

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. E *Leptospira* spp.
EM *Phrynops geoffroanus* (CÁGADO-DE-BARBICHA)
EM AMBIENTE URBANO**

Juliana Paula de Oliveira

Médica Veterinária

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. E *Leptospira* spp.
EM *Phrynops geoffroanus* (CÁGADO-DE-BARBICHA)
EM AMBIENTE URBANO**

Juliana Paula de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Karin Werther

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

2013

O48p Oliveira, Juliana Paula de
Detecção de *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. em *Phrynosoma geoffroanus* (cágado-de-barbicha) em ambiente urbano / Juliana Paula de Oliveira. -- Jaboticabal, 2013
xv, 51p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Karin Werther
Banca examinadora: Luis Antonio Mathias, Eliana Reiko Matushima
Bibliografia

1. *Salmonella* 2. *Leptospira* 3. Testudines aquáticos 4. Zoonose, 5. Saúde pública I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 616.981.48

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

e-mail: julepaulavet@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. E *Leptospira* spp. EM *Phrynosoma geoffroianus* (CÁGADO-DE-BARBICHA) EM AMBIENTE URBANO

AUTORA: JULIANA PAULA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. KARIN WERTHER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KARIN WERTHER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIS ANTONIO MATHIAS

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ELIANA REIKO MATUSHIMA
Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Data da realização: 02 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PAULA DE OLIVEIRA – Nascida em 17 de maio de 1984, em Caçador, Santa Catarina. Ingressou em julho de 2002 no curso de Medicina Veterinária no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) no Câmpus de Lages, onde se graduou em julho de 2007. Durante a graduação, entre janeiro e dezembro de 2006, foi bolsista de extensão da UDESC na área de Meio Ambiente (medicina veterinária de animais selvagens). Atuou como médica veterinária em clínica de pequenos animais na Boutique Canina Gesser Ltda. Me., em Brusque-SC, entre novembro de 2007 e julho de 2008. Realizou residência no Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina de Animais Selvagens pela Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), Câmpus de Jaboticabal, durante o período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. Em março de 2011, iniciou Pós-graduação, nível mestrado, em Medicina Veterinária, na área de concentração - Patologia Animal, na FCAV-Unesp, com bolsa Capes de 19 meses. Desde a residência e durante a pós-graduação, auxiliou na execução dos projetos de extensão da Unesp (Proex-Unesp) intitulados “Exames anatomopatológicos em animais selvagens” e “Manejo de animais selvagens de estimação”, criados em 2010 e 2011, respectivamente. Desde abril de 2011 atua também na comissão organizadora do Grupo de Estudos de Animais Selvagens (GEAS) da FCAV-Unesp.

As fronteiras entre as populações humanas, de animais domésticos e do ecossistema selvagem se desenvolvem mais entrelaçadas a cada ano, à medida que a humanidade aumenta sua população, se expande e invade territórios (DASZAK; CUNNINGHAM, 2002).

Dedico,

Aos meus pais, Sergio e Leyza, que sempre me incentivaram;

Aos meus irmãos, Rodrigo, Daniela, Fernanda e Carolina, que amo tanto;

Ao meu noivo, Fabiano, parceiro para tantos momentos e que compartilha comigo tantas emoções;

E às amigas Jeovana, Aline, Denise, Helenara e Alanna, grandes companheiras.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades oferecidas.

À FCAV/Unesp, por disponibilizar este programa de Pós-graduação, fornecer suporte laboratorial, estrutural, técnico e bibliográfico de ótima qualidade.

À Orientadora, Profa. Dra. Karin Werther, pela presença ativa neste projeto e demais atividades realizadas, pelos ensinamentos, paciência e exemplo de determinação, persistência, didática e respeito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela bolsa concedida.

Aos demais docentes, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e Prof. Dr. Raul J. S. Girio, que colaboraram com o apoio científico e bibliográfico a este projeto; Prof. Dr. Luiz A. do Amaral e Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, que contribuíram na etapa de exame de qualificação; e Profa. Dra. Eliana R. Matushima e Prof. Dr. Luis A. Mathias, que realizaram as melhorias na etapa da defesa desta dissertação.

Aos técnicos de laboratório desta instituição, que tão atenciosamente auxiliaram na obtenção dos diagnósticos microbiológicos, sorológicos e de biologia molecular, Adriana M^a. Almeida, Nivaldo A. Assis e Andressa de Sousa, respectivamente.

Aos caros amigos e parceiros de pós-graduação que participaram no planejamento técnico do projeto, Eliane de Sousa e José R.F. Alves Jr.; e na execução deste trabalho, Alanna S.L. Silva, Aline E. Kawanami, Denise G. Chung, Pedro H.F. Teles, Diego F.A. Batista, Priscila D. Lopes e Silvia J.A. Diaz.

Agradeço também ao suporte ambiental fornecido pela Base Operacional da Polícia Militar Ambiental de Jaboticabal-SP e CETESB Jaboticabal-SP. E à colaboração na logística de captura dos *Phrynops geoffroanus* fornecida por Fabiano C. Sá, “Seu” Antônio A. Ribeiro e Dona Corina F. Godoy.

Por fim, agradeço aos meus pais, Leyza P. de Oliveira e Sergio O. de Oliveira, pelo auxílio material e suporte espiritual em mais este projeto.

SUMÁRIO

	PÁGINA
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	viii
AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA - SISBIO.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTAS DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. <i>Salmonella</i> spp.....	2
2.2. <i>Leptospira</i> spp.....	4
2.3. <i>Phrynops geoffroanus</i> (cágado-de-barbicha).....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. Local e período.....	8
3.2. Captura e alojamento dos <i>Phrynops geoffroanus</i>	9
3.3. Colheita das amostras biológicas de <i>Phrynops geoffroanus</i>	10
3.3.1. Suabe cloacal.....	10
3.3.2. Colheita de sangue.....	11
3.3.3. Lavados estomacal e cloacal.....	12
3.4. Colheita de amostras do meio ambiente.....	14
3.5. Processamentos laboratoriais dos materiais colhidos.....	15
3.5.1. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	15
3.5.2. Detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	16
3.5.3. Detecção de material genômico de <i>Leptospira</i> spp.....	18
3.6. Análise dos dados.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	22

4.1.1. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp. oriunda de amostras de <i>P. geoffroanus</i>	22
4.1.2. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp. oriunda de amostras ambientais.....	24
4.2. Técnica de soroprecipitação microscópica (SAM) para detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	26
4.3. PCR para identificação de <i>Leptospira</i> spp.....	28
4.4. Relação dos resultados da técnica de soroprecipitação microscópica (SAM) para detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. com os da PCR para identificação de <i>Leptospira</i> spp.....	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICES.....	49
Apêndice A.....	50
Apêndice B.....	51



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007842/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Pesquisa de *Salmonella spp.* e anticorpos anti-*Leptospira spp.* em cágados de vida livre em Jaboticabal/SP**", sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Karin Werther, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de Maio de 2011.

