriquecimento em caldo tetrionato reduz a recuperação de *Salmonella* de tartarugas. Porém Mitchell e Shane (16), inferem que, a água peptonada quando utilizada como meio de pré enriquecimento permite aumentar a possibilidade de recuperação de bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* sp. que estiveram submetidas a condições menos favoráveis no período após a coleta. O meio de enriquecimento escolhido foi o caldo tetrionato com adição de verde brilhante e iodo-iodeto de potássio, das 20 amostras que foram coletadas, apenas 10% não apresentaram crescimento. Siebeling, Neal e Granberry (15), descreveram que existem 4 meios recomendados para o isolamento de *Salmonella* sp. que são, o caldo tetrionato com ou sem verde brilhante, caldo semissólido Rappaport-Vassiliadis modificado e caldo Selenito. Freschi, Carvalho e Oliveira (17) corroborados por Paiva e colaboradores (18) afirmam que escolher o melhor caldo para identificação ou recuperação de *Salmonella* de amostras de fezes muitas vezes é difícil devido, principalmente, devido à falta de resultados conclusivos a esse respeito o que ficou claro neste trabalho pois os resultados obtidos não estão de acordo com aqueles até então publicados. O caldo de enriquecimento deve ser selecionado então com base nas subespécies de *Salmonella* a serem identificadas, já que cada um possui sua respectiva limitação. De acordo com Mitchell e Shane (16) o caldo tetrionato pode inibir a multiplicação de certos sorotipos de *Salmonella* se a quantidade de bactérias na amostra for muito pequena, já Smith (1952) afirma que o Selenito F é tóxico para alguns sorotipos, como por exemplo a *Salmonella* Choleraesuis, e ainda, que o Rappaport não permite uma boa recuperação de salmonelas do subgrupo III. Desta forma, Mitchell e Shane (16) disseram que para aumentar as chances

de recuperação da bactéria a utilização paralela de 2 caldos de enriquecimento é o mais recomendado. Cada uma das 18 amostras que restaram foram plaqueadas em ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD), Salmonella-Shigella (SS) e MacConkey (MC) simultaneamente. As amostras que apresentaram crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp. de acordo com o meio de cultura utilizado, estão demonstradas na Tabela 1. É possível inferir que 16 amostras (80%), tiveram crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp. em pelo menos um dos três ágar utilizados e que 25% das amostras apresentaram este comportamento em todos eles. Nascimento e colaboradores (19), constataram que os meios de plaqueamento, sem distinção são eficientes para o isolamento de *Salmonella* quando as amostras testadas contêm alta concentração da bactéria, mas conforme a quantidade de patógenos na alíquota diminui as diferenças estatísticas dos meios começam a se acentuar. No presente trabalho essa informação foi corroborada, já que o crescimento em todos os ágar foi semelhante. Neste trabalho 40% das amostras semeadas em ágar XLD formaram colônias com características fenotípicas do gênero *Salmonella* (Tabela 2). Quinn e colaboradores (20) descrevem estas colônias típicas como sendo vermelhas (reação alcalina) com centros pretos devido à produção de H<sub>2</sub>S. Mitchell e Shane (16), classificam o XLD, no isolamento de *Salmonella* sp., como um ágar de seletividade média a alta, assim como o *Xylose-Lysine Tergitol 4* (XLT4), Rambach e Salmonella-Shigella ágar. Aqui este resultado não se confirmou, já que foi o emprego deste ágar resultou na menor taxa de recuperação. No ágar MacConkey, 50% das amostras tiveram crescimento de colônias típicas, (Tabela 2) ou seja, de acordo com Quinn e colaboradores (20), transparentes. McVey, Kennedy e Chengappa (6) observaram que este ágar é descrito como útil para realizar isolamentos de bactérias entéricas, como é o caso da *Salmonella*. Esses dados coincidem com os resultados obtidos no presente estudo, pois o ágar MacConkey, se mostrou superior ao XLD. Já Flowers e colaboradores (21), relataram em seus estudos que o ágar MC é considerado o meio que oferece menor chance de isolar *Salmonella*, não sendo corroborado pelo presente trabalho. O ágar SS foi responsável por 50% dos isolamentos no presente trabalho (Tabela 2), concordando com a literatura já que nos estudos de Cox e colaboradores (22), este ágar foi superior aos demais no número de amostras confirmadas. Mitchell e Shane (16), classificam este ágar como sendo de média a alta seletividade para *Salmonella* sp. e Littell (23) cita que as colônias típicas de *Salmonella* sp. neste ágar são beges com ou sem o

