



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
NUCLEO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DESENVOLVIMENTO RURAL  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -  
AMAZÔNIA ORIENTAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**JULIO CÉSAR MEYER JUNIOR**

**DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE  
ENTEROBACTÉRIAS PRESENTES EM TARTARUGAS  
DA AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) DE VIDA LIVRE E  
CATIVEIRO**

BELEM  
2007

JULIO CÉSAR MEYER JUNIOR

**DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE  
ENTEROBACTÉRIAS PRESENTES EM TARTARUGAS  
DA AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) DE VIDA LIVRE E  
CATIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Hilma Lucia Tavares Dias

BELÈM

2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –**  
**Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA**

---

Meyer Junior, Julio César

Determinação qualitativa de enterobactérias presentes em tartarugas da Amazônia (*podocnemis expansa*) de vida livre e cativeiro / Julio César Meyer Junior; orientadora, Hilma Lucia Tavares Dias – 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2007.

1. Tartaruga-Amazônia-Doenças. 2. Enterobactérias. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.089

---

JULIO CÉSAR MEYER JUNIOR

**DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE  
ENTEROBACTÉRIAS PRESENTES EM TARTARUGAS  
DA AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) DE VIDA LIVRE E  
CATIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental e da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Hilma Lucia T. Dias

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra Hilma Lúcia T. Dias-Orientadora  
Universidade Federal do Pará

---

Dra Cristina Wippich Whiteman

---

Prof. Dr. Cláudio Vieira de Araújo  
Universidade Federal Rural da Amazônia

## RESUMO

A tartaruga da amazônia (*Podocnemis expansa*) corresponde a um recurso faunístico muito importante para as populações ribeirinhas da região amazônica, além de ser uma das principais espécies indicadas para produção em cativeiro. O consumo dessa espécie como alimento na região, gerou uma demanda de estudos quanto à questão sanitária e seu impacto na saúde pública. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a microbiota intestinal de tartarugas da amazônia de vida livre e cativeiro, verificando a ocorrência de bactérias da Família Enterobacteriaceae no trato intestinal desses animais. Para isso, foram utilizadas 116 tartarugas adultas, de ambos os sexos, sendo que, 51 foram capturadas na Ilha de São Miguel, município de Santarém (PA), 50 animais pertenciam a um cativeiro comercial e 15 eram provenientes de um criadouro conservacionista, localizados na região metropolitana de Belém, Pará. De cada animal, foi colhida amostra de material biológico cloacal, utilizando-se *swabs* estéreis para em seguida serem acondicionados em tubos com meios de transporte e enviados ao laboratório para análises bacteriológicas. Todas as amostras foram imersas em caldos Selenito e BHI durante 24 horas e posteriormente semeadas em Agar Shigella-Salmonella e Agar Mac Conkey na temperatura de 37°C por 24 horas. As UFCs (Unidades formadoras de colônia) foram semeadas em Agar Muller Hilton por mais 24 horas em estufa a 37°C e identificadas pelo sistema Vitek® totalmente automatizado. Do total de 116 amostras foram obtidos 245 crescimentos bacterianos nos quais 83 (33,87%) eram provenientes dos animais de vida livre, com a identificação de 20 espécies bacterianas. Nos animais mantidos em cativeiro, foram obtidos 162 (65,72%) isolamentos, identificando-se 10 espécies de bactérias. Oito espécies foram encontradas em ambos os ambientes e 14 espécies em apenas um deles. A espécie *Klebsiella pneumoniae* foi a mais frequente, com 52 isolamentos, totalizando 21,22% dos crescimentos bacterianos, seguida de *Enterobacter cloacae* (35/14,29%), *Serratia marcescens* (29/11,84%) e *Salmonella species* (24/9,80%). Nos quelônios de vida livre, os microrganismos mais isolados constituíram-se dos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Aeromonas*. *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella* spp. apresentaram frequências elevadas naqueles animais cativos. Este resultado evidencia uma maior diversidade de microrganismos entre os animais de

vida livre e uma contaminação elevada por amostra nos animais de cativeiro. As espécies *Salmonella sp.*, *E. coli* e *Acinetobacter ssp.*, tiveram sua frequência aumentada provavelmente devido a influência do cativeiro, sendo portanto, sugeridas como indicativas da qualidade sanitária de populações da tartaruga da amazônia.

Palavras-chave: Tartaruga da Amazônia. Quelônio. Enterobactéria.

## ABSTRACT

The turtles (*Podocnemis expansa*) that live on the Amazon Rainforest, in Brazil, correspond to a very important wildlife resource for coastal communities in that area, besides being one of the main species shown to produce in captivity. The consumption of this species as food in the region generated a demand for studies of the health issue and its impact on the public health. The main objective of this study was to evaluate the intestinal tract of wild and captive turtles from the Amazon, verifying the occurrence of bacteria of the Enterobacteriaceae in the intestinal tract of the animals. For this, we used 116 adult turtles of both sexes: 51 were captured on the island of Sao Miguel, in Santarém (Pará - PA) town, 50 animals belonged to a captive business and 15 were from a conservation breeding, located in the metropolitan area of Belém (PA). From each animal, were collected a sample of cloacal biological material, using sterile swabs which were then packed in tubes with means of transportation and sent to the laboratory for bacteriological analysis. All samples were immersed in BHI broth and selenite for 24 hours and then plated on *Salmonella-Shigella* Agar and Mac Conkey Agar at a temperature of 37 °C for 24 hours. The CFUs (colony forming units) were grown in Mueller Hilton agar for another 24 hours at 37 °C and identified by the Vitek ® system fully automated. From 116 samples were obtained 245 bacterial growths in which 83 (33.87%) were from the wild animals, with the identification of 20 bacterial species. In animals kept in captivity, were obtained 162 (65.72%) isolates, identifying 10 species of bacteria. Eight species were found in both environments and 14 species in one of them. The species *Klebsiella pneumoniae* was the most frequent, with 52 isolates, totaling 21.22% of bacterial growth, followed by *Enterobacter cloacae* (35/14, 29%), *Serratia marcescens* (29/11, 84%) and *Salmonella species* (24/9, 80%). In wild turtles, the most common microorganisms isolated were formed of *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* and *Aeromonas*. *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* and *Salmonella spp.* showed high frequencies in the captive animals. This result shows a greater diversity of microorganisms among wild animals and a highly contamination by sample on captive animals. The species *Salmonella sp.*, *E. coli* and *Acinetobacter spp.* had increased their frequency probably due to the influence of captivity. Therefore, suggested as indicative of the sanitary quality of the Amazon turtle populations.

Keyword: Amazon giant turtle. Turtle. Enterobacteria.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>10</b>
3.1 A TARTARUGA DA AMAZÔNIA	10
<b>3.1.1 Aspectos Gerais</b>	<b>10</b>
3.2 A TARTARUGA COMO RECURSO ALIMENTAR	13
<b>3.2.1 Histórico e Cenário Atual</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2 Medidas Normatizadoras Adotadas</b>	<b>14</b>
<b>3.2.3 Risco Sanitário</b>	<b>14</b>
3.3 ENTEROBACTÉRIAS	15
<b>3.3.1 Características Biológicas das <u>enterobacteriaceae</u></b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Epidemiologia</b>	<b>17</b>
3.3.2.1 A Transmissão de Doenças em Cativo	18
3.3.2.2 A Transmissão de Doenças no Ambiente Natural	19
<b>3.3.3 Presença de patógenos em populações de animais silvestres</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS	24
<b>4.1.1 Ambiente de Vida Livre</b>	<b>24</b>
4.1.1.1 Acesso ao local	26
4.1.2 Cativo comercial	26
4.1.3 Cativo conservacionista	27
4.2 OS ANIMAIS	28
<b>4.2.1 Animais de Vida Livre</b>	<b>28</b>
<b>4.2.2 Animais de cativo</b>	<b>29</b>
4.3 COLETA E CULTIVO DO MATERIAL MICROBIOLÓGICO	29
4.4 LOCAL DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	30
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	30
4.6 METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	31
<b>4.6.1. Identificação automática (Vitek® bioMérieux)</b>	<b>31</b>

<b>4.6.1.1 Princípio de técnica</b>	<b>31</b>
<b>4.6.1.2 Procedimento Técnico</b>	<b>31</b>
<b>4.6.2 Provas Bioquímicas</b>	<b>32</b>
<b>4.7 Análises estatísticas</b>	<b>33</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>5.1 COMPARAÇÃO ENTRE AMBIENTES DE VIDA LIVRE E CATIVEIRO.</b>	<b>35</b>
<b>5.1.1 Frequência das bactérias presentes no total de animais examinados.</b>	<b>37</b>
<b>5.1.2 Frequência das bactérias no total de colônias isoladas.</b>	<b>39</b>
<b>5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AMBIENTES DE CATIVEIRO</b>	<b>41</b>
<b>5.3 ESPÉCIES DE BACTÉRIAS PRESENTES EM APENAS UM AMBIENTE</b>	<b>43</b>
<b>6. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>46</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A tartaruga da amazônia (*Podocnemis expansa*) corresponde a um recurso faunístico muito importante para as populações ribeirinhas da região amazônica, sendo seus produtos e subprodutos utilizados como alimento há séculos na região (IBAMA, 1989). Ao longo deste estudo serão observados pontos envolvendo questões econômicas, ambientais, culturais e ainda de saúde pública.

A espécie é apresentada em alguns estudos, particularmente nos aspectos referentes à sua abundância, ecologia reprodutiva e os seus aspectos relacionados à produção de neonatos. No entanto há uma demanda de estudos quanto à questão sanitária e o impacto na saúde pública que esses animais podem produzir, já que são consumidos como alimentos na população humana (IBAMA, 1989; SOINI, 1997).

Segundo alguns autores, (ALHO, 1985; SOINI, 1997; MELO, 2004), algumas espécies da nossa fauna apresentam grande potencial zootécnico para produção em cativeiro. Entre elas estão diversas espécies de mamíferos, aves, peixes e répteis amplamente distribuídos e há muito tempo já são usados como recursos alimentares pelas populações da região. Entre estas espécies, a tartaruga da amazônia se destaca como uma das opções para esta proposta de criação em cativeiro.

Seja qual for a finalidade, criação intensiva ou programas de cotas e manejo sustentável, é de grande importância que sejam criados dados epidemiológicos dessas populações, tanto em cativeiro, quanto em vida livre.

Vale ressaltar que até agora não foi realizado nenhum trabalho na região amazônica a fim de verificar a prevalência de bactérias de caráter zoonótico em populações de quelônios de vida livre ou cativeiro. A falta de pesquisa e literatura científica específica sobre a situação sanitária dessas populações é um ponto crítico, uma vez que há um esforço de entidades públicas e de organizações sociais na promoção de sistemas biologicamente sustentáveis e economicamente viáveis na região.

A finalidade principal deste trabalho é verificar a ocorrência de bactérias da Família Enterobacteriaceae no trato intestinal de tartarugas da amazônia (*P. expansa*), uma vez que, os répteis são reservatórios naturais dessa Família (SÁ et al, 2001) e são responsáveis por zoonoses identificadas no mundo todo.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a microbiota intestinal de tartarugas da amazônia (*Podocnemis expansa*) de vida livre e cativo no estado do Pará.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de bactérias gram negativas presente no trato digestivo de tartarugas da amazônia de vida livre, criadouros conservacionistas e comerciais;
- Identificar a influência do cativo na prevalência das espécies de bactérias gram negativas em tartarugas da amazônia;
- Sugerir instrumentos que nos permitam avaliar a situação sanitária e ambiental de tartarugas da amazônia mantidas em cativo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A TARTARUGA DA AMAZÔNIA

##### 3.1.1 Aspectos Gerais

Dentro da Ordem *Testudinata*, composta pelos quelônios, a tartaruga da amazônia é um dos membros da Família *Podocnemidae*. Essa família possui sete espécies distintas até o momento. *P. erythrocephala* (SPIX 1824), *P. lewyana* (DUMÉRIL 1852), *P. sextuberculata* (CORNALIA 1849), *P. unifilis* (TROSCHEL 1848), *P. dumerilianus*, *P. vogli* (MÜLLER 1935) e *P. expansa* (SCHWEIGGER 1812) (FRITZ; HAVAŠ, 2007).