Jaboticabal, 13 de Maio de 2011.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28440-1	Data da Emissão: 30/05/2011 09:20
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Juliana Paula de Oliveira	CPF: 047.224.079-08
Título do Projeto: PESQUISA DE Salmonella spp. E ANTICORPOS ANTI-Leptospira spp. EM CAGADOS DE VIDA LIVRE EM JABOTICABAL/SP	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura, Transporte e Colheita de materiais biológicos de Cagados de Vida Livre	07/2011	02/2013
2	Processamento de materiais biológicos de Cagados de Vida Livre, água e sedimento dos córregos e lago	07/2011	02/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Todos os exemplares de tartarugas aquáticas a serem capturadas no âmbito do presente estudo serão devolvidos aos locais de onde foram capturados, após a manutenção temporária, por três dias, nas dependências da UNESP-Jaboticabal. Portanto, na prática, o presente estudo não contempla a COLETA dos animais, tendo em vista que para os efeitos do SISBIO, a coleta implica na retirada definitiva de animais da natureza. Essa ressalva é para respaldar a pesquisadora, quando da entrega de relatório.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Felipe Jorge da Silva	Desenvolvimento de técnica laboratorial	312.036.108-90	339232924 SSP-SP	Brasileira
2	Kaline Barros Barboza	Participação na captura, transporte e coleta de material	228.226.788-55	27630633-8 SSP-SP	Brasileira
3	JOSE ROBERTO FERREIRA ALVES JUNIOR	Participação na captura, transporte e coleta de material	892.530.781-20	4054719 DGPC-GO	Brasileira
4	Aline Kawanami	Participação na captura, transporte e coleta de material	326.770.618-13	284615965 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59788578





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28440-1	Data da Emissão: 30/05/2011 09:20
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Juliana Paula de Oliveira	CPF: 047.224.079-08
Título do Projeto: PESQUISA DE Salmonella spp. E ANTICORPOS ANTI-Leptospira spp. EM CÁGADOS DE VIDA LIVRE EM JABOTICABAL/SP	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

5	karin werther	Participação na captura, transporte e coleta de material	532.920.309-00	7647442 SSP-SP	Brasileira
---	---------------	--	----------------	----------------	------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JABOTICABAL	SP	Avenida Carlos Berchieri - Centro	Fora de UC
2	JABOTICABAL	SP	Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Trachemys aditrix, Acanthochelys radiolata, Trachemys scripta, Phrynops vanderhaegel, Phrynops geoffroanus, Trachemys dorbigni, Hydromedusa tectifera, Hydromedusa maximiliani, Phrynops hogel, Acanthochelys spixii
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Acanthochelys spixii, Trachemys aditrix, Hydromedusa maximiliani, Hydromedusa tectifera, Phrynops geoffroanus, Acanthochelys radiolata, Trachemys dorbigni, Trachemys scripta, Phrynops vanderhaegel, Phrynops hogel
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Trachemys dorbigni (*Qtde: 10), Phrynops vanderhaegel (*Qtde: 8), Acanthochelys spixii (*Qtde: 8), Hydromedusa tectifera (*Qtde: 8), Trachemys aditrix (*Qtde: 10), Acanthochelys radiolata (*Qtde: 8), Phrynops hogel (*Qtde: 10), Hydromedusa maximiliani (*Qtde: 8), Phrynops geoffroanus (*Qtde: 20), Trachemys scripta (*Qtde: 10)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Hydromedusa tectifera, Phrynops vanderhaegel, Acanthochelys spixii, Trachemys dorbigni, Acanthochelys radiolata, Trachemys aditrix, Hydromedusa maximiliani, Trachemys scripta, Phrynops hogel, Phrynops geoffroanus
5	Marcação de animais silvestres in situ	Hydromedusa maximiliani, Hydromedusa tectifera, Phrynops vanderhaegel, Acanthochelys radiolata, Phrynops geoffroanus, Phrynops hogel, Trachemys scripta, Trachemys aditrix, Acanthochelys spixii, Trachemys dorbigni

* Qtde. de indivíduos por espécie/focalidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue, Regurgitação/conteúdo estomacal, Fezes
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Funil trap, Puçá, Outros métodos de captura/coleta (anzol oxidável sem fígua, redes e tarrafas), Coleta manual, Captura manual
3	Método de marcação (Répteis)	Pintura de escamas, Outros métodos de marcação (placa plástica numerada aderida ao casco), Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	Ensino e Pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59788578



DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. E *Leptospira* spp. EM *Phrynops geoffroanus* (CÁGADO-DE-BARBICHA) EM AMBIENTE URBANO

RESUMO – *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp., agentes zoonóticos de relevância em saúde pública, apresentam ocorrência mais frequente nas regiões tropicais e possuem no meio aquático uma forma viável de sobrevivência e transmissão. Este trabalho teve o objetivo de pesquisar a presença de *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. em *Phrynops geoffroanus* (cágados-de-barbicha) e a presença de *Salmonella* spp. no ambiente (Córrego Cerradinho em Jaboticabal-SP), no qual os animais foram capturados. A partir das amostras de sangue e suabes de cloaca de *P. geoffroanus* e de amostras de água e sedimento do córrego, foram feitos cultivos microbiológicos para pesquisa de *Salmonella* spp. O soro de *P. geoffroanus* foi utilizado para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para verificar a presença de *Leptospira* spp. nas amostras de lavado estomacal e cloacal. Diversos sorotipos de *Salmonella* spp. foram isolados nas amostras do Córrego Cerradinho e nos suabes cloacais de *P. geoffroanus* residentes nesse ambiente. Nem sempre os sorotipos de *Salmonella* spp. encontrados em ambiente e em *P. geoffroanus* foram os mesmos. Os testudines aquáticos foram positivos para *Leptospira* spp., e foram detectados também anticorpos contra o agente. Concluiu-se que a presença dos agentes, tanto nos animais como no ambiente aquático, pode representar um risco para a saúde pública.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Leptospira*, testudines aquáticos, zoonose, saúde pública.