centro negro. Nos seus estudos, Quinn e colaboradores (20) afirmam que a maioria das espécies de *Salmonella* quando inoculadas em ágar TSI formam o seguinte padrão: rampa vermelha, com fundo amarelo e produção de  $H_2S$ . A Figura 4 demonstra este padrão e, através dele é que foi constatada o comportamento bioquímico típico das Salmonelas no presente trabalho. Sendo assim foi identificado que 20% das amostras analisadas apresentaram comportamento típico no TSI. Contudo, este valor percentual de isolamentos é considerado baixo, pois Chiodini e Sundberg (13) estimam uma prevalência de 83 a 93% desta bactéria nos répteis, dependendo do mé-

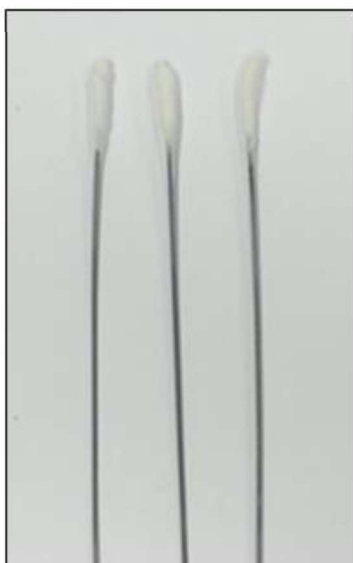
todo de diagnóstico utilizado. Carvalho (14) recomenda que sejam realizadas várias coletas periódicas para um resultado mais confiável. Como as amostras foram obtidas em consultas não foi possível realizar as coletas subsequentes como recomenda Carvalho (14). Porém Fornazari e Teixeira (12) relatam que um resultado positivo para o isolamento de Salmonelas em fezes de animais não significa, impreterivelmente, que ela seja a responsável por causar uma doença, uma vez que a sua presença é frequente no trato gastrointestinal destes animais. O contrário também é afirmado por estes autores, que dizem que um resultado negativo não expressa a ausência do patógeno, já que a excreção deste é intermitente.

Figura 1 - Confeção dos swabs: A) Vassoura da qual foram obtidas as hastes; B) Hastes depois de passarem pelo Bico de Bunsen



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Figura 2 - Swabs prontos



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Figura 3 - Swabs esterilizados



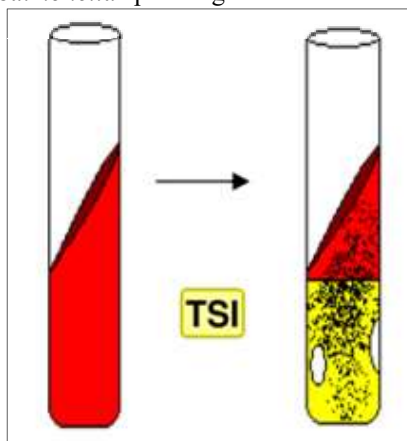
Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Tabela 1: Amostras com crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp. de acordo com o meio utilizado

| MC | XLD | SS |
|----|-----|----|
| 4  |     | 3  |
| 5  |     | 5  |
| 6  | 6   | 6  |
| 7  | 9   | 8  |
| 11 | 11  | 11 |
| 12 | 12  | 12 |
| 13 | 13  | 13 |
| 14 | 14  | 17 |
| 16 | 19  | 18 |
| 20 | 20  | 20 |

 Tabela 2 - Número de placas colônias típicas de *Salmonella* sp. de acordo com o meio de cultura utilizado

| XLD |   | MC |   | SS |    |
|-----|---|----|---|----|----|
| n   | % | n  | % | n  | %  |
| 8   | 4 | 1  | 5 | 1  | 50 |

 Figura 4- Demonstração de reação positiva a *Salmonella* sp. em ágar TSI


Fonte: arquivo pessoal, 2019.

### CONCLUSÃO:

Foi possível recuperar *Salmonella* sp. de 10% dos animais estudados neste trabalho.