Dentro do gênero *Podocnemis*, a tartaruga da amazônia (*P. expansa*) é uma das espécies mais consumidas na região amazônica, distribuindo-se de forma bem ampla. Chamada entre os ribeirinhos de “tartaruga”, este réptil habita os rios, lagos, pântanos e igapós de grande parte da floresta amazônica. O macho é menor que a fêmea e pode chegar a 50 cm de comprimento quando adulto. Uma fêmea adulta pode ter 90 cm de comprimento de carapaça e pesar até 60 kg (IBAMA, 1989).

O maior quelônio de água doce do mundo, representado na figura 1, na Venezuela é chamado de arrau, na Colômbia, Peru e Equador é chamado de “charapa”. Já na Bolívia ela é chamada de “tortuga”, equivalente a “tartaruga” no Brasil.



Figura 1. Tartaruga da amazônia.

A tartaruga se distribui por sete países da América do Sul, praticamente por toda região amazônica, como podemos observar na figura 2. Alimentando-se principalmente de matéria vegetal, como frutos e sementes, entretanto ela é classificada como onívora, por ingerir também pequenas quantidades de animais invertebrados, aquáticos e terrestres.

Já os neonatos mostram uma tendência maior ao consumo de proteína animal, uma vez que o estômago e intestino delgado apresentam maiores capacidades de armazenamento. Sugerindo que essas vísceras desempenham importante função na digestão de alimentos consumidos por *P. expansa* jovens, em cativeiro (LUZ, 2003; MALVASIO, 2003).



Figura 2. Distribuição da espécie *Podocnemis expansa*  
Fonte: Soini, 1997

O comportamento reprodutivo da tartaruga da amazônia é semelhante às outras espécies de quelônios aquáticos onde colônias de milhares de fêmeas adultas desovam em praias de forma coletiva. Nesta espécie, normalmente elas escolhem praias com bancos de areia altos ao lado de um corpo d água profundo e tranquilo. No Brasil, normalmente a temporada de desova ocorre de setembro a novembro, na estação mais seca do ano, quando o nível d água atinge seu nível mais baixo na região. A idade reprodutiva da fêmea começa com 5 a 7 anos de vida e durante a época reprodutiva apresentam comportamento gregário. Mas é um animal solitário o resto do ano (IBAMA, 1989; SOINI, 1997).

O grande número de ovos em uma postura pode variar de 26 a 184 unidades, podendo ter variação positiva com o tamanho da fêmea. A eclosão ocorre depois de 42 a 68 dias de incubação e os filhotes nascem simultaneamente, abandonando o ninho em direção ao rio (SOINI, 1997).

## 3.2 A TARTARUGA COMO RECURSO ALIMENTAR

### 3.2.1 Histórico e Cenário Atual

O hábito alimentar arraigado de consumir carnes de animais silvestres nativos da região é inerente ao povo da Amazônia. A tartaruga se destaca entre as espécies mais apreciadas por essa população. Isso devido às excelentes características organolépticas, abundância do recurso e baixo esforço de captura.

Com importância na formação sócio-cultural e no desenvolvimento econômico da Amazônia Brasileira, desde tempos imemoriais, os índios da região amazônica dependiam das tartarugas e seus ovos para a alimentação. No século XIX os ovos desses animais foram amplamente utilizados na alimentação e na iluminação noturna, consumindo-se cerca de 95 milhões de ovos na fabricação de manteiga e azeite (ALHO, 1985; IBAMA, 1989; MELO, 2004)

Hoje, a tartaruga da Amazônia é uma das espécies que mais sofrem com os efeitos do uso não sustentável (MELO, 2004).

Apesar de referências na literatura a indicarem como um dos recursos mais importantes na história do povoamento da Amazônia, hoje ela tem desaparecido de muitos rios por causa da pressão de caça, da coleta de seus ovos e pela degradação do seu habitat (SMITH, 1979; SOINI, 1997).

A história indica claramente um declínio da população da espécie. Os principais fatores foram; em primeiro lugar, a coleta de ovos e secundariamente, a caça e a pesca extrativista. Outros fatores nunca foram avaliados, como o impacto da coleta de filhotes para os criadouros registrados. O efeito da destruição dos habitats (as florestas alagáveis: várzeas e igapó) também não tem sido considerado (MELO, 2004).

As espécies do gênero *Podocnemis* já foram listadas como espécies ameaçadas de extinção. Hoje já foram retiradas da lista, mas esse quadro pode reverter se não forem adotadas medidas eficazes de controlar a prática de comércio ilegal dos quelônios e outros crimes ambientais (ALMEIDA, 2007).

### 3.2.2 Medidas Normatizadoras Adotadas

O desenvolvimento de sistemas de criação em cativeiro, segundo alguns autores como Alho, (1985), Soini, (1997) e Melo, (2004) também pode contribuir para a diminuição da pressão de caça sobre os animais de vida livre (CENAQUA, 2000). No entanto esse é um fato questionável, em função da realidade socioeconômica da região amazônica, uma vez que o criador de tartarugas em cativeiro encontra diversos entraves para chegar com seu produto na prateleira. Problemas estes relativos ao custo de produção, abate sanitário, falta de corpo técnico especializado e por não ser uma atividade de retorno imediato.

Neste contexto, o Ministério de Recursos Hídricos e da Amazônia Legal e o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA normatizaram a criação em cativeiro de duas espécies do gênero *Podocnemis*, a tartaruga-da-amazônia (*P. expansa*) e do tracajá (*P. unifilis*), em criadouros com finalidade comercial, criando a Portaria nº 142 de 30 de dezembro de 1992.

A criação dessa portaria, posteriormente a da Portaria nº 70, que dispõe sobre comercialização de produtos e subprodutos dessas duas espécies de quelônios, provenientes de criadouros comerciais regulamentados pelo IBAMA de 2006 e recentemente a Instrução Normativa nº 169, de 20 de fevereiro de 2008, foram as principais medidas adotadas pelo poder público na política de conservação dos quelônios e uso dos recursos naturais (BRASIL, 1993; 1996 e 2008).

### 3.2.3 Risco Sanitário

Das condições de cativeiro às quais normalmente os animais são submetidos, a grande maioria delas não são as mais adequadas. Sendo a falta de higiene a causa freqüente de doenças ou processo patológico em quelônios (BORDEAU, 1988).

Como outras espécies de quelônios na Amazônia, as tartarugas são frequentemente utilizadas como animais de companhia nos países da América do Sul. Em pesquisa realizada pela Associação Norte Americana de Produtos para Animais

Domésticos (APPMA) no maior centro mundial de criação de animais de estimação, os Estados Unidos, revelou que as tartarugas e os jabutis são mascotes de 40% de todos os proprietários norte americanos de répteis e anfíbios; percentuais que atingem o número de 1.084.000 animais, valor atingido por nenhuma outra espécie (CÃES & CIA, 2001).

É de grande relevância conhecer os agentes infecciosos qual estamos vulneráveis e o risco da exploração zootécnica do animal, quando os submetemos a condições controladas.

Sem o conhecimento necessário quanto aos parâmetros de sanidade da espécie, trabalhos conservacionistas importantes correm o grave risco de estarem destinados ao fracasso, seja pela morte de animais de plantel ou mesmo pela possibilidade de animais reintroduzidos em programas de solturas induzirem desastres ecológicos por meio da introdução de doenças em habitats originalmente isentos (FOWLER, 1978, CATAO-DIAS, 2003).

### 3.3 ENTEROBACTÉRIAS

#### 3.3.1 Características Biológicas das enterobacteriaceae

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a família Enterobacteriaceae é a maior e mais heterogênea família de bactérias gram-negativas de importância na saúde pública e pecuária no mundo todo. São considerados atualmente 32 gêneros, 130 espécies. A maioria das enterobactérias é encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais, doentes ou saudáveis, e são encontradas ainda na água, no solo e vegetais (MURRAY et al, 2004).

Embora considerados enteropatógenos, por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais, também podem causar infecções em outros locais. As espécies dessa família representam 80% ou mais de todos os gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. Apesar da complexidade dessa família, menos de 20 espécies são responsáveis por mais de 95% das infecções. Sabemos que as enterobactérias são também responsáveis em humanos, por de cerca de

70% das infecções urinárias e 50% das septicemias, 30 a 35% das infecções urinárias e muitas infecções intestinais (COSTALUNGA; TONDO, 1999; MURRAY et al, 2004).

A diferença entre as espécies de enterobactérias baseia-se principalmente na presença ou não de diferentes substâncias contidas nesses microrganismos, enzimas codificadas pelo material genético dos cromossomos bacterianos.

Estas enzimas participam do metabolismo bacteriano em diversas vias que podem ser detectadas por substratos com os quais podem reagir. Incorporando-os no meio de cultura junto com um indicador. Esse indicador pode detectar a utilização do substrato ou a presença de metabólitos específicos. Com uma série de meios de cultura que avaliem diferentes metabólitos, é possível estabelecer um perfil bioquímico para realizar a identificação da espécie (KONEMAN et al, 2001).

Em geral, os membros da Família Enterobacteriaceae são bacilos Gram negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativa. Anaeróbios facultativos (crescem em aerobiose e anaerobiose) fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são ainda catalase positivos, e ainda reduzem o nitrato a nitrito (ANVISA, 2004).

A forma que a infecção causada por uma dessas bactérias se torna potencialmente letal aos homens e animais é o choque endotóxico. As endotoxinas são lipopolissacarídeos farmacologicamente ativos que estão presentes no interior das paredes celulares das bactérias gram-negativas (KONEMAN et al, 2001).

Esses lipopolissacarídeos são estruturados por três regiões: (1) uma porção variável externa de carboidrato que determina a espécie antigênica (ex: Vários tipos de *Samonella*), (2) um centro ou antro de polissacarídeo que é estruturalmente similar entre as espécies antigênicas e (3) uma porção lipídica altamente conservada que é chamada Lipídio A. Os efeitos biológicos destas toxinas em seres humanos incluem febre, leucopenia, hemorragia capilar, hipotensão e colapso circulatório (KONEMAN et al, 2001).

Alguns desses bacilos (*Salmonella typhi*, espécies de *Shigella*, *Yersinia pestis*) estão sempre associados à doença, enquanto outros (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) são membros da microbiota normal, podendo causar infecções oportunistas. Existe um terceiro grupo de enterobacteriaceae, cujos microrganismos normalmente comensais tornam-se patogênicos quando adquirem genes dos fatores de virulência a partir de plasmídios, bacteriófagos ou ilhotas de

patogenicidade. As infecções causadas por membros da família Enterobacteriaceae podem se originar a partir de um reservatório animal, de um portador humano ou através da disseminação endógena dos microrganismos em um paciente suscetível (*E. coli*) podendo envolver praticamente qualquer tecido do corpo (JACOBSON, 1995; HUPTON, 2003; MURRAY et al, 2004).

### 3.3.2 Epidemiologia

A epidemiologia é definida como o estudo da distribuição e dos determinantes das doenças ou condições relacionadas à saúde em populações especificadas. Recentemente, foi incorporada à definição de epidemiologia como de “aplicação desses estudos para controlar problemas de saúde” (LAST, 1995).

Nos estudos epidemiológicos ecológicos, compara-se a ocorrência da doença a exposição de interesse entre agregados de indivíduos, como diferentes ambientes, por exemplo, para verificar a possível existência de associação entre elas. Em um estudo ecológico típico, medidas de agregados da exposição e da doença são comparadas. Nesse tipo de estudo, não existem informações sobre a doença e exposição do indivíduo, mas do grupo populacional como um todo (LIMA-COSTA et al, 2003, SZKLO; NIETO, 2000).

A transmissão das infecções que acometem o trato digestivo ocorre por meio de um circuito fecal - oral, de forma direta através do contato com as mãos ou excretas dos doentes, ou de maneira indireta, que é a mais freqüente, através do consumo de água e alimentos contaminados (CARNEIRO et al, 1997).

A freqüência das infecções no sistema digestivo varia desde cáries dentárias, a diarreia e intoxicação alimentar em pacientes imunocomprometidos. As doenças diarreicas constituem, em todo mundo, uma causa de morbidade e mortalidade bem maior do que as doenças mais familiares dos países industrializados (cardiopatas, câncer e acidente vascular cerebral). Infelizmente os lactentes e as crianças são desproporcionalmente acometidos, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde nutrição e o saneamento ambiental são precários (KEUSCH; ACHESON, 2002).

Atualmente é provável que menos de 1% dos incidentes são notificados, pois no Brasil ainda temos poucos centros epidemiológicos com dados de doenças infecciosas. Onde somente uma pequena fração das doenças alimentares é registrada às autoridades sanitárias (COSTALUNGA; TONDO, 1999).