DETECTION OF *Salmonella* spp. AND *Leptospira* spp. IN *Phrynops geoffroanus* (GEOFFROY'S SIDE-NECKED TURTLE) IN URBAN ENVIRONMENTAL

ABSTRACT – *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp., zoonotic agents of public health relevance, have higher occurrence in tropical regions and present in the aquatic environment, a viable survival and transmission way. This study aimed to investigate the presence of *Salmonella* spp. and *Leptospira* spp. in *Phrynops geoffroanus* (geoffroy's side-necked turtle) and the presence of *Salmonella* spp. in the environment (Cerradinho Stream, Jaboticabal-SP), where animals were captured. From blood samples and cloacal swabs of *P. geoffroanus* and samples of water and sediment from the stream, microbiological cultures for *Salmonella* spp. were performed. The serum of *P. geoffroanus* was used to detect antibodies anti-*Leptospira* spp. by microscopic agglutination test (MAT). Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to verify the presence of *Leptospira* spp. in samples of gastric and cloacal lavage. Several serotypes of *Salmonella* spp. were isolated in samples of Cerradinho stream and cloacal swabs of *P. geoffroanus* residents in this environment. The serotypes of *Salmonella* spp. found in the environment and in *P. geoffroanus* were not always the same. The freshwater testudines were positive for *Leptospira* spp., and antibody against the agent were detected. It was concluded that the presence of agents, in both animals and aquatic environment, may represent a risk to public health.

Keywords: *Salmonella*, *Leptospira*, freshwater testudines, zoonosis, public health.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Celsius

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

BOD - demanda bioquímica de oxigênio

DNA - ácido desoxirribonucleico

x g - força gravitacional

g - gramas

IUCN - International Union for Conservation of Nature

Kg - quilogramas

µL - microlitro

mL - mililitro

mm - milímetros

mM - milimol

pb - pares de base

PCR - reação em cadeia da polimerase

P. expansa - *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia)

P. geoffroanus - *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha)

PM - peso molecular

p/v - peso por volume

q.s.p. - quantidade suficiente para

S - sul

T. scripta elegans - *Trachemys scripta elegans* (tigre-d'água-de-orelha-vermelha)

U/ µL - Unidade por microlitro

v/v - volume por volume

W - oeste

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA	
Tabela 1	Quantidade de <i>P. geoffroanus</i> capturados, suabes realizados e frequência (%) de isolamento de <i>Salmonella</i> spp. no período de fevereiro a maio de 2012, em Jaboticabal-SP.....	22
Tabela 2	Sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , resultantes do cultivo microbiológico de suabes colhidos em três dias consecutivos de 30 <i>Phrynops geoffroanus</i> , no período de fevereiro a maio de 2012, em Jaboticabal-SP.....	23
Tabela 3	Sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , resultantes isoladas de amostras de sedimento com água do fundo do córrego, colhidas no período de fevereiro a maio de 2012, em Jaboticabal-SP.....	25
Tabela 4	Frequência da quantidade de sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. detectadas em soros testados de <i>P. geoffroanus</i> (n=76) pela técnica de soroaglutinação microscópica e a discriminação das sorovariedades.....	26
Tabela 5	Relação das sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., quantidade de <i>P. geoffroanus</i> sororreativos com sua respectiva diluição no teste de SAM.....	27
Tabela 6	Relação entre os resultados das técnicas de PCR e SAM para <i>Leptospira</i> spp., em 66 <i>P. geoffroanus</i> capturados no Córrego Cerradinho, Jaboticabal-SP, no período de fevereiro a maio de 2012, antes e depois do evento de poluição ambiental.....	29

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1	<i>P. Geoffroanus</i> . A: pescoço longo recolhido lateralmente. B: carapaça achatada e larga. Seta: barbilhões na região gular.....	6
Figura 2	Mapa de Jaboticabal-SP com destaque para o percurso do Córrego Cerradinho, em azul e o trecho de considerado para o estudo (A - B), onde ocorreram a colheita das amostras ambiental e animal no período de fevereiro a maio de 2012 (IMAGENS ©2013 Cnes/Spot Image, DigitalGlobe, GeoEye, TerraMetrics, Dados cartográficos ©2013 Google, MapLink, 2013).....	9
Figura 3	Ilustração de uma expedição no trecho urbano do Córrego Cerradinho, em Jaboticabal-SP, 2012. A: Aspecto das barreiras de contenção nas margens do córrego. B: Captura ativa de <i>P. Geoffroanus</i> com puçá (seta).....	10
Figura 4	Colheita de suabe cloacal em <i>P. Geoffroanus</i> contido fisicamente, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012.....	11
Figura 5	Punção do seio venoso vertebral cervical de <i>P. Geoffroanus</i> , com o uso de agulha 13 x 0,45mm acoplada à seringa de 1 mL, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012. Observa-se a marcação não invasiva colada na carapaça (seta).....	12
Figura 6	Procedimentos que antecederam o lavado estomacal em <i>P. Geoffroanus</i> , HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012. A: Mensuração do comprimento da sonda desde a cavidade oral até a abertura do estômago. B: Introdução da sonda pelo “abre-bocas artesanal”.....	13
Figura 7	Realização de lavado cloacal em <i>P. Geoffroanus</i> , utilizando uma sonda uretral e solução fisiológica esterilizadas, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012.....	14
Figura 8	Diagrama do número de <i>P. Geoffroanus</i> capturados no Córrego Cerradinho em Jaboticabal-SP de fevereiro a maio de 2012, e a quantidade de amostras biológicas colhidas para os diversos processamentos laboratoriais realizados na FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012. Ap: antes da poluição ambiental; Dp: depois da poluição ambiental.....	21
Figura 9	Amplificação específica de <i>Leptospira</i> spp. As amostras de lavado estomacal (E52) e cloacal (C66) apresentaram amplificação (331 pb) para <i>Leptospira</i> spp. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA). CP: controle positivo.....	28

1. INTRODUÇÃO

O meio aquático representa um ambiente que viabiliza a sobrevivência e a transmissão de agentes zoonóticos, tais como: *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp., causadores respectivamente, de salmonelose (SAIDI et al., 1997) e leptospirose (PLANK; DEAN, 2000). Ambos agentes possuem grande importância socioeconômica devido aos impactos causados na criação de animais e pela relevância em saúde pública (LORENZON et al., 2010; SILVA et al., 2012).

A ocorrência destas infecções é mais frequente nas regiões tropicais. *Salmonella* spp. geralmente está associada a áreas de aglomerações populacionais, condições sanitárias precárias e contaminação dos suprimentos aquíferos por material de origem fecal (KONEMAN et al., 2001), enquanto *Leptospira* spp. ocorre mais frequentemente em locais com alta pluviosidade e temperatura tropicais (ACHA; SZYFRES, 2001).

A cidade de Jaboticabal, localizada no nordeste do Estado de São Paulo, possui área territorial de 706,602 Km², registro de 101,42 hab/Km² (IBGE, 2013) e clima “Cwa” (classificação Köppen), definido como verão úmido e inverno seco (BORGES, GALBIATTI, FERRAUDO, 2003). Nos períodos de alta pluviosidade ocorre escoamento de grande volume de água, oriunda das galerias pluviais e das margens do córrego urbano para o leito, e que eventualmente transborda e carrega impurezas e contaminantes. O Córrego Cerradinho, que corta a cidade, alberga peixes e testudines aquáticos (*Phrynops geoffroanus*). A população humana tem acesso e faz uso desse córrego para lazer e pesca.