### AGRADECIMENTOS:

Aos técnicos de laboratório e às estagiárias do laboratório de microbiologia. Ao Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO, pela qualidade do ensino prestado. Aos tutores dos animais que os disponibilizaram para a realização da coleta e concordaram em participar do estudo. A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS:

- Heges SB, Poling LL. A molecular phylogeny of reptiles. *Science*. 1999; 283: 998–1001.
- Uetz P. How Many Reptile Species? *Society for the Study of Amphibians and Reptile*. 2000; 31(1): 13–15.
- Seymour RS, Packard MJ. Evolution of the Amniote Egg. In: Sumida SS, Martin KLM. *Amniote Origins: Completing the Transition to Land*. Califórnia: Academic Press, 1997. p. 265–291.
- Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. Invasive nontyphoidal salmonella disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet*. 2012; 379(9835): 2489–2499.
- De Jong HK, Parry CM, Poll TVD, Wiersinga WJ. Host – Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLOS Pathogens*. 2012; 8(10):1–9.
- Mcvey DS, Kennedy M, Chengappa MM. *Veterinary Microbiology*. 3ªed. Iowa: Wiley Blackwell, 2013.
- Johnson-Delaney CA. Reptile zoonoses and threats to public health. In: Mader DR. *Reptile medicine and surgery*. 3ªed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. p. 1017–1030.
- Harris JR, Neil KP, Behravesh CB, Sotir MJ, Ângulo FJ. Recent Multistate Outbreaks of Human Salmonella Infections Acquired from Turtles: A Continuing Public Health Challenge. *Food Safety*. 2010; 50(4): 554–559.
- Mermin J, Hoar B, Angulo FJ. Iguanas and Salmonella marina infection in children: A reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Official Journal of the American Academy of Pediatrics*. 1997; 99(3): 399–402.
- Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, et al. Reptiles, Amphibians, and Human Salmonella Infection: A Population-Based, Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 38(3): S253–S261.
- Ackman DM, Drabkin P, Birkhead G, Cieslak P. Reptile-associated salmonellosis in New York State.pdf. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 1995; 14(11): 955–958.
- Fornazari F, Teixeira RC. Salmonelose Em Répteis: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos E Zoonóticos. *Veterinária e Zootecnia*. 2009; 16(1): 19–25.
- Chiodini RJ, Sundberg JP. Salmonellosis in reptiles: A review. *Am J Epidemiol*. 1981; 113(5): 494–499.
- Carvalho VM. Colibacilose e salmonelose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Traçado de animais selvagens: medicina veterinária*. 2ªed. São Paulo: Roca, 2006. p.742–750.
- Siebeling RJ, Neal PM, Granberry WD. Evaluation of methods for the isolation of Salmonella and Arizona organisms from pet turtles treated with antimicrobial agents. *Applied Microbiology*. 1975; 29(2): 240–5.
- Mitchell MA, Shane SM. Salmonella in reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2001; 10(1): 25–35.
- Freschi CR, Carvalho LFOES, Oliveira CJB. Comparison of DNA-Extraction Methods and Selective Enrichment Broths on the Detection of Salmonella Typhimurium in Swine Feces By Polymerase Chain Reaction (PCR). *Braz. J. Microbiol*. 2005; 36(4): 363–367.
- Paiva JB, Sterzo EV, Ribeiro AS, Pereira EA, Berchieri Jr A. Isolamento De Salmonella: Comparação das Etapas de Pré- Enriquecimento e Enriquecimento Direto de Amostras de Fezes Armazenadas por 24 e 96 Horas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2006; 73(3): 263–269.
- Nascimento MS, Berchieri Jr A, Barbosa MD, Zancan FT, Almeida WAF. Comparação de meios de enriquecimento e de plaqueamento utilizados na pesquisa de Salmonella em carcaças de frango e fezes de aves. *Revista Brasileira de Ciências Avícolas*. 2000; 2(1): 85–91.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2ªed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. 926 p.
- Flowers RS, D'Aoust JY, Andrews WH, Bailey JS. Salmonella. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3ªed. Washington (D.C.): American Public Health Association, 1992. p. 372–422
- Cox NA, Davis BH, Kendall JH, Whatts AB, Colmer AR. Salmonella in the Laying Hen. *Poultry Science*. 1971; 52: 1312–1316.
- Littell AM. Plating medium for differentiating Salmonella arizonae from other salmonellae. *Appl Environ Microbiol*. 1977; 33(2): 485–487.