Animais infectados podem se tornar portadores, passando a excretar de forma intermitente o agente (MUÑOZ et al, 2003; SANTORO, 2006). A manutenção de animais selvagens em cativeiro obriga o animal a se adaptar a recintos e dietas diferentes, elevada concentração populacional e na maioria das vezes, estresse provocado pela presença de humanos. Esses fatores podem levar a uma quebra da homeostasia do sistema imunológico, resultando no aparecimento de doenças (FOWLER, 1978).

#### 3.3.2.1 A Transmissão de Doenças em Cativeiro

Devido à diminuição do estoque faunístico em determinadas regiões, tem surgido grande interesse pela sua reprodução em cativeiro na tentativa de se resolver ou amenizar tais efeitos. Isso acaba gerando a necessidade de conhecimentos e estudos mais aprofundados sobre as patologias desses animais (MURO et al, 1994).

Com os animais mantidos em cativeiro, aumentam as chances de doenças entre os animais do plantel, existindo ainda, uma grande quantidade de microrganismos presentes nesses animais identificados como potencialmente patogênicos aos humanos. Quando a sanitização é precária, a situação fica ainda mais crítica, onde o contato do alimento com as fezes dos animais é mais freqüente. (JACOBSON, 2007; MUÑOZ et al, 2003; PASCOLI; RIBEIRO, 2003).

Os quelônios podem ser considerados rústicos em relação à incidência de doenças. No entanto são reportadas mais doenças de quelônios de cativeiro que de outros répteis. Bactérias Gram-negativas vêm sendo relacionadas a causas de septicemia em quelônios aquáticos de vida livre e cativeiro (JACOBSON, 1986).

As instalações e manejos adequados para cada espécie influenciam significativamente para a obtenção de bons resultados na adaptação, reprodução e sanidade dos quelônios em todo o Brasil.

Várias são as medidas de sanitização que podem ser tomadas, como a preparação e condicionamento dos alimentos, controle de verminoses e vetores, limpeza e a desinfecção dos recintos. Um quarentenário adequado para os animais recém chegados a um zoológico representa também uma prática importante de um programa bem estruturado de medicina preventiva (MILLER, 1999).



Figura 3. Captura de tartarugas realizada com rede em criadouro comercial.

Apesar do conhecimento desses cenários e dos riscos implícitos, muito pouco se sabe sobre as especificidades de cada situação, sendo consensual entre os pesquisadores da área que as informações existentes sobre incidência e distribuição de doenças nas populações cativas são insuficientes (WHITAKER, 1999).

### 3.3.2.2 A Transmissão de Doenças no Ambiente Natural

A biodiversidade amazônica é ainda muito mal mensurada. Não sabemos quantas espécies existem, conhecemos muito pouco sobre o papel de algumas espécies na sustentação do ecossistema e conhecemos menos ainda sobre as interações entre espécies e como elas respondem às variações do meio ambiente (MARTINS, 2007).

A transmissão de doenças infecciosas é um processo ecológico que envolve interações entre duas ou mais espécies. A diversidade de espécies numa comunidade ecológica pode potencialmente afetar a prevalência de doenças infecciosas (JOHNSON, 2006; KEESING, 2006).

Os efeitos da diversidade em sistemas de doença multi-hospedeira foram assuntos de muitos projetos de pesquisa recentes, diversos esforços objetivaram delinear sob que circunstâncias gerais a diversidade do hospedeiro deve aumentar ou diminuir a prevalência de doenças. Modelos e revisões da literatura sugerem que a diversidade elevada do hospedeiro provavelmente diminui o risco de doenças. (KEESING, 2006).

As enfermidades, em especial as infecto-parasitárias, introduzidas em um novo habitat, exercem impacto marcante sobre a manutenção de animais em vida livre e também na biodiversidade desses ambientes (SANTORO et al, 2006).

Considerando a possibilidade de animais soltos fora de sua área original de ocorrência acarretarem problemas ambientais e sanitários, que as enterobactérias estão incluídas na Instrução Normativa nº 179, de 25 de junho 2008, que defini as diretrizes e procedimentos para destinação dos animais da fauna silvestre nativa e exótica apreendidos, resgatados ou entregues espontaneamente às autoridades competentes. Ficando obrigatório o exame específico para o isolamento de *Salmonella sp* através de swab em répteis, conforme o Manual de Procedimentos para Destinação de Animais Silvestres - MPD constante no anexo I desta Instrução Normativa.

Contudo, é relativamente comum pesquisadores conservacionistas e agentes do poder público manifestarem ignorância sobre o efeito catastrófico de certas epizootias.

Esse quadro de desconhecimento torna necessário estudos urgentes sobre as mudanças no uso dos recursos e suas conseqüências sobre a biodiversidade. Precisamos compreender a biodiversidade da região em toda a sua complexidade e dinâmica, entender os efeitos dos processos de mudança e buscar as melhores soluções para sua manutenção (MARTINS, 2007).

Indicadores construídos a partir de dados sobre saúde e meio ambiente permitem definir o grau de intensidade de uma epizootia e seu impacto na biodiversidade. A informação é indispensável para qualquer atividade de vigilância. A implementação de um contexto de saúde ambiental significa a operacionalização dos desafios aqui apresentados (PALÁCIOS et al, 2004).

### 3.3.3 Presença de patógenos em populações de animais silvestres

O ambiente de cativeiro em si já predispõe os animais a diversas doenças infecciosas. A maioria dos agentes são organismos saprófitos que se tornam patogênicos devido a uma queda da imunidade, consequência do estresse causado pelo confinamento (MILLER, 1999).

Uma grande quantidade de doenças infecciosas também está presente no mundo selvagem. Esse fenômeno tem duas implicações biológicas básicas: primeiramente, muitas espécies selvagens são reservatórios de patógenos que podem afetar animais domésticos e a saúde humana. Segundo, as doenças infecciosas emergentes na vida selvagem têm um papel importante na conservação da biodiversidade mundial (DASZAK, 2000).

No sentido inverso, as enfermidades dos animais domésticos introduzidas em uma população selvagem exercem forte impacto sobre essas populações e consequentemente na biodiversidade em geral (SANTORO et al, 2006).

Como exemplo de doenças introduzidas em populações de animais silvestres, Catão (2003) cita diversas doenças de rebanhos de animais domésticos sobre as populações de animais selvagens em vida livre. No início do século passado, durante a conquista do pólo sul, acredita-se que os cães utilizados para o transporte de trenós tenham transmitido o vírus da cinomose canina às focas habitantes das costas da Antártica, levando à ocorrência de extensa mortalidade nestes animais. O mesmo vírus, dessa vez, disseminado por cães domésticos pertencentes a moradores do entorno da região do Chobe National Park, Botswana, foi incriminado pela extinção do cachorro do mato africano (*Lycaon pictus*) naquela região, em 1991.

A presença e densidade de populações de cães domésticos no entorno do Parque Nacional do Serengeti, África, foram apontados como fontes de infecção por cinomose para leões (*Panthera leo*), hienas (*Crocuta crocuta*) e raposas (*Vulpes vulpes*) (CLEAVELAND et al, 2000). A peste bovina, introduzida na África setentrional em 1888, disseminou-se rapidamente pela região sub-saariana, atingindo a África do Sul em 1896. Em seu caminho, a peste bovina causou também a devastação de grandes populações de herbívoros silvestres, incluindo búfalos (*Syncerus caffer*), oryx (*Taurotragus oryx*), kudus (*Tragelaphus strepsiceros*) e gnus (*Connochaetes taurinus*).

Mesmo depois de mais de um século, os efeitos sócio-econômicos deste processo são sentidos na África meridional. Recentemente, uma grande epizootia causada por um flavivírus (*West Nile virus*), além de ocasionar o óbito de mais de uma dezena de pessoas, causou a morte de milhares de aves selvagens, de múltiplas espécies, em diversos estados da costa leste e centro-oeste dos Estados Unidos (CATÃO, 2003).

Em animais silvestres, uma série de trabalhos descreveu a presença de enterobactérias tanto em animais de vida livre, quanto os mantidos em cativeiro. Essas bactérias podem exercer grande impacto na saúde humana ou mesmo nos animais domésticos. Em estudo feito por Sanches et al (2003) onde foram isolados microrganismos de 753 necropsiados, entre mamíferos, aves e répteis no período de 2000 a 2002, os principais agentes isolados pertenciam à Família *Enterobacteriaceae* (66%). Na Califórnia, em um centro de reabilitação de aves marinhas, vinte e cinco espécies de bactérias foram isoladas, incluindo espécies de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, e *Pseudomonas aeruginosa* (STEELE, 2005).

Quanto à questão sanitária, as criações intensivas de peixes têm apresentado um grande impacto nas populações selvagens (HILBORN, 2006). Em quelônios, apesar de pouca pesquisa não deve ser muito diferente, alguns trabalhos já foram feitos em relação ao diagnóstico sanitário desses animais no mundo todo, identificando diversos agentes patogênicos importantes.

Dicknson (2001) coletou material microbiológico fecal em jabutis do deserto coletado por meio de *swab* cloacal, identificando 17 espécies consideradas como patógenos oportunistas, entre elas *Pseudomonas* e *Salmonella* spp. As bactérias *Bacillus* spp., *Campilobacter*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp foram isolados de análises necroscópicas realizadas em tartarugas jovens de cativeiro. Outras bactérias foram indicadas como causadoras de infecção bacteriana múltipla. Foram as bactérias *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas* ssp, *Proteus* sp e *Salmonella* sp.

Santoro et al (2006) revelaram a presença de 35 espécies de bactérias na cloaca e mais 64 nas cavidades nasais em 45 tartarugas marinhas *Lepdochelis olivacea*. *Aeromonas* spp foi a espécie mais encontrada, seguida de *Citrobacter freundii* e *Salmonella* spp. Nas amostras coletadas de cloaca predominaram as espécies Gram-negativas e nas amostras nasais as bactérias Gram-positivas, onde o *Bacillus* spp,

seguido de *Staphylococcus aureus*. O *Enterococcus faecalis* foi a única espécie Gram-Positiva encontrada nas amostras cloacais.

Joyner (2006) a fim de caracterizar as bactérias presentes em jabutis (Eastern Box Turtles) com e sem abscessos timpânicos no Centro de Vida Selvagem de Virgínia, nos Estados Unidos, isolou as várias bactérias gram negativas responsáveis pela patologia.

Meyer et al (2006) identificou a presença de enterobactérias em muçuãs (*Kinosternon scorpioides*) mantidas em cativeiro, uma espécie de quelônio encontrada na região amazônica. Foi constatado também, que todos os animais eram portadores sadios dessas bactérias. No estudo em questão *E. coli*, *Klebsiella sp* *Enterobacter cloacae* *E. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Samonella sp*, *Pasteurella multocida*, *Serratia marcescens*, *S. fonticola*, *Acinetobacter lwoffii* e *Enterobacter amnigenus* foram isoladas.

Em um estudo similar a este, publicado por Santoro et al, em 2006, foram isoladas diversas espécies de bactérias Gram-negativas de fêmeas de tartarugas marinhas da espécie *Lepdochelis olivacea*. Aparentemente saudáveis, revelaram a presença de bactérias patogênicas para o ser humano e para as próprias tartarugas.

É evidente a presença de patógenos importantes tanto nas populações de animais domésticos e de animais silvestres mantidos ou não em cativeiro, quanto na população humana.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS**

Os animais foram capturados em dois ambientes, o ambiente natural e o cativeiro. No entanto no ambiente de cativeiro os animais se apresentam em dois locais distintos, um criadouro comercial e um criadouro conservacionista.

O ambiente natural corresponde a Ilha de São Miguel, no município de Santarém, no Oeste do Estado do Pará, na meso-região do Baixo Amazonas.

O ambiente de cativeiro é constituído de um criadouro comercial de tartaruga da amazônia, localizado na região metropolitana de Belém, no Município de Benevides/PA. Devidamente registrado no órgão ambiental competente, o criadouro fornece carne de tartaruga para alguns restaurantes de Belém.

O criadouro conservacionista está localizado no centro de Belém/PA e mantém um dos planteis mais antigos de tartarugas da amazônia, onde os animais estão expostos a visitação pública.

#### **4.1.1 Ambiente de Vida Livre**

A Ilha de São Miguel está localizada na região do baixo amazonas, nas coordenadas S 2°05'11.49" e W 4°34'12.20". Pertencente ao município de Santarém, a Ilha de São Miguel está inserida no coração do maior rio do mundo, o Rio Amazonas, e mantém um dos principais tabuleiros de desova da tartaruga da amazônia da região, com cerca de mil a mil e duzentas tartarugas desovando a cada estação reprodutiva.