Este estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. em *P. geoffroanus* e *Salmonella* spp. no ambiente (água e sedimento). Para tanto, foram verificadas:

- A presença de *Salmonella* spp. em amostras do Córrego Cerradinho e de *P. geoffroanus* que habitam este ambiente;
- A presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e de *Leptospira* spp. nos *P. geoffroanus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Salmonella* spp.

A salmonelose é uma enfermidade bacteriana que afeta humanos e animais, causada por sorotipos de duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* e *S. bongori* (OIE, 2010). Com exceção dos sorotipos cujo reservatório é exclusivamente o homem, como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *S. Paratyphi C*, os sorotipos restantes de *Salmonella* spp. possuem potencial zoonótico (ACHA; SZYFRES, 2001). Esta é uma das zoonoses mais comuns e economicamente importantes, que está distribuída mundialmente, com prevalência em áreas de pecuária intensiva (OIE, 2010), é frequente nas regiões tropicais, onde predominam aglomerações populacionais, condições sanitárias precárias e contaminação dos suprimentos aquíferos por material de origem fecal (KONEMAN et al., 2001).

Salmonella spp. é um bacilo Gram-negativo, móvel (com algumas exceções), anaeróbio facultativo (ACHA; SZYFRES, 2001), veiculado pela água e transmitido pela rota fecal-oral (GRABOW, 1996; LECHEVALLIER; WELCH; SMITH, 1996; SAIDI et al., 1997), que ocorre principalmente no trato intestinal de aves, répteis e seres humanos (CARVALHO, 2006).

Nos humanos, a salmonelose caracteriza-se por infecções diarreicas e sistêmicas com septicemia (ACHA; SZYFRES, 2001), geralmente após a ingestão de alimentos ou água contaminados por fezes de animais. Alguns sorotipos só afetam hospedeiros específicos. Apesar de ser um agente primariamente intestinal, a *Salmonella* spp. pode estar difundida no meio ambiente em efluentes agrícolas, esgoto humano e em qualquer outro material sujeito a contaminação fecal humana ou animal. A ingestão do agente pode ser por carne, ovos e leite ou por frutas e legumes que foram fertilizados ou irrigados por resíduos fecais (OIE, 2010). Outras fontes dessa contaminação são por fômites, utensílios utilizados na preparação de alimentos, equipamentos e/ou pelo contato com águas poluídas (CARVALHO, 2006).

Quanto ao diagnóstico, o cultivo microbiológico ainda é a técnica mais confiável e se baseia no isolamento do organismo a partir de amostras com suspeita de

contaminação (tecidos corporais, fezes, suabes retais, amostras ambientais, produtos alimentícios e rações), utilizando técnicas microbiológicas de pré-enriquecimento, enriquecimento e ágaros sólidos seletivos para diferenciar salmonellas de outras enterobactérias. A confirmação definitiva do gênero *Salmonella* spp. é feita por meio de testes bioquímicos, sorológicos e moleculares. Ao final do isolamento recomenda-se o envio dos isolados para um laboratório de referência para tipificação dos sorotipos isolados (OIE, 2010).

Pesquisas relacionadas ao isolamento de sorotipos de *Salmonella* sp. em humanos fazem parte de estudos epidemiológicos mundiais (MCCULLOUGH; EISELE, 1951; L'ECUYER et al., 1996; SCHEIL et al., 1998; MULEY et al., 2004; WERBER et al., 2005; HALD et al., 2006; TORPDAHL et al., 2007; SHETH et al., 2011), assim como investigações de salmoneloses humanas atribuídas à eliminação do agente por testudines aquáticos (CDC, 2005; CDC, 2007; CDC, 2008; HOELZER; SWITT; WIEDMANN, 2011; CDC, 2012).

Nas fezes de répteis geralmente existe um predomínio de bactérias Gram-negativas em relação aos organismos Gram-positivos (BRITES, 2002). Os répteis são frequentemente portadores subclínicos de *Salmonella* spp. (OIE, 2010) e capazes de eliminá-la (MERMINE et al., 2004; CARVALHO, 2007), principalmente quando expostos à situação de estresse (EBANI; FRANTINI, 2005). Estudos realizados no Brasil comprovaram o isolamento de *Salmonella* spp a partir de suabes cloacais de diversas espécies de testudines (SÁ; SOLARI, 2001; LOPES, 2008; NUNES et al., 2010), e especificamente de *P. geoffroanus* (BRITES, 2002).

Poucos estudos relatam o isolamento deste patógeno de amostras de sangue de répteis (SOUSA et al., 2011).

O sucesso no isolamento e na identificação de *Salmonella* spp. depende da qualidade da amostra, do meio de cultura utilizado e das características de proliferação do sorotipo (OIE, 2010).

Para o diagnóstico em répteis, colheitas repetidas e seriadas das amostras são indicadas (MIRANDA et al., 2008), pois os animais apresentam uma eliminação intermitente do agente nas fezes (MERMINE et al., 2004). Para o isolamento de *Salmonella* spp. desses animais são necessários a utilização de protocolos específicos, como a utilização de caldo de enriquecimento seletivo tetracionato a 37°C

por 48 horas, seguido de plaqueamento em ágar XLT-4 mantido a 37°C por 24 horas (LOPES, 2008; MIRANDA et al., 2008).

Considerando o risco à saúde pública, pesquisas com *Salmonella* spp. nos animais e no ambiente, assim como seu monitoramento, são de relevância e interesse para a sociedade (LORENZON et al., 2010).

2.2. *Leptospira* spp.

A leptospirose é uma zoonose bacteriana, infectocontagiosa, de distribuição mundial. É causada por sorovariedades de espécies patogênicas do gênero *Leptospira* spp. (OIE, 2008), que são espiroquetas móveis, aeróbias, Gram-negativas, visualizáveis em microscopia de campo escuro. A infecção é comum em roedores e outros mamíferos selvagens e domésticos, inclusive no ser humano, sendo importante para saúde pública. Ocorre mais em países tropicais, devido à alta pluviosidade e à elevada temperatura ambiental (ACHA; SZYFRES, 2001). É considerada uma doença de veiculação hídrica de notificação compulsória (SÃO PAULO, 2009).