Figura 4. Foto de satélite da região Norte de Brasil, destacando a região do baixo amazonas.

Fonte. Google Earth.

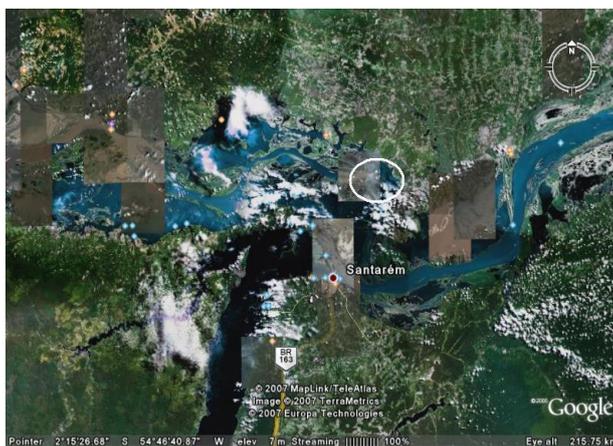


Figura 5. Foto de satélite da região do baixo amazonas e a localização da Ilha de São Miguel.

Fonte. Google Earth.

A Ilha está localizada dentro do ambiente de várzea onde praticamente toda a região está sujeita ao alagamento anual e as praias se apresentam apenas na época mais seca, do mês de setembro a dezembro. A vegetação do local corresponde basicamente de gramíneas e pequenos arbustos nas áreas alagáveis e uma porção menor de vegetação arbórea nas áreas de terra firme, como podemos observar na figura 6.



Figura 6. Ambiente natural na região do Baixo Amazonas, Santarém, PA.

#### 4.1.1.1 Acesso ao local

A Ilha de São Miguel fica próxima ao município de Alenquer. De Santarém pra Ilha existe linha comercial de Barcos em dias alternados, durante todos os meses do ano. Com aproximadamente 5hs de viagem é possível chegar na Ilha. No município de Santarém existe aeroporto devidamente estruturado. Foi feita apenas uma expedição ao local, no mês de outubro, a qual durou 17 dias.

#### 4.1.2 Cativeiro comercial

As tartarugas criadas em sistema comercial, são mantidas em tanques escavados e divididas por tamanho e idade. A coleta foi feita no tanque com uma rede de emalhar, e então feita a captura aleatória de 50 tartarugas.

A água é oriunda de um igarapé existente dentro da propriedade, os animais são divididos por idade e tamanho. A vegetação do entorno é do tipo arbórea, com presença de pecuária de gado bovino, caprino e até cães dentro da propriedade.

Os animais eram mantidos em um corpo d'água significativamente eutrofizado, com os animais medindo cerca de 30cm de comprimento retilíneo de carapaça. Foram coletados animais de ambos os sexos de forma aleatória.



Figura 7. Captura de tartarugas em um criadouro comercial.

#### **4.1.3 Cativeiro conservacionista**

As tartarugas pertencentes ao criadouro conservacionista são mantidas em tanque de cimento e uma praia artificial. A coleta foi feita após a drenagem do tanque e os animais foram coletados aleatoriamente. O ambiente conta com uma área submersa e uma área menor que sustenta uma pequena praia artificial de areia. Onde acontece anualmente a desova de várias tartarugas.

A água do tanque é substituída semanalmente e a alimentação dos animais é oferecida diariamente.



Figura 8. Tanque do criadouro conservacionista

## 4.2 OS ANIMAIS

Foram coletadas amostras de material biológico cloacal, através de *swab* de 116 tartarugas da amazônia, machos e fêmeas em duas situações distintas: um grupo de 65 tartarugas mantidas em cativeiro e um grupo de 51 animais de vida livre. Entre os animais mantidos em cativeiro, um grupo de 15 tartarugas é oriundo de um criadouro conservacionista e 50 tartarugas de um criadouro comercial.

### 4.2.1 Animais de vida livre

O grupo de animais de vida livre é composto de 51 fêmeas, adultas, que subiam à praia para postura de seus ovos. Foi feito um exame clínico em cada uma das tartarugas e todas apresentaram boas condições de saúde.

O exame clínico foi baseado na avaliação do *score* corporal do animal, na estrutura da carapaça, comportamento ativo ou apático e reflexo motor e resistência à abdução do membro posterior.

Os animais foram coletados minutos após o final da postura, quando já estavam retornando a água.

#### **4.2.2 Animais de cativeiro**

Já o grupo de animais mantidos em cativeiro é composto por dois grupos menores, animais de um criadouro comercial (n=50) e indivíduos de um criadouro conservacionista (n=15).

Os animais foram submetidos ao mesmo exame clínico, onde todos apresentavam bom estado de saúde, baseado no bom estado de carne, estrutura da carapaça, comportamento ativo ou apático e reflexo motor e resistência à abdução do membro posterior.

No criadouro comercial os animais onde os animais eram mantidos em tanques escavados, a captura foi feita através de redes de emalhar, no criadouro conservacionista, qual os animais eram mantidos em tanque de cimento, foi feita a secagem do tanque e os animais foram capturados manualmente.

### **4.3 COLETA E CULTIVO DO MATERIAL MICROBIOLÓGICO**

O material para a identificação dessas bactérias foi coletado usando swabs estéreis introduzidos na cloaca e condicionados em tubos com meios de cultura de transporte (Meio Stuart).

Todas as amostras foram imersas em Caldo Selenito e caldo BHI durante 24 horas. Posteriormente foram semeadas em meios de cultura para crescimento das colônias. Os meios utilizados foram o Agar Shigella-Salmonella e Agar Mac Conkey.

A temperatura de incubação foi de 37°C. Após 24 horas de cultivo, foi realizada a seleção e caracterização das colônias levando-se em consideração o tamanho, a forma, a margem, elevação e coloração. Para o Meio McConkey, foram consideradas

as funções de lactose positiva (colônia rosa escuro indica que houve fermentação da lactose) e lactose negativa (colônia branca, indicando que não houve fermentação).

Depois de selecionadas as UFCs (Unidades formadoras de colônia), cada UFC foi semeada em meio neutro (Agar Muller Hilton) a fim de purificar e isolar a colônia. A colônia repicada foi cultivada em placas por mais 24 horas em estufa a 37°C e então identificadas pelos testes bioquímicos.

#### 4.4 LOCAL DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas neste trabalho foram devidamente processadas em dois laboratórios distintos. O primeiro é o Laboratório de microbiologia do Centro Nacional de Primatas – CENP, financiado pelo Fundo Nacional da Saúde – FUNASA, localizado no município de Ananindeua. O laboratório tem como objetivo atender a demanda de exames microbiológicos da rotina clínica do plantel de primatas do centro e ainda contribuir com pesquisas de caráter científicos produzidas no CENP e em outras instituições na forma de parceria

O outro laboratório utilizado foi o Laboratório de investigação e diagnóstico de enfermidade dos animais - LIDEA, localizado na Universidade Federal do Pará - UFPa, em Belém. O LIDEA tem como rotina, o atendimento da demanda de pesquisas relacionadas às áreas de reprodução e sanidade de animais domésticos e selvagens no estado do Pará.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

As bactérias isoladas nos animais de vida livre e nos animais do criadouro conservacionista foram identificadas utilizando o sistema Vitek®, totalmente automatizado, a fim de revelar as espécies presentes na amostra.

Em princípio, todas as amostras seriam processadas utilizando a técnica de identificação automática. No entanto, devido um problema que surgiu no aparelho, não

foi possível dar continuidade no mesmo laboratório. Com isso, as bactérias isoladas das tartarugas criadas em cativeiro com fim comercial foram identificadas através do método convencional utilizando identificação bioquímica.

## 4.6 METODOLOGIA DE IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

### 4.6.1. Identificação automática (Vitek® bioMérieux)

#### 4.6.1.1 Princípio de técnica

Em 1982 tornou-se disponível o Enterobacteriaceae Biochemical Card (EBC+), que permitia a identificação automática de Enterobacteriaceae em 8 horas. O sistema Vitek® (bioMérieux Vitek® Inc., Hazelwood, MO) foi primeiro introduzido no comércio para provas de suscetibilidade antimicrobiana, e em seguida foram efetivadas modificações para aumentar sua precisão. Em 1986, o Gram-Negative Identification Card foi melhorado. A nova versão de identificação chamada GNI+ Card, contendo mais 20 novas espécies incluídas nas bases de dados apresentando melhor desempenho e menor período de identificação. O sistema Vitek® encontrou ampla distribuição nos laboratórios de microbiologia clínica, sendo aceito como um método confiável para identificação rápida de bacilos Gram-negativos (KONEMAN, 2001).

#### 4.6.1.2 Procedimento Técnico

Após os procedimentos de isolamento das colônias em meios de cultivo como descrito anteriormente, as colônias seguiram para processamento na máquina Vitek® bioMerieux para serem finalmente identificadas.

Para tal, as colônias puras foram diluídas em 2,8 ml de solução salina a 4,5% em um tubo de vidro estéril e submetidas a escala de McFarland. Esta escala mede o grau de turbidez da solução e faz a seguinte leitura: um ponteiro parecido com um velocímetro indica o grau de turbidez da solução movimentando-se lateralmente. Dividida em cores, é possível identificar se a solução está muito ou pouco densa. Com a densidade da solução devidamente corrigida pela diluição ou adição de colônias puras, é então inoculada em cartões GNI (Gram Negative Identification) para leitura.

A transferência da solução para o cartão GNI foi feita através de um micro canudo introduzido na solução e no cartão. Os cartões ligados aos tubos pelo canudo são colocados em uma câmara de vácuo, onde parte da solução é sugada para dentro do cartão. É feito então um corte no canudo com uma lâmina de bisturi aquecida, ocorrendo assim a vedação do cartão, impedindo o extravasamento da solução que contém a bactéria.

Finalmente, vedados e identificados os cartões, esses foram introduzidos na máquina Vitek® bioMerieux para leitura dos testes bioquímicos. Após 24 horas, o aparelho oferece o resultado da leitura dos cartões acusando as espécies de bactérias presentes.

#### **4.6.2 Provas Bioquímicas**

Inicialmente as colônias purificadas foram submetidas a análise presuntiva utilizando para isso o meio de rugai com lisina. Após as colônias identificadas foram submetidas às provas bioquímicas segundo Quin et al (1994), dentre as quais destacam-se, desaminação do triptofano, fermentação da glicose, produção de gás, produção de gás sulfídrico, hidrólise da uréia, motilidade, descarboxilação da lisina e indol.

#### 4.7 Análises estatísticas

A análise dos dados teve como abordagem inicial a estatística descritiva com a distribuição de frequências simples e relativa, através de tabelas de contingência. Para a investigação de possível associação entre o fator em estudo (diferentes ambientes), foi utilizado o teste exato de Fisher.

O Teste Exato de Fisher permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, a probabilidade de tais características serem independentes. E devido ao fato do número total de dados ser pequeno, o teste foi escolhido por produzir um erro menor que o teste de Qui Quadrado.

Os dados receberam tratamento estatístico utilizando-se o programa BioEstat 2.0, onde, para critérios de decisão, foi adotado o nível de significância (alfa) de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada.

## 5 RESULTADOS

Do material coletado das 116 tartarugas da Amazônia, foram isoladas 245 colônias bacterianas, no qual foi possível identificar 22 espécies de bactérias gram negativas.

TABELA 1. Frequência absoluta e relativa de colônias bacterianas (n= 245) entre 116 tartarugas da Amazônia, 2007.