A infecção ocorre pela exposição do ser humano ou animais à urina contaminada ou ao ambiente contaminado pela mesma. A bactéria penetra em superfícies corporais (pele ou mucosas) íntegras ou lesionadas. No organismo do hospedeiro, o agente se replica, circula (bacteremia) e é eliminado pela urina (leptospirúria), contaminando o meio ambiente. A leptospirose pode ocorrer de forma esporádica ou em surtos epidêmicos e se caracteriza por duas fases, a leptospiremia e a leptospirúria (ACHA; SZYFRES, 2001).

O diagnóstico laboratorial de leptospirose pode ser feito pela detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pelo teste de soroaglutinação microscópica (SAM), que é considerado o teste sorológico padrão (OIE, 2008).

A fim de otimizar a sensibilidade da SAM, a literatura sugere que a escolha dos antígenos a serem testados, deve ser definida utilizando as sorovariedades representativas dos sorogrupos conhecidos na região geográfica do estudo e também as que já foram relatadas na espécie de estudo em outras localidades. Os soros são considerados reagentes quando apresentam reação de aglutininas igual ou maior que 50% (OIE, 2008). A diluição mínima padrão, a partir da qual o teste de SAM é

considerado positivo para répteis, ainda não foi estabelecida, sendo observados na literatura diversos valores, tais como 1:20 (ALVES JÚNIOR, 2013), 1:40 (SILVA et al., 2010) e 1:100 (ESTEVES et al., 2005; ALVES JÚNIOR et al., 2009; ALVES JÚNIOR et al., 2010).

A comprovação de *Leptospira* spp. em tecidos ou fluidos corporais pode ser obtida pela técnica de reação da cadeia da polimerase (PCR), que é bastante sensível (ACHA; SZYFRES, 2001).

Tanto o ser humano quanto os animais são suscetíveis a um grande número de sorovariedades, sendo observadas sorovariedades com predileção por determinados hospedeiros. Uma espécie animal pode ser acometida por várias sorovariedades simultaneamente (ACHA; SZYFRES, 2001), e os quadros clínicos e sua gravidade dependem de diversos fatores atribuídos tanto ao agente quanto ao hospedeiro (ACHA; SZYFRES, 2001; CORRÊA, 2007; OIE, 2008). Estudos de surtos de leptospirose em humanos foram realizados no Brasil (KO et al., 1999; SPICHLER et al., 2007) e no mundo (MORGAN et al., 2002; STERN et al., 2010). No Brasil foram detectados em testudines, anticorpos contra várias sorovariedades de *Leptospira* spp. (OLIVEIRA, 2003; ESTEVES, 2005; ALVES JÚNIOR et al., 2009; ALVES JÚNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2010; ALVES JÚNIOR, 2013) e especificamente em *P. geoffroanus* (SILVA et al., 2010). Porém estudos de correlação de resultados sorológicos com a detecção do antígeno por PCR em répteis ainda são raros (ALVES JÚNIOR, 2013).

2.3. *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha)

Os representantes da ordem Testudines estão classificados na classe Reptilia (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007), são pecilotérmicos, têm o corpo protegido por um casco ósseo e apresentam crânio anápsido (LEGLER; GEORGES, 1993; ROSSI, 2006). Essa ordem é constituída por 12 famílias, 90 gêneros e aproximadamente 280 espécies no mundo. Estima-se que 56 delas ocorram na América do Sul (BOYER; BOYER, 2006) e 19 espécies no Brasil (SOUZA, 2004). *Phrynops geoffroanus* é uma espécie bastante comum, que ocorre nas regiões amazônica, central e sul do Brasil, na Guiana, na Venezuela, na Colômbia, no Equador, no Peru, na Bolívia, no Paraguai

e no nordeste da Argentina (MOLINA, 2001; RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Seu *habitat* são rios, córregos e lagos (RUEDA-ALMONACID et al., 2007), em ambientes calmos com grande quantidade de matéria orgânica no fundo (SOUZA, 2004). Não está classificada pela International Union for Conservation of Nature (IUCN) como espécie ameaçada, nem incluída nos anexos da Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

Esta espécie de testudine é caracterizada pelo pescoço longo, que encolhe lateralmente, apresenta cristas na parte posterior da carapaça e barbilhões na região gular (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007), pela sua carapaça achatada e larga (Figura 1), com uma quilha única vertebral de cor escura e plastrão de tom avermelhado, laranja ou amarelo. Os pés são totalmente palmados, têm cinco garras nas patas do membro torácico e quatro nas dos membros pélvicos. Esta espécie tem a cabeça pequena e estreita em comparação com o corpo (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).



Figura 1: *P. geoffroyanus*. A: pescoço longo recolhido lateralmente. B: carapaça achatada e larga. Seta: barbilhões na região gular.

A massa corporal do adulto varia entre 0,6 e 4 Kg, tendo como média 2,5 Kg, e pode chegar até 35 cm de comprimento (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007), sendo esta maior medida atingida geralmente por fêmeas adultas. O dimorfismo sexual é pronunciado, quanto ao tamanho e massa corporal, os machos são menores e mais leves, têm caudas longas, grossas e têm cloacas mais distais do que nas fêmeas (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

É onívoro (MOLINA, 2001) e possui forrageamento ativo. Alimenta-se de peixes, insetos, artrópodes e moluscos, mas pode consumir frutas. Os juvenis têm uma dieta mais diversificada que os adultos (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

Pesquisadores brasileiros têm estudado *P. geoffroanus*, no sudeste brasileiro, quanto a sua ecologia em rios urbanos e poluídos com descargas orgânicas (SOUZA; ABE, 2000; SOUZA; ABE, 2001). Outras pesquisas estão relacionadas com presença e quantificação de metais pesados na corrente sanguínea (PIÑA et al., 2009), bioquímica do sangue, parasitologia (BRITES, 2002), hematologia (BRITES, 2002; FERRONATO, 2008; FERRONATO et al, 2009; RIBEIRO et al., 2009), microbiologia (BRITES, 2002; FERRONATO, 2008; FERRONATO et al, 2009) e imunidade (FERRONATO, 2008; GENOY-PUERTO, 2008). A capacidade desta espécie de se adaptar às condições ambientais adversas (SOUZA; ABE, 2000; SOUZA; ABE, 2001) favorece utilizá-la como objeto de pesquisa para verificação de sua participação epidemiológica, como portadores/reservatórios de agentes etiológicos de interesse em saúde pública.