<b>Microrganismo</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	52	21,22%
<i>Enterobacter cloacae</i>	35	14,29%
<i>Serratia marcescens</i>	29	11,84%
<i>Salmonella species</i>	24	9,80%
<i>Escherichia coli</i>	18	7,35%
<i>Proteus mirabilis indol -</i>	16	6,53%
<i>Citrobacter spp</i>	14	5,71%
<i>Citrobacter freundii</i>	7	2,86%
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	6	2,45%
<i>Enterobacter spp</i>	6	2,45%
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	6	2,45%
<i>Klebsiella oxitoca</i>	5	2,04%
<i>Acinetobacter ssp.</i>	5	2,04%
<i>Cedecea lapagei</i>	5	2,04%
<i>Citrobacter braakii</i>	4	1,63%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	1,63%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1,22%
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	0,82%
<i>Morganella morganii</i>	1	0,41%
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	0,41%
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1	0,41%
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	1	0,41%
<b>Total de isolamentos</b>	<b>245</b>	<b>100,00%</b>

A espécie *Klebsiella pneumoniae* foi a mais freqüente, com 52 isolamentos, totalizando 21,22% dos crescimentos bacterianos. *Enterobacter cloacae* (35/ 14,29%) aparece em segundo lugar, acompanhada pelas espécies *Serratia marcescens* (29/ 11,84%), e *Salmonella species* (24/ 9,80%). Com uma freqüência alta, a bactéria *Escherichia coli* (18/ 7,35% das colônias) também está presente, seguida pelas espécies *Proteus mirabilis indol* - (negativo) (16/ 6,53%) e *Citrobacter spp* (14/ 5,71%).

As espécies que apresentaram menor freqüência foram *Morganella morganii* e *Chromobacterium violaceum*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Edwardsiella hoshinae* e *Cedecea lapagei*, sendo isolada em apenas um isolamento cada, com uma freqüência relativa de 0,41% das colônias bacterianas.

### 5.1 COMPARAÇÃO ENTRE AMBIENTES DE VIDA LIVRE E CATIVEIRO.

Do total de 245 crescimentos bacterianos, 83 (33,87%) eram provenientes dos animais de vida livre, sendo identificados 20 microrganismos. Nos animais mantidos em cativeiro foram realizados 162 (65,72%) isolamentos, com a identificação de 10 microrganismos.

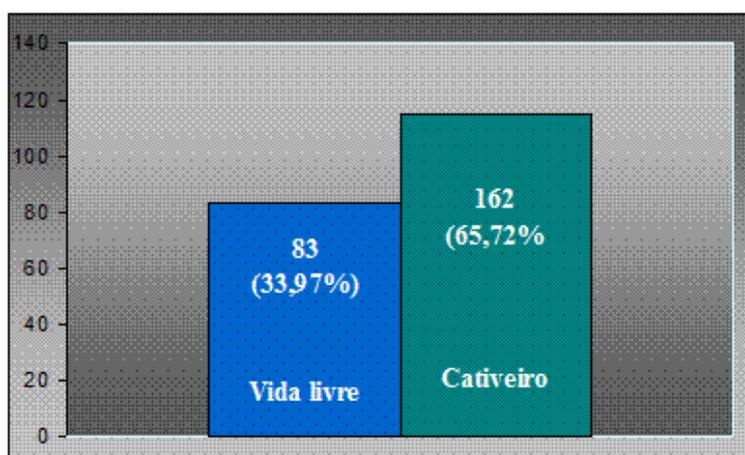
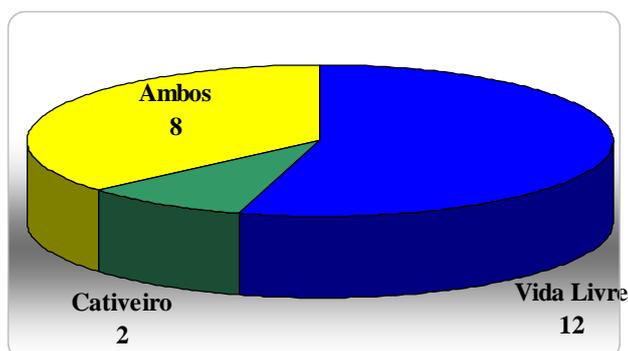


Gráfico 1. Número de colônias bacterianas encontradas em ambientes de vida livre e cativeiro, 2007.

Foi encontrada uma maior diversidade de bactérias entre os animais de vida livre. Dentre as 22 espécies identificadas, 20 estavam presentes entre os animais de vida livre e 10 espécies encontradas nos animais em cativeiro. É observado ainda que oito espécies foram encontradas em ambos ambientes, vida livre e cativeiro, e 14 em somente um dos ambientes.



Quadro 1. Número de espécies de bactérias presentes no cativeiro, vida livre ou em ambos ambientes, 2007.

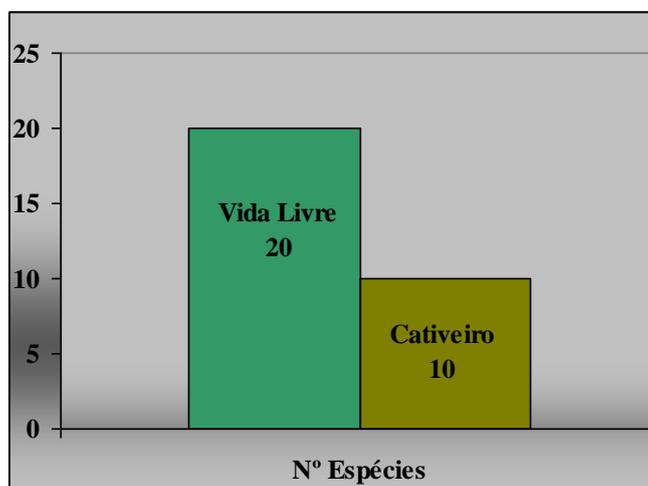


Gráfico 2. Número de espécies bacterianas encontradas por amostra presentes em ambientes de vida livre e cativeiro, 2007.

Simultaneamente encontrou-se uma maior quantidade de microrganismos em cada amostra de *swab* dos animais em cativeiro. Uma média de 2,45 espécies de microrganismos foi isolada a cada amostra procedente dos animais cativos e entre os animais de vida livre foi encontrada uma média de 1,63 bactérias diferentes por amostra.

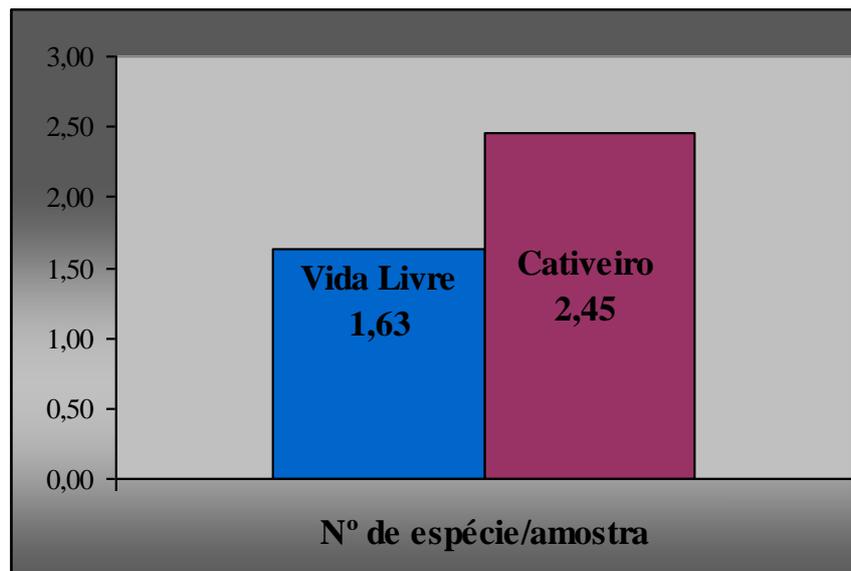


Gráfico 03. Valores das médias do número de espécies encontradas por amostra presente em ambientes de vida livre e cativo, 2007.

### 5.1.1 Frequência das bactérias presentes no total de animais examinados.

Na tabela 2 estão discriminados os valores de frequência absoluta e relativa dos microrganismos diante do número total amostras de *swab* cloacal coletadas de tartarugas, relacionando os diferentes ambientes estudados.

TABELA 02. Valores das frequências absoluta e relativa de microrganismos diante do número total de amostras de tartaruga da Amazônia (n=116) de vida livre e cativoiro, 2007.

MICROORGANISMO	LIVRE		CATIVEIRO	
	FREQUÊNCIA			
	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	27,45%	21	32,31%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	17,65%	43	66,15%
<i>Citrobacter freundii</i>	7	13,73%	0	0,00%
<i>Salmonella species</i>	4	7,84%	20	30,77%
<i>Citrobacter spp</i>	6	11,76%	8	12,31%
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	6	11,76%	0	0,00%
<i>Enterobacter spp</i>	6	11,76%	0	0,00%
<i>Klebsiella oxitoca</i>	5	9,80%	0	0,00%
<i>Cedecea lapagei</i>	5	9,80%	0	0,00%
<i>Citrobacter braakii</i>	4	7,84%	0	0,00%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	7,84%	0	0,00%
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	3	5,88%	3	4,62%
<i>Acinetobacter ssp.</i>	1	1,96%	4	6,15%
<i>Escherichia coli</i>	2	3,92%	16	24,62%
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	3,92%	0	0,00%
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	1	1,96%	0	0,00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,96%	2	3,08%
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1	1,96%	0	0,00%
<i>Morganella morganii</i>	1	1,96%	0	0,00%
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	1,96%	0	0,00%
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,00%	29	44,62%
<i>Proteus mirabilis indol -</i>	0	0,00%	16	24,62%

- Vida Livre

Nos animais de vida livre a bactéria *E. cloacae* foi mais frequentemente identificada em 14 (27,45%) tartarugas. *Klebsiella pneumoniae* (9/ 17,65%) também aparece com frequência elevada, seguida das espécies *Citrobacter freundii* (7/ 13,73%) e os microrganismos *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp* e *Aeromonas veronii biovar sobria*, presentes em cada seis (11,76%) amostras.

As bactérias com frequência inferior entre as tartarugas de vida livre são as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Edwardsiella hoshinae*, *Chromobacterium violaceum*, *Cedecea lapagei* e *Acinetobacter spp.*, presentes em cada um animal (1,96%).

- Cativo

Nos animais em cativeiro a espécie mais encontrada foi *K. pneumoniae*, com 43 amostras (66,15%), seguida pela *Serratia marcescens* em 29 (44,62%) amostras. A espécie *E. cloacae* (21/ 32,31%) aparece na seqüência dos isolados além da *Salmonella species* (20/ 30,77%).

Com as menores frequências, encontramos *E. aeruginosa*, isolada em três (4,62%) amostras e *Pseudomonas aeruginosa*, que foi identificada em apenas duas (3,08%) amostras.

### 5.1.2 Frequência das bactérias no total de colônias isoladas.

Em relação à frequência de uma colônia de bactéria isolada dentro do número total de colônias que se desenvolveram, tabela seguinte apresenta os resultados encontrados nos diferentes ambientes.

TABELA 3. Frequências absoluta e relativa de colônias isoladas (n= 245) de tartarugas da amazônia de vida livre e cativoiro.

Bactérias	Vida Livre		Cativoiro		Total	
	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	10,84%	43	26,54%	52	21,22%
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	16,87%	21	12,96%	35	14,29%
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,00%	29	17,90%	29	11,84%
<i>Salmonella species</i>	4	4,82%	20	12,35%	24	9,80%
<i>Escherichia coli</i>	2	2,41%	16	9,88%	18	7,35%
<i>Proteus mirabilis indol -</i>	0	0,00%	16	9,88%	16	6,53%
<i>Citrobacter spp</i>	6	7,23%	8	4,94%	14	5,71%
<i>Citrobacter freundii</i>	7	8,43%	0	0,00%	7	2,86%
<i>Aeromonas veronii</i>	6	7,23%	0	0,00%	6	2,45%
<i>biovar sóbria</i>						
<i>Enterobacter spp</i>	6	7,23%	0	0,00%	6	2,45%
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	3	3,61%	3	1,85%	6	2,45%
<i>Klebsiella oxitoca</i>	5	6,02%	0	0,00%	5	2,04%
<i>Acinetobacter ssp.</i>	1	1,20%	4	2,47%	5	2,04%
<i>Cedecea lapagei</i>	5	6,02%	0	0,00%	5	2,04%
<i>Citrobacter braakii</i>	4	4,82%	0	0,00%	4	1,63%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	4,82%	0	0,00%	4	1,63%
<i>Pseudomonas</i>	1	1,20%	2	1,23%	3	1,22%
<i>aeruginosa</i>						
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	2,41%	0	0,00%	2	0,82%
<i>Morganella morgani</i>	1	1,20%	0	0,00%	1	0,41%
<i>Chromobacterium</i>	1	1,20%	0	0,00%	1	0,41%
<i>violaceum</i>						
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1	1,20%	0	0,00%	1	0,41%
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	1	1,20%	0	0,00%	1	0,41%
<b>Total</b>	<b>83</b>	<b>33,87%</b>	<b>162</b>	<b>66,12%</b>	<b>245</b>	<b>100,00%</b>

- Vida Livre

Nos 245 isolamentos bacterianos, a maioria destes estavam nos animais mantidos em cativeiro comercial, um total de 162 (66,12%) crescimentos bacterianos foram isolados pertencentes a oito bactérias diferentes. Nos animais de vida livre foram realizados 83 (33,87%) isolamentos, em que identificaram-se 20 microrganismos diferentes.