Na literatura não foram encontradas pesquisas sobre *Leptospira* spp. e *Salmonella* spp. em *P. geoffroanus* de vida livre em ambiente antrópico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e período

O local de estudo deste trabalho foi o Córrego Cerradinho, um corpo d'água perene, classificado como reto para meandro encaixado, de fluxo normal de água do tipo turbulento corrente. Está localizado no município de Jaboticabal (21°15'22"S e 48°18'58"W), nordeste do Estado de São Paulo. Possui sua nascente na zona rural, próxima à divisa com o município de Monte Alto - SP. À montante da cidade, o córrego recebe influência rural de erosão do solo, prática agrícola, criação de animais, área de lazer e piscicultura. Na área urbana, corre paralelo uma avenida, as maiores influências são de esgoto doméstico, entulhos, escoamento superficial, produtos químicos e animais domésticos. A jusante, à aproximadamente 11 Km da nascente, ocorre a confluência com o Córrego Jaboticabal. Mais a frente deságua no Córrego Rico, que segue até o Rio Mogi Guaçu (BORGES, GALBIATTI, FERRAUDO, 2003). No trecho considerado (1,9 Km) do córrego (Figura 2), existiam barreiras de contenção nas duas margens (Figura 3A).

No período de fevereiro a maio de 2012 foram realizadas nesse local as capturas de *P. geoffroanus* e a colheita das amostras ambientais (água superficial do córrego e sedimento com água do fundo do córrego).

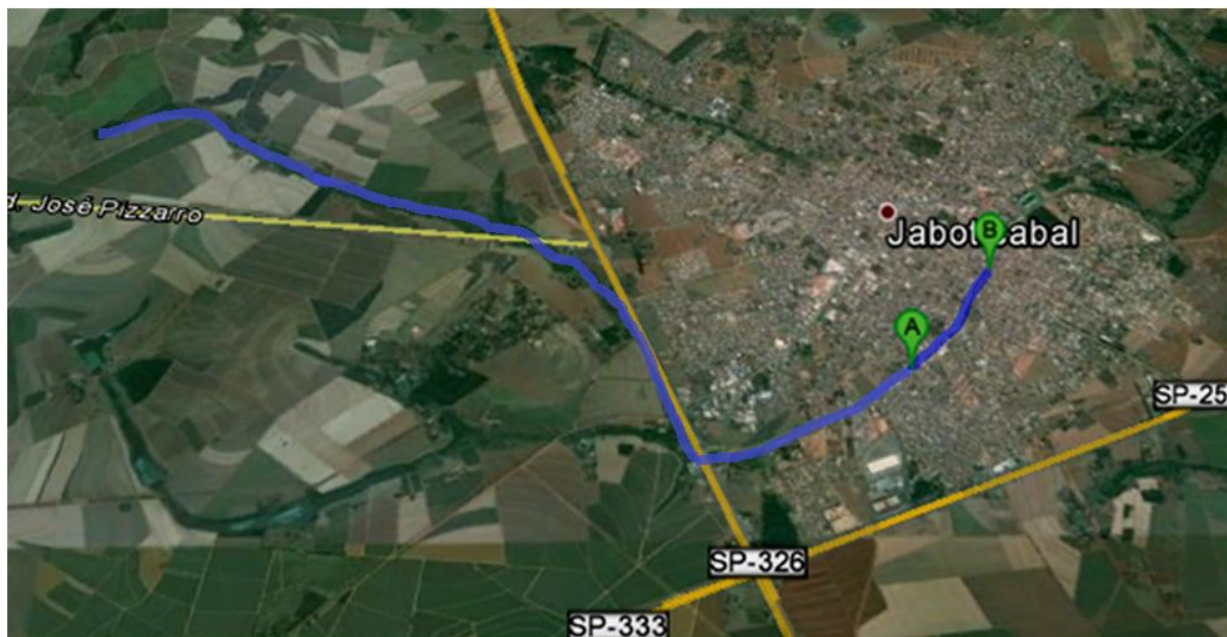


Figura 2: Mapa de Jaboticabal-SP com destaque para o percurso do Córrego Cerradinho, em azul e o trecho considerado para o estudo (A - B), onde ocorreram a colheita das amostras ambiental e animal no período de fevereiro a maio de 2012 (IMAGENS ©2013 Cnes/Spot Image, DigitalGlobe, GeoEye, TerraMetrics, Dados cartográficos ©2013 Google, MapLink, 2013).

3.2. Captura e alojamento de *Phrynos geoffroanus*

Todos os procedimentos relacionados com *P. geoffroanus* foram devidamente autorizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-Unesp nº 007842/11 (página viii) e pelo SISBIO nº 28440-1 (página ix e x).

A captura ativa foi realizada com puçás (Figura 3B), e os animais foram transportados em caixas plásticas até a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal (FCAV/Unesp), onde permaneceram durante três dias para a realização da marcação individual com microchip subcutâneo, marcação externa não invasiva (placa plástica numerada colada na carapaça) e a colheita de material biológico.



Figura 3: Ilustração de uma expedição no trecho urbano do Córrego Cerradinho, em Jaboticabal-SP, 2012. A: Aspecto das barreiras de contenção nas margens do córrego. B: Captura ativa de *P. geoffroanus* com puçá (seta).

Nesse período, os animais foram alojados nas dependências do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (HVGLN) da FCAV/Unesp, em caixas plásticas, com água e acesso ao sol e à sombra. Foram alimentados com ração para peixe com 28% de proteína bruta, carne de peixe, peixes vivos e carne de frango. Posteriormente, foram devolvidos ao Córrego Cerradinho, no mesmo local de sua captura.

3.3. Colheita das amostras biológicas de *Phrynops geoffroanus*

3.3.1. Suabe cloacal

Em cada expedição de captura (num total de seis expedições), foram capturados cinco animais, totalizando 30 animais. De cada animal, contido fisicamente, foram colhidas amostras de suabe cloacal por três dias consecutivos (Figura 4). O diâmetro do suabe utilizado variou de 2 a 5 mm, de acordo com o tamanho do animal. Cada suabe foi armazenado em um frasco com água peptonada

tamponada 1% e transportado, sob refrigeração, até o laboratório para ser submetido ao processamento microbiológico.



Figura 4: Colheita de suabe cloacal em *P. geoffroanus* contido fisicamente, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012.

3.3.2. Colheita de sangue

Após a antissepsia local, foi realizada a punção do seio venoso vertebral cervical, localizado dorso caudalmente ao crânio (Figura 5), utilizando agulhas hipodérmicas 13 x 0,45 mm ou 25 X 0,7 mm, esterilizadas, acopladas a seringas de 1 ou 3 mL, respectivamente e sem anticoagulante. O volume colhido respeitou o volume máximo para répteis, de 1% da massa corporal (CAMPBELL, 2006).



Figura 5: Punção do seio venoso vertebral cervical de *P. geoffroanus*, com o uso de agulha 13 x 0,45mm acoplada à seringa de 1 mL, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012. Observa-se a marcação não invasiva colada na carapaça (seta).