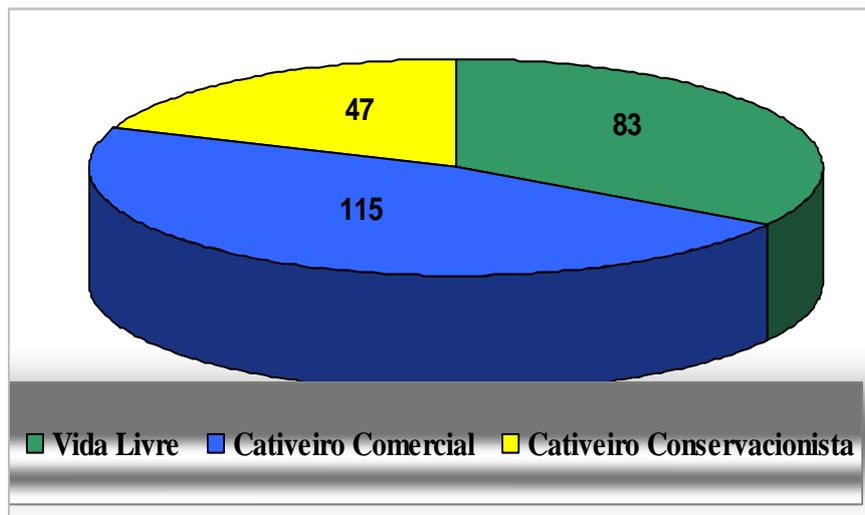
A bactéria *E. cloacae* foi identificada em 14 (16,87%) isolamentos, sendo a espécie de maior frequência nos animais de vida livre. Seguida pela *K. pneumoniae*, identificada em 9 (10,84%) entre as 83 colônias isoladas nos animais de vida livre.

- cativeiro

Nos animais cativos a espécie *K. pneumoniae* foi a mais frequente nas colônias que se desenvolveram (43/26,54%), seguida pela *S. marcescens*, responsável por 29 (17,90%) isolamentos.

## 5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AMBIENTES DE CATIVEIRO

Devido ao fato dos animais mantidos em cativeiro pertencerem a dois ambientes distintos, o quadro e a tabela abaixo discriminam os valores de frequência das colônias e das espécies de bactérias presentes nos ambientes de criadouro comercial (n= 50) e conservacionista (n= 15). Ressaltando que diferentes técnicas de diagnóstico foram aplicadas às amostras.



QUADRO 2. Dispersão do total de colônias isoladas (n= 245) por ambiente, 2007.

Na Tabela 4 estão caracterizados os diferentes ambientes de cativoiro as espécies de microrganismos isoladas e suas respectivas frequências absolutas e relativas.

TABELA 4. Frequências absoluta e relativa de isolados (n= 162) de amostras cloacais de tartarugas da amazônia criadas em cativeiro comercial e conservacionista, 2007.

Microrganismo	Comercial		Conservacionista	
	absoluta	relativa	absoluta	Relativa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34	29,57%	9	19,15%
<i>Serratia marcescens</i>	28	24,35%	1	2,13%
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	12,17%	7	14,89%
<i>Salmonella species</i>	14	12,17%	6	12,77%
<i>Escherichia coli</i>	6	5,22%	10	21,28%
<i>Proteus mirabilis indol -</i>	16	13,91%	0	0,00%
<i>Citrobacter spp</i>	1	0,87%	7	14,89%
<i>Acinetobacter ssp.</i>	0	0,00%	4	8,51%
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	2	1,74%	1	2,13%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0,00%	2	4,26%
<b>Total de isolamentos</b>	<b>115</b>	<b>100,00%</b>	<b>47</b>	<b>100,00%</b>

Dos isolamentos realizados a partir de amostras de animais mantidos em criadouro comercial a espécie *K. pneumoniae* apresentou a maior frequência, isolada em 34 (29,57%) tartarugas, seguida da *S. marcescens* presente em 28 (24,35%) amostras. No criatório conservacionista, *E. coli* (10/ 21,28%) apresentou maior representatividade entre as amostras e *K. pneumoniae* vem em seguida com nove (19,15%) isolamentos.

Nas amostras de criatório comercial, as bactérias que apareceram a menor frequência foram *Citrobacter spp* (1/ 0,87%) e *E. aeruginosa* (2/ 1,74%). No criadouro conservacionista, podemos citar *E. aeruginosa* (1/ 2,13%), *S. marcescens* (1/ 2,13%) e *P. aeruginosa* (2/ 4,26%).

### 5.3 ESPÉCIES DE BACTÉRIAS PRESENTES EM APENAS UM AMBIENTE

Doze dos 20 microrganismos isolados dos animais provenientes do ambiente natural, não foram identificados entre os animais cativos, sendo identificadas como : *Aeromonas veronii biovar sóbria*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella oxitoca*, *Cedecea*

*lapagei*, *Citrobacter braakii*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii*, *Chromobacterium violaceum*, *Klebsiella ornithinolytica* e *Edwardsiella hoshinae*.

Somente duas espécies, *S. marcescens*, e *P. mirabilis*, não foram isoladas em animais de vida livre somente nos animais de cativeiro.

TABELA 6. Frequências absoluta e relativa de bactérias gram negativas isoladas apenas em animais de vida livre, 2007.

<b>Microrganismo</b>	<b>Frequência absoluta</b>	<b>Frequência relativa</b>
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	6	11,76%
<i>Enterobacter spp</i>	6	11,76%
<i>Klebsiella oxitoca</i>	5	9,80%
<i>Cedecea lapagei</i>	5	7,84%
<i>Citrobacter braakii</i>	4	7,84%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	7,84%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	3,92%
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	3,92%
<i>Morganella morganii</i>	1	1,96%
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	1,96%
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1	1,96%
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	1	1,96%

*A. veronii biovar sóbria*, e *Enterobacter spp* foram os microrganismos de maior prevalência (11,76%) entre as 12 bactérias e apareceram somente nos animais de vida livre. A bactéria *K. oxitoca* apareceu em cinco (9,80%) das 51 tartarugas de vida livre, *Morganella morganii*, *Chromobacterium violaceum*, *Klebsiella ornithinolytica*, e *Edwardsiella hoshinae* (1/ 1,96%) também foram encontradas, no entanto numa frequência mais baixa.

Apesar da identificação destas bactérias aparecerem restritas aos animais de vida livre, segundo o Teste Exato de Fisher (P= 0,05), nenhuma apresentou diferença significativa nos ambientes estudados.

Nas bactérias identificadas no ambiente de cativeiro, duas foram encontradas somente nos animais mantidos nesse ambiente, a primeira espécie, *Serratia marcescens*, foi isolada na maioria das tartarugas, presente em 56% das amostras do criadouro, sendo 28 animais de criadouro comercial e um do conservacionista.

*Proteus mirabilis* foi também bastante encontrado, sendo detectado em 32% das tartarugas do criadouro. Apesar dessas duas bactérias estarem presentes apenas nas amostras de cativeiro, estatisticamente essas diferenças não se apresenta de modo significativo.

Entre os dois ambientes de cativeiro, também foram identificadas espécies presentes em somente um dos ambientes. A espécie *Proteus mirabilis indol* – foi isolada nos animais de criatório comercial, enquanto *Acinetobacter* ssp. e *Pseudomonas aeruginosa* foram isolados unicamente em animais do criatório conservacionista.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella species*, *Escherichia coli*, *Citrobacter spp*, e *Acinetobacter ssp*. apresentaram diferença significativa na sua distribuição entre os diferentes tipos de ambientes, de acordo com o Teste Exato de Fisher, no qual os valores de 'P' são inferiores ao valor de 0,05 para cada bactéria.

Duas metodologias distintas foram aplicadas neste estudo. A técnica de identificação bacteriana foi diferente para as amostras de origem do criadouro comercial. No entanto, foi igualmente aplicado o Teste Exato de Fisher ( $P= 0,05$ ) para confirmação da possibilidade da técnica de diagnóstico implicar na diferença significativa da frequência dos resultados.

Assim, as espécies *K. pneumoniae*, *Salmonella* e *E. coli*, *Acinetobacter ssp* e *Citrobacter spp* com o valor de  $p < 0,05$ , apresentaram diferença significativa entre os ambientes, sendo mais frequentes em tartarugas da amazônia de cativeiro do que em tartarugas de vida livre.

A espécie *Proteus mirabilis indol* - não foi susceptível ao teste estatístico, pela baixa frequência da espécie e baixa sensibilidade do teste.

TABELA 7. Resultados da avaliação estatística do impacto do ambiente e da técnica de diagnóstico na frequência encontrada de microrganismos, aplicação do Teste Exato de Fisher (P= 0,05).

<b>Microrganismo</b>	<b>Ambiente</b>	<b>Metodologia</b>
	Two-sided Pr <= P	Two-sided Pr <= P
<i>Escherichia coli</i>	<b>7,92E-04</b>	<b>3,25E<sup>-09</sup></b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>0.0025</b>	<b>2,83E<sup>-04</sup></b>
<i>Citrobacter spp</i>	<b>0.0065</b>	<b>1,44E<sup>-02</sup></b>
<i>Salmonella species</i>	<b>0.0066</b>	<b>0.0034</b>
<i>Acinetobacter ssp.</i>	<b>0.0081</b>	<b>0.0188</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.1270	<b>0.0360</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.2100	<b>0.0360</b>
<i>Serratia marcescens</i>	0.2273	0.0689
<i>Aeromonas veronii biovar sóbria</i>	0.3234	0.0689
<i>Enterobacter spp</i>	0.3234	0.1082
<i>Citrobacter freundii</i>	0.3364	0.1328
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.5666	0.1328
<i>Cedecea lapagei</i>	0.5666	0.1328
<i>Citrobacter braakii</i>	0.5666	0.2579
<i>Klebsiella oxitoca</i>	0.5806	0.4427
<i>Proteus miriabilis indol -</i>	*	0.5052
<i>Chromobacterium violaceum</i>	10.000	0.6880
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	10.000	0.6977
<i>Edwardsiella tarda</i>	10.000	10.000
<i>Enterobacter aeruginosa</i>	10.000	10.000
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	10.000	10.000
<i>Morganella morganii</i>	10.000	10.000

\*Não foi susceptível ao teste estatístico.

De acordo com o teste estatístico, a metodologia de diagnóstico pode ter influência na frequência de isolamentos de sete bactérias diferentes, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis indol (-)*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas veronii biovar sobria* e *Enterobacter spp*.

Contudo, podemos afirmar que as espécies *Salmonella sp.*, *E. coli* e *Acinetobacter ssp* tiveram sua frequência aumentada, devido a influência do ambiente de cativeiro. Isso sem interferência da técnica de diagnóstico, de acordo com a prova estatística aplicada.

## 7. DISCUSSÃO

Das diversas espécies da nossa fauna que apresentam grande consumo pela população humana e ainda produção em cativeiro, a tartaruga da amazônia se apresenta com importância biológica e econômica para a região amazônica (ALHO, 1985; IBAMA, 1989; SOINI, 1997; MELO 2004).

Com a finalidade de contribuir com a geração de indicadores das condições sanitária e ambiental desses animais, realizou-se uma análise microbiológica de 116 tartarugas da amazônia, identificando 22 espécies de bactérias gram negativas.

Em animais de vida livre foram identificadas 20 espécies de bactérias e 10 em animais mantidos em cativeiro. Oito espécies se encontravam em ambos os ambientes e 14 espécies em apenas um deles. Em torno de 2,45 espécies de microrganismos foram isolados de cada amostra procedente de animal cativo, valores superiores ao encontrado nas amostras de animais de vida livre, que apresentaram uma média de 1,63 bactérias diferentes por amostra.

Este resultado sugere uma maior diversidade de microrganismos entre os animais de vida livre e uma contaminação maior por amostra nos animais de cativeiro.

Montgomery (2002) identificou também uma maior variedade de bactérias na saliva de dragões de komodo de vida livre quando comparada com animais de cativeiro. O autor afirma que as bactérias isoladas em cativeiro foram altamente influenciadas pelo contato desses animais com o homem.

Johnson (2006) e Keesing (2006), em trabalhos distintos, esclarecem essa condição quando afirmam que a diversidade de espécies numa comunidade ecológica pode afetar a taxa da prevalência de doenças infecciosas.

Dentre os microrganismos isolados e posteriormente identificados no presente trabalho, as espécies de bactérias gram negativas mais encontradas nas tartarugas da amazônia foram *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacte cloacae*.

*K. pneumoniae* apresentou uma frequência de 51 (21,22%) colônias isoladas. Estes valores foram menores que os encontrados por Meyer et al (2006), onde *K. pneumoniae* foi isolada em 53% das amostras obtidas de muçuãs (*K. scorpioides*). Esta bactéria foi encontrada também em análises necroscópicas realizadas por Dicknson (2001) em tartarugas jovens de cativeiro, constatando infecção bacteriana múltipla.

A bactéria *E. cloacae* (35/ 14,29%), ocupa o segundo lugar como uma das espécies mais frequentemente isoladas nas tartarugas da amazônia. Foi o agente mais encontrado em animais de vida livre e representa a terceira posição entre os animais de cativeiro, demonstrando ser um microrganismo bem comum nesses quelônios.

Presente em 21 (32,31%) tartarugas de cativeiro, *E. cloacae* apresentou frequência bastante similar ao encontrado por Meyer et al (2006), que isolaram e identificaram o gênero *Enterobacter* do trato digestivo de muçuãs cativas e de 33% dos quelônios positivos.

Entre as bactérias identificadas em cativeiro, *Serratia marcescens* e *Proteus mirabilis* são as espécies de maior importância sanitária. Pascoli e Ribeiro (2002) isolaram as espécies *Serratia marcescens* e *Proteus mirabilis* das fezes de carnívoros do Zoológico Parque do Sabiá, Uberlândia, MG, onde o autor acusa que a presença dos microrganismos como uma possível causa de contaminação no manejo.

A hipótese do autor foi fortalecida neste estudo, a partir do momento em que não foram isoladas colônias de bactérias nas amostras procedentes dos animais de vida livre, sendo encontrada apenas nos animais cativos, em que a *S. marcescens* apresentou uma frequência de 29 (17,90%) colônias isoladas e *P. mirabilis indol* - em 16 (9,88%) isolamentos de animais em cativeiro. No entanto, as espécies não aparecem influenciadas significativamente pelo cativeiro, mas sim pela metodologia aplicada, o que provavelmente foi fundamental no resultado obtido, que demonstra o microrganismo presente em apenas um dos ambientes.

A espécie *S. marcescens* foi responsável por 29 (17,90%) das colônias isoladas apenas no ambiente de cativeiro e 11,84% da totalidade das colônias. *P. mirabilis* foi outra espécie que não se conseguiu isolar em animais de vida livre, mas somente nos animais cativos. O gênero *Proteus* foi encontrado em 32% das amostras de tartarugas criadas comercialmente. Estas bactérias foram encontradas como provável agente causador de septicemia em crocodilos do Mississippi (*Alligator mississippiensis*) quando Novak e Seigel (1986) isolaram a *S. marcescens* e *Proteus mirabilis* no sangue dos animais que apresentavam quadro clínico de letargia, anorexia, paralisia flácida dos membros posteriores, estomatite e dermatites.

Dickson (2001) identificou o gênero *Proteus* em jabutis do deserto, quando o considerou como patógeno oportunista, podendo estar presente em animais doentes ou saudáveis.

Confirmando a hipótese, Joyner (2006) isolou *S. marcescens* em animais saudáveis. A fim de distinguir as bactérias causadoras de abscessos timpânicos em jabutis do deserto (*Terrapene carolina*) de vida livre na Virgínia, Estados Unidos, o autor isolou essa espécie somente em animais sem abscesso e a bactéria não foi identificada como causadoras da enfermidade.

As espécies *Aeromonas veronii biovar sóbria*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella oxitoca*, *Cedecea lapagei*, *Citrobacter braakii*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Edwardsiella tarda*, *Morganella morganii*, *Chromobacterium violaceum*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Edwardsiella hoshinae* e a *Cedecea lapagei* foram isoladas exclusivamente de amostras oriundas dos animais de vida livre. Apesar destas bactérias apresentarem-se restritas ao ambiente de vida livre, nenhuma delas apresentou diferença significativa entre ambientes de acordo com a prova estatística.

Algumas das bactérias isoladas somente em animais de vida livre também já foram encontradas em animais de cativeiro em outros estudos. Como exemplo desse fato, cito a espécie *Edwardsiella tarda*, identificada em répteis em trabalho realizado no Zoológico de Nova York (New York Zoological Park) (SAVAN, 2004).

Otis e Behlerl em 1973 isolaram a bactéria numa frequência bem maior que no presente trabalho, no qual na análise microbiológica de 37 répteis, 15 foram positivos para *E. tarda* sendo ainda isolada em pelo menos um animal de cada tanque.

Os microrganismos *Aeromonas. veronii biovar sóbria* e *Enterobacter spp* foram os microrganismos mais importantes entre as enterobactérias encontradas somente nos animais de vida livre, e estavam presentes em seis (11,76%) indivíduos.

As espécies *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* são comumente encontradas em amostras biológicas. A espécie *E. aerogenes* (6/ 2,45%) foi isolada tanto em animais de vida livre, quanto em animais procedentes do cativeiro. Este gênero encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente, estando presente na água, em esgotos e no solo. As espécies de *Enterobacter* fazem parte da microbiota entérica comensal e acredita-se que não provoquem diarreia, embora já tenha sido isolada em casos graves de meningite e septicemia fatal em neonatos e também estão associadas à uma variedade de doenças oportunistas. Foram indicadas taxas de até 75% de mortalidade para esse microrganismo, indicando que pode ser altamente virulento (KONEMAN, 2001).

Portanto, verificamos a presença dessas bactérias tanto em animais de vida livre como em animais de cativeiro, clinicamente saudáveis ou não. Isto reforça ainda mais

uma condição citada por muitos autores, onde microrganismos patogênicos, como os isolados nesse trabalho podem se comportar como oportunistas em situações onde é observada uma imunossupressão, causando diversos tipos de quadros infecciosos (JACOBSON, 1995; WHITAKER, 1999; KONEMAN, 2001; MURRAY et al, 2004; HUPTON, 2003).

A importância de *Salmonella* pode ser evidenciada na literatura, sua presença é investigada nas diversas populações de quelônios, observando-se a grande distribuição desta bactéria no mundo todo. Millan (2004) e Renter (2006) confirmam que diversas espécies de animais domésticos e silvestres já foram identificadas como hospedeiro do microrganismo, sendo constatado esse fato na alta frequência de isolamentos clínicos.

A espécie *Salmonella* foi encontrada em todos os plantéis de animais, presente em 24 (9,8%) das 116 tartarugas examinadas. Ela apresentou frequência mais elevada nos animais de cativeiro em relação aos de vida livre, chegando a ser isolada em 20 (30,77%) indivíduos de cativeiro. Nos animais de vida livre a frequência foi menor, estando presente em quatro (7,84%) animais.

Um valor bem mais elevado foi descrito por Ebani (2005), no momento em que o autor fez isolamentos de répteis mantidos em cativeiro domiciliar. De 305 répteis examinados de outubro de 2001 a fevereiro de 2002 de origem domiciliar, 73 (23,93%) foram positivos para *Salmonella*. Assim Nakadai (2005), em estudo com répteis cativos no Japão isolou o gênero *Salmonella* em 83 das 112 (74.1%) amostras de répteis.

No Brasil em estudo realizado com jacarés do papo amarelo (*Caiman latirostris*) de cativeiro no Estado de São Paulo, foi isolada a bactéria em 48% (15/31) dos animais estudados por Gattamorta (2003), número muito próximo ao encontrado nas tartarugas criadas de forma conservacionista. Um valor similar ao encontrado neste estudo é descrito por Sá (2001), que isolou a bactéria de 39,1% dos 97 répteis de estimação e 25,8% dos 58 quelônios investigados. Nesse estudo, as tartarugas importadas *Trachemys scripta elegans* corresponderam a 93,3% dos quelônios portadores de salmonelas.

No entanto, outros autores identificaram a presença de *Salmonella spp.* apresentando frequência inferiores ao encontrado no presente trabalho. Richard (2004) realizou diversas culturas de isolamentos cloacais em répteis de vida livre e não identificou *Salmonella* em nenhuma das amostras. O mesmo autor examinando 75 répteis em um centro de reabilitação de animais de vida livre na Virginia, identificou a

bactéria *Salmonella* em nove quelônios. Meyer et al (2006) identificaram a presença de *Salmonella* em apenas uma das quinze muçuãs (*Kinosternon scorpioides*) mantidas em cativeiro.

A bactéria *Escherichia coli*, representou 18 (7,35%) isolamentos bacterianos, é a bactéria mais comumente isolada em laboratórios clínicos e já foi identificada em doenças infecciosas envolvendo todos os tecidos e sistemas orgânicos do corpo humano. O microrganismo já foi isolado em análises necroscópicas realizadas por Dicknson (2001) em tartarugas jovens de cativeiro, onde foi constatada infecção bacteriana múltipla.

Mader (1996), analisando 373 animais de zoológico, encontrou 250 (67%) positivos para a bactéria. Dos répteis examinados, seis espécies foram positivas para presença de *E. coli*. Amphisbenias, *Amphisbaena alba* 38/17 (44%), três espécies de jabutis, *Geochelone denticulata*, *G. sulcata* e *G. carbonaria* 6/14 (43%), Iguanas, *Iguana iguana* 3/6 (50%) e tartarugas da amazônia, *Podocnemis expansa* 2/9 (22%). A última espécie apresentou uma frequência de isolamentos da bactéria similar ao valor encontrado em animais criados em cativeiro (16/ 24,62%). Entre os animais de vida livre, a frequência foi bem mais baixa, com dois (3,92%) animais positivos entre os 51 examinados.

A frequência da bactéria entre muçuãs (*Kinosternon scorpioides*) em estudo realizado por Meyer et al (2006) resultado semelhante à frequência de *E. coli* em animais mantidos em cativeiro foi de 26% (4/15).

A bactéria *Acinetobacter ssp.*, uma das três espécies que apresentaram influência positiva do ambiente de cativeiro, foi encontrada em uma amostra (1,96%) dos animais de vida livre e em quatro (6,15%) dos animais examinados em cativeiro. Uma variedade de infecções humanas já foi causada por espécies do gênero *Acinetobacter*, pneumonias, endocardites, meningites, infecções de pele e feridas, peritoinites e infecções do trato urinário (KONEMAN, 2001).

O gênero *Acinetobacter* foi identificado em aves silvestres por Steele (2005) e depois por posteriormente por Meyer (2006), quando isolou a bactéria em duas muçuãs de cativeiro (13,33%), constatando que tais animais se apresentavam clinicamente saudáveis, o valor foi bem mais elevado que o encontrado neste estudo, no qual cinco (4,34%) tartarugas se apresentaram positivas.

Comparando todos esses dados estatisticamente, o Teste Exato de Fisher identificou os resultados encontrados em ambiente de cativeiro influenciando diretamente na frequência das espécies *K. pneumoniae*, *Salmonella species*, *E. coli*, *Citrobacter spp*, e *Acinetobacter spp*. No entanto, na análise das duas metodologias utilizadas na presente pesquisa, ficou evidenciado que houve influência na frequência de isolamentos das espécies *K. pneumoniae* e o *Citrobacter spp*.

Sendo assim, que as espécies *Salmonella species*, *E. coli*, e *Acinetobacter spp*, apresentaram frequências influenciadas pelo ambiente de cativeiro em tartarugas da amazônia.

As bactérias *Salmonella*, *E. coli* e *Acinetobacter spp*. são espécies sugeridas para o uso como referência do diagnóstico sanitário de populações de tartarugas da amazônia considerando o ambiente em que esses animais são mantidos.

Em relação ao controle sanitário desses microrganismos, Muñoz e colaboradores (2003), afirmam que o mesmo deve ser direcionado para manutenção de baixos níveis de infecção e não para a erradicação dessas bactérias. O monitoramento desses agentes, segundo Catão (2003), pode ser usado como instrumento de definição da qualidade e intensidade de uma situação ambiental ou relacionada à saúde pública. São informações indispensáveis para qualquer atividade de vigilância sanitária (PALÁCIOS, et al, 2004).