Três gotas de sangue, destinadas a cultura bacteriana, foram misturadas com 3 mL de água peptonada tamponada 1% e transportadas, sob refrigeração, até o laboratório para serem submetidas ao processamento microbiológico. O sangue restante foi destinado à obtenção de soro, que foi armazenado a -20°C para posterior pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

3.3.3. Lavados estomacal e cloacal

A colheita dos conteúdos estomacais e cloacais, realizada com sondas uretrais esterilizadas (uma para cada procedimento), ocorreu no mesmo dia da captura dos animais. Os tamanhos dos abre-bocas, das sondas (sonda nº 6, 8, 10 ou 12) e dos volumes de solução fisiológica (NaCl 0,9%) esterilizada administrados variaram conforme o tamanho de cada animal.

Inicialmente, para realização do lavado estomacal, foi mensurada a distância entre a cavidade oral e a abertura do estômago (Figura 6A) e feita uma marcação na sonda. Para manter a cavidade oral aberta, foram confeccionados “abre-bocas artesanais” de seringas plásticas descartáveis, semelhantes aos de Alves Júnior et al. (2011) (Figura 6B), que foram desinfetadas antes e após o uso. Em seguida, foi

introduzida a sonda de tamanho adequado para cada caso, até a marcação feita previamente.

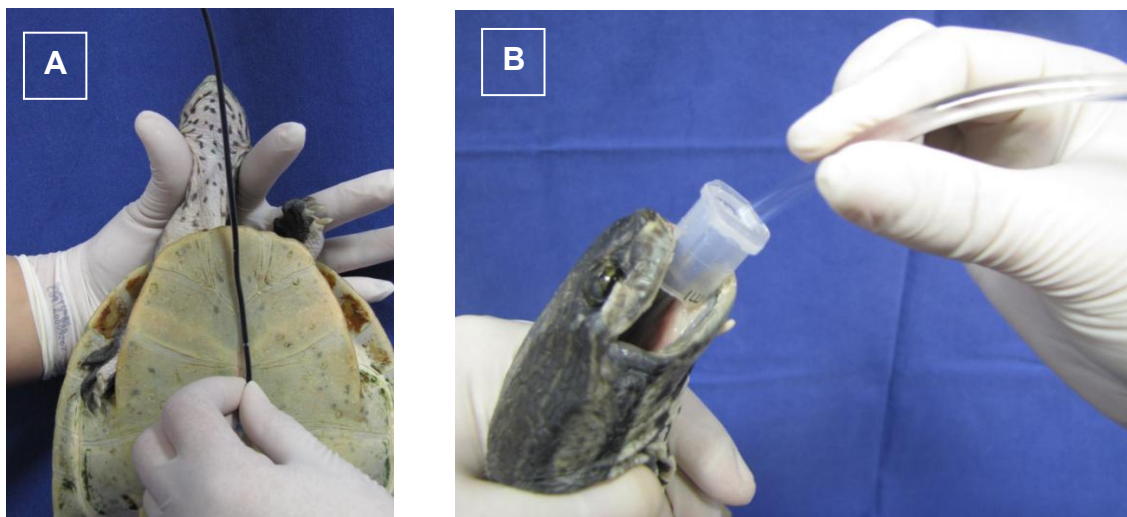


Figura 6: Procedimentos que antecederam o lavado estomacal em *P. geoffroanus*, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012. A: Mensuração do comprimento da sonda desde a cavidade oral até a abertura do estômago. B: Introdução da sonda pelo “abre-bocas artesanal”.

Em seguida foi administrado um volume de 0,5 mL a 10 mL de solução fisiológica esterilizada e recolhido aproximadamente a metade do volume, que foi fracionado em microtubos de 2 mL e congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

O lavado cloacal foi realizado com uma sonda uretral introduzida na cloaca e aplicado 0,5 a 1 mL de solução fisiológica esterilizada por 100 g de massa corporal (HERNÁNDEZ-DIVERS; HERNÁNDEZ-DIVERS, 2007) (Figura 7). O volume administrado foi recuperado quase integralmente e foi armazenado em microtubos de 2 mL, a -20°C , para posterior extração de DNA.



Figura 7: Realização de lavado cloacal em *P. geoffroanus*, utilizando uma sonda uretral e solução fisiológica esterilizadas, HVGLN - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012.

3.4. Colheita de amostras do meio ambiente

Os locais das colheitas de amostras ambientais variavam a cada expedição de captura. Cada vez foram realizadas três colheitas ao longo da extensão do trecho considerado, dentro do qual foram capturados os animais daquele dia. Sendo colhidas por local, uma amostra de água superficial da margem do córrego e uma amostra de sedimento com água do fundo do córrego do mesmo local, totalizando seis amostras ambientais por expedição.

A colheita das amostras ambientais (80 mL de água superficial e 8 g de sedimento com água do fundo do córrego) foi realizada diretamente com frascos identificados e esterilizados individuais de capacidade máxima de 100 mL. Os frascos com as amostras foram mantidos refrigerados em caixas isotérmicas, desde o local de colheita até o laboratório, onde foi realizado o processamento microbiológico.

3.5. Processamentos laboratoriais dos materiais colhidos

3.5.1. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada no Laboratório de Ornitopatologia (LO) do Departamento de Patologia Veterinária (DPVe) - FCAV/Unesp.

As amostras de suabe cloacal e de sangue de *P. geoffroanus* e de meio ambiente destinadas à pesquisa de sorotipos do gênero *Salmonella* foram transportadas sob refrigeração até o momento do processamento microbiológico. As etapas deste processamento foram: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em meios semissólidos, testes bioquímicos presuntivos e caracterização antigênica da estirpe bacteriana (prova sorológica).

Na etapa de pré-enriquecimento foram utilizados 3 mL de água peptonada tamponada a 1% (APT) (HIMEDIA-M616) para cada amostra de origem animal (três gotas de sangue ou um suabe cloacal). Das amostras de sedimento com água do fundo do córrego foi descartado a água sobrenadante e do sedimento foi utilizado uma alíquota de 8 g, à qual foi acrescentada 80 mL de solução de água peptonada 1%. Para a análise da água superficial do córrego (80 mL) foi acrescentado nesta 1,6 g do meio de cultura desidratado à base de peptona (APT) (HIMEDIA-M616), resultando em uma solução de concentração final de 1%. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de pré-enriquecimento, três alíquotas de cada amostra foram transferidas para caldos, sendo uma alíquota (1 mL) para 10 mL de caldo de enriquecimento seletivo selenito (OXOID-CM395) e incubado a 37°C por 24h; outra alíquota (1 mL) em 10 mL de caldo de enriquecimento tetrionato (Biolife-402125), incubados a 37°C por 48h e finalmente uma alíquota de 0,1 mL misturada com 10 mL de caldo de enriquecimento seletivo rappaport (OXOID-CM669), incubados a 37°C por 24 horas. Dessa maneira, cada amostra originou três alíquotas distintas.