Contudo, é de suma importância que conheçamos os agentes infecciosos presentes na fauna nativa da região amazônica, o impacto desses microrganismos na saúde pública precisa ser muito bem analisado. Esses agentes biológicos são um dos principais atores da dinâmica epidemiológica da região e avaliar essa interferência na saúde pública e ambiental é tarefa urgente.

## 8. CONCLUSÃO

- Foi identificada uma maior diversidade de bactérias entre os animais de vida livre e uma maior contaminação por amostra de animais em cativeiro.
  
- Foi verificada influência significativa do cativeiro na frequência de espécies de bactérias gram negativas em tartarugas da amazônia.
  
- A metodologia do diagnóstico pode influenciar na frequência de bactérias gram negativas.
  
- As espécies *Salmonella s.*, *E. coli* e *Acinetobacter ssp* são sugeridas como instrumentos de diagnóstico da qualidade sanitária de populações de tartaruga da amazônia (*Podocnemis expansa*).

## REFERENCIAS

- ALHO, C. J. R. Conservation and management strategies for commonly exploited amazonian turtles, **Biological Conservation**, v. 32, p. 291-298, 1985.
- ALMEIDA, Cauê Guion de. **Fontes e Disponibilidade de Cálcio e Fósforo para a tartaruga-da-amazônia - *Podocnemis expansa* Criada em Cativeiro**. 2007. 89 f.. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2007.
- ANDRADE, Paulo César Machado. Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas. Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas. SEMINÁRIO DE CRIAÇÃO E MANEJO DE QUELÔNIOS DA AMAZÔNIA OCIDENTAL. 1, 2004. Manaus. **Anais ...** Ed. Paulo César Machado Andrade. 1<sup>a</sup> Edição, 2004. p 528.
- AZEVEDO, Rainier Pedraça de. Uso de água subterrânea em sistema de abastecimento público de comunidades na várzea da Amazônia central. **Acta Amazonica**. v. 36, n 3, p. 313 – 320, 2006.
- BORDEAU, P. Pathologie des tortues repartie: examenclinique et maladies générales. **Point Vétérinaire**, MaisonAlfort, v.20, n.117, p.761-775, 1988.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 169, de 20 de fevereiro de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF Publicado no Diário Oficial da União no dia 27 de abril de 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. **Infecção Hospitalar I**. 2. ed. Brasília, 1994. p. 50.
- BRASIL. Portaria 142, de 30 de dezembro de 1992. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. Publicado no Diário Oficial da União no dia 21 de janeiro de 1993, Seção I, Página 922.
- BRASIL. Portaria 70, de 23 de agosto de 1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília**, DF. Publicado no Diário Oficial da União no dia 26 de agosto de 1996, Seção 01, p. 16390-16391.
- CARNEIRO, Irna Carla do Rosário Souza; RAMOS, Francisco Lucio de Paula, LINS-LAISSON, Zéa Constante. Febre tifóide e paratifoide. In: LEÃO, Raimundo Nonato

Queiroz de. **Doenças infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 475-480, 1997.

CATAO-DIAS, José Luiz. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. **Ciência e Cultura**. v. 55, n. 3, p.32-34. Jul/Set. 2003.

CLEAVELAND, S. et al. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**. v. 72, p. 217-227, 2000.

DASZAK, Peter; CUNNINGHAM, Andrew A.; Hyatt, Alex D. **Science** **21**. v. 287. n. 5452, p. 443-449. 2000

DETECÇÃO e identificação de bactérias de importância médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:  
<[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf). >. Acesso em: 15 de janeiro de 2006.

DICKINSON, V. M. et al. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from Western United States. **Journal of Wildlife Disease**, v. 37, n. 2, p. 252 -257, 2001.

FOWLER, Murray E. **Sanitation and Desinfection**. In: \_\_\_\_\_ **Zôo and Wild Animal Medicine**. Saunders Company., 1978. P. 20-30.

FRITZ, Uwe; HAVAŠ, Peter. **Checklist of Chelonians of the World**. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Disponível em: [http://www.cites.org/common/com/NC/tax\\_ref/Chelonians\\_Checklist\\_2006.pdf](http://www.cites.org/common/com/NC/tax_ref/Chelonians_Checklist_2006.pdf). Acesso em: 12 de janeiro de 2007.

GIANNONI, Miriam Luz. Criação de Animais Silvestres em Cativeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CONSERVAÇÃO E MANEJO DA BIODIVERSIDADE. 1, 1999, Ribeirão Preto. **Anais ...** Ribeirão Preto: Holos Ed. Especial, 1999. p 129-135.

HILBORN. R. Salmon-farming impacts on wild salmon. **PNAS**. v. 103, n. 42, p. 15277 – 15277, 2006.

HUPTON G et al. Bacteria in the reproductive tracts of red-winged blackbirds. **The Condor**. v. 105, n. 3, p. 453–464, 2003.

IBAMA. Centro Nacional de Quelônios da Amazônia. **Atividades da área de criação em cativeiro no exercício de 2000**. Goiânia, 2000, p.20.

IBAMA. **Projeto Quelônios da Amazônia – 10 anos**. IBAMA. Brasília: O Instituto, XVI, 1989. p. 09 – 10.

JABUTIS: répteis de muito sucesso. Disponível em:  
<<http://www.petbrazil.com.br/bicho/outros/280.htm>>. Acesso em: 20 de agosto de 2007.

JACOBSON, Elliot R. Health Assessment of Chelonians and Release Into the Wild. In: FOLLER, Murray E, MILLER, R Eric. **Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy** 4. W B SAUNDERS. 1986. P. 241.

JACOBSON, Elliot R. **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text**, CRC Press, 2007. p. 716.

JACOBSON, Elliott R. Use of antimicrobial therapy in reptiles. In: International Symposium at the North American Veterinary Conference, 1995, Orlando - Florida. **Use of Antimicrobial Therapy in Reptiles**. Bayer AG Business Group Animal Health, 1995, p.28-37.

JOHNSON, Pieter T. J. Amphibian diversity: Decimation by disease. National Academy of Sciences. **Science**. v. 103, n. 9, p. 3011-3012, 2006.

JOYNER, Priscilla H. et al. Characterization of the Bacterial Microflora of the Tympanic Cavity of Eastern Box Turtles With and Without Aural Abscesses. **Journal of Wildlife Diseases**, Wildlife Disease Association. v. 42, n. 4, p. 859–864. 2006.

JUNK, W. J. As águas da região Amazônica. In: SALATI, Eneas et al. **Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia**. São Paulo: Brasiliense, 1983. p. 54-55.

KEESING, F.; Holt, R. D.; OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecology Letters**. v. 9, n. 14, p. 485–498, 2006.

KONEMAN, Elmer et al. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Editora Medsi, 2001. p.178.

LAST, J M. **A Dictionary of Epidemiology**. 3. ed. Oxford, 1995.

LIMA-COSTA, M.F.F. et al. The Bhas Group. Socioeconomic position and health in a population of Brazilian elderly: The Bambuí Health and Ageing Study (BHAS). **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.13, n.6, p. 387-394, 2003.

LUZ, Vera Lúcia Ferreira et Al. Morfometria do trato digestório da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em sistema comercial. **Revista brasileira de zootecnia**, V.32, N.1, P.10-18, 2003.

MADER, Douglas R. **Reptile Medicine and Surgery**. WB Saunders Company, 1996. P 20-26.

MALVASIO, Adriana et al. Feeding behavior and food preference of *Podocnemis expansa* (Schweigger), *P. unifilis* (Troschel) and *P. sextuberculata* (Cornalia) in: captivity (Testudines, Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 20, n. 1, 2003.

MARTINS, Marlúcia Bonifácio et al. A Amazônia está mudando. **CIÊNCIA HOJE**. v. 40. n. 239, p. 38-43. 2007.

MEYER, Júlio Cesar; DIAS, H. L. T.; COSTA, João Bosco da. Determinação qualitativa das enterobactérias presentes no trato digestivo da tartaruga da amazônia (*podocnemis expansa*) mantidas em cativeiro. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 8. 2006, Ilhéus-BA. **Anais ... Ilhéus-BA**, 2006.

MIGUEL T. Rodrigues. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, v. 1, n 1, Julho, 2005.

MILLAN, J. et al. Salmonella Isolates from Wild Birds and Mammals in the Bosque Country (Spain). **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**. v. 23, n. 3, p. 905-911. 2004.

MILLER, R.E. Quarantine: A necessity for zoo and aquarium animals. In: FOWLER, M.E. **Zoo & Wild Animal Medicine: Current therapy**. 4 ed. Philadelphia: Saunders, 1999, p. 13-17.

MONTGOMERY, Joel M. et al. Aerobic Salivary Bacteria in Wild And Captive Komodo Dragons. **Journal of Wildlife Diseases**. Wildlife Disease Association. v. 38, n. 3, p. 545-551. 2002.

MUÑOS, R, Sayd. Controle de *Salmonella spp.* Em Granjas de Suínos. **Suinocultura Industrial**, n. 8, P. 28 -31. 2003.

MURO, J.; CUENCA, R.; VIÑAS, L.; LAVIN, S. Interés del hemograma en la clínica de quelonis. **Veterinaria Praxis**. v. 9, n. 3, p. 24-29, 1994.

MURRAY, C.J. Salmonellae in the environment. **Review Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v. 10, p. 765-785. 1991.

NAKADAI, A. et al. Prevalence of Salmonella spp. In Pet Reptiles in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 67, n. 1, p. 97-101. 2005.

PALÁCIOS, Mariza; CÂMARA, Volney de Magalhães; JESUS, Iracina Maura de. Considerações sobre a epidemiologia no campo de praticas de saúde ambiental. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 213. p. 103-113. 2004.

PASCOAL, Graziela Virginia Tolesano, RIBEIRO, Sueli Cristina de Almeida. Enterobacteriaceae isoladas de animais (Lobo Guará *Chrysocyon brachyurus*, macaco prego *Cebus apella*, cachorro do mato *Cerdocyon thous*, furão *Galictis vitatta*) e de funcionários do zoológico Parque do Sabiá, em Uberlandia, Minas Gerais em 2002. In: CONGRESSO DE ZOOLOGICOS DO BRASIL. **Anais ...** Sociedade de Zoológicos do Brasil, Bauru. 18 a 23 de Maio de 2003.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. p.237-242.

RENTER, David G et al. Prevalence and Serovars of Salmonella in the Feces of Free-Ranging White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) in Nebraska. Short communication. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 3, p. 699-703. 2006.

RICHARD, J.M. et al. Absence of detectable Salmonella Cloacal Shedding in Free-Living Reptiles on admission to the wildlife Center of Virginia. **Journal Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 4, p. 562-563. 2004.

SÁ, Isabel Valéria. SOLARI, Abalem de Claude André. Salmonella in Brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1517-8382, 2001.

SANTORO, Mario; ORREGO, Carlos Mario; GÓMEZ, Giovanna Hernández. Flora bacteriana Cloacal y nasal de *Lepdochelys olivacea* (Testudines: Chelonidae) en el pacífico norte de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**. v. 54, n. 1, p. 43-49, 2006.

SAVAN R. et al. Sensitive and Rapid Detection of Edwardsiellosis in Fish by A Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 1, p. 621-624. 2004.

SMITH, Nigel J. H. Aquatic turtles of Amazonia: An endangered resource. **Biological Conservation**. v. 16, n. 3, p 165-176, 1979.

SOINI, P. Biología y Manejo de la Tortuga *Podocnemis expansa* (Testudines, Pelomedusidae). **Tratado de Cooperación Amazônica**, Caracas, Venezuela, SPT-TCA, 1997. p. 1-48.

SOINI, P. Ecología y manejo de quelonios acuáticos en La amazonía peruana. In: TULA G. Fang, Bodmer, Richard E. et al. **Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía**, La Paz, Bolivia, 1997. p.167-173.

STEELE, C. M., BROWN R.N., BOTZLER R. G. Prevalences of zoonotic bacteria among seabird in rehabilitation centers along the pacific coast of california and Washington, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, Wildlife Disease Association. v. 41, n 4, p. 735-744. 2005.

SZKLO, M. JAVIER NIETO, F. Basic study designs in analytical epidemiology. In: \_\_\_\_\_. **Epidemiology: beyond the basics**. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc; 2000. p. 3-51.

WHITAKER, B.R. Preventive medicine programs for fish. In: FOWLER, M.E. **Zoo & Wild Animal Medicine: current therapy** 4. 4. ed., Philadelphia: Saunders, 1999. p. 163-181.