Após o enriquecimento seletivo, alíquotas de cada caldo foram plaqueadas com auxílio de uma alça de platina, pela técnica de esgotamento, em três diferentes meios de cultivo: ágar verde brilhante (OXOID-CM263), ágar MacConkey (OXOID-CM0115) e ágar XLT-4 (xilose lisina tergitol 4) (DIFCO-223420); que foram incubados

a 37°C por 24 horas. Assim, nessa etapa, uma amostra inicial já derivou nove alíquotas distintas.

Das culturas obtidas de cada meio do plaqueamento seletivo, uma a três colônias sugestivas de *Salmonella* foram inoculadas em dois tubos diferentes, contendo ágar TSI inclinado (tríplice açúcar ferro) (OXOID-CM277) e ágar LIA (ferro lisina) (OXOID-CM381), sendo novamente incubadas a 37°C por 24 horas, para a identificação bioquímica presuntiva.

Das culturas cuja identificação bioquímica foi compatível com o gênero *Salmonella*, uma amostra das colônias do meio TSI foi cultivada em placa contendo meio ágar LB (DIFCO-240110) a 37°C por 24h. Após a incubação, as colônias sugestivas do gênero *Salmonella* foram submetidas à caracterização antigênica do sorotipo bacteriano (prova sorológica), pelo teste de aglutinação em lâmina, com soros polivalentes antiantígenos somáticos (O) e flagelares (H) de *Salmonella* spp. (Probac do Brasil).

As amostras sorologicamente positivas foram separadas em duas alíquotas. De uma foi extraído o DNA pelo método de fervura e posteriormente realizada a reação de PCR para identificação do gene *InvA* (796 pb) (FRATAMICO, 2003), procedimento padrão no Laboratório de Ornitopatologia, como método confirmatório para o gênero *Salmonella* (CAMPELLO, 2012). A outra alíquota foi inoculada em duplicata em tubos contendo ágar LB (DIFCO-240110), inclinado, incubados a 37°C por 24h e em seguida mantidos sob refrigeração (4°C), para ser posteriormente enviada ao Laboratório de Enterobactérias do Centro de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ-RJ, para tipificação dos sorotipos, baseada no esquema Kauffman-White. As etapas do isolamento e identificação de *Salmonella* spp. descritos acima, estão resumidos no Apêndice A.

3.5.2. Detecção anticorpos anti-*Leptospira* spp.

A sorologia para a detecção dos anticorpos anti-*Leptospira* spp., resultantes da infecção por *Leptospira* spp. foi realizada no Laboratório de Diagnóstico de Brucelose

e Leptospirose (LDBL) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (DMVPRA) - FCAV/Unesp.

A detecção de anticorpos foi realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). Os soros sanguíneos foram descongelados e diluídos em solução tamponada de Sørensen, na diluição inicial de 1/5. Dessa diluição, alíquotas de 50 µL foram colocadas em placas de poliestireno de fundo em formato de U. Sobre as alíquotas foi adicionada quantidade igual de antígeno, o que resultou na diluição de 1/10.

As 24 sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas como antígenos, foram: Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sentot, Shermani, Tarassovi, Whitcombi e Wolffi. Estes antígenos foram provenientes de matrizes, replicadas semanalmente em meio de cultura líquido de EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris) (DIFCO-715485), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear, e mantidas em estufa bacteriológica BOD a 28°C.

A mistura soro-antígeno foi levemente agitada e incubada em estufa bacteriológica BOD à temperatura de 28°C, por duas horas. A seguir, foi realizada a leitura por microscopia de campo escuro (microscópio ZEISS - Axio Imager A1), diretamente nos poços da placa, com objetiva e ocular de 10x. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação, ou seja, metade das bactérias aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. Os soros reagentes a esta primeira diluição foram reexaminados com diluições seriadas de razão dois, até a diluição máxima de 1:2.560. O título do soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição que apresentou pelo menos 50% de aglutinação do antígeno. Foram considerados como positivos os soros reagentes com diluições \geq 1:10 (ponto de corte).

3.5.3. Detecção de material genômico de *Leptospira* spp.

A detecção da presença de *Leptospira* spp. por PCR foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (DMVPRA) - FCAV/Unesp.

A partir de amostras de lavados estomacais e cloacais armazenados a -20°C, foi realizada a extração de DNA, de acordo com o protocolo de Biase et al. (2002), com alguns ajustes propostos pelo Laboratório de Epidemiologia Molecular da FCAV-UNESP, a fim de otimizá-la. Para a extração de DNA, transferam-se 400 µL de cada amostra para eppendorfs de 2 mL e a estes acrescentaram-se 800 µL de tampão de extração [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 25 mM pH 8.0, NaCl 400 mM e SDS 0,5% (p/v)]. As amostras foram agitadas em “vortex” e mantidas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, sendo gentilmente agitadas a cada 10 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 400 µL de acetato de potássio 5 M à solução, que foi misturada por inversão. Nesta etapa, as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi transferido para tubos novos, aos quais acrescentaram-se 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As soluções foram misturadas por inversão durante três minutos e, posteriormente, centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 10°C. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para tubos novos, cuidadosamente, para não tocar na interface inferior. Posteriormente, foram acrescentados 1.000 µL de etanol absoluto gelado, e a solução, após ser misturada gentilmente, foi mantida a -20°C ‘over night’. Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 13.400 x g por 15 minutos a 10°C. A fase líquida foi descartada e o *pellet* foi lavado com 1.000 µL de etanol 70% (v/v). Após a centrifugação sob as mesmas condições anteriores, a fase líquida foi novamente descartada e o *pellet* foi colocado para secar em temperatura ambiente ±25°C por 60 minutos. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 30 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e mantido durante 24 horas a 4°C.

Após a extração do DNA, a identificação da presença de *Leptospira* spp. nas amostras foi realizada mediante amplificação de um fragmento de 331 pb com o

emprego do par de primers Lep1 (5' - GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG - 3') e Lep2 (5' - TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT- 3') (MÉRIEN et al., 1992). A cepa de *Leptospira* spp. utilizada como controle positivo foi cedida pelo LDBL do DMVPRA - FCAV/Unesp.

A amplificação do fragmento foi realizada com a utilização de tampão 1x [100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40]; MgCl₂ 2,0 mM; dNTP's 0,2 mM; Primer Lep1/Lep2 5 pmol; Taq polimerase 1 U; 7,0 µL DNA genômico estoque (aproximadamente 100 ng/µL); água milli Q esterilizada q.s.p. 20 µL.

A reação de amplificação ocorreu em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) programado para realizar um ciclo a 94°C por 4 minutos (desnaturação inicial); 35 ciclos repetidos a 94°C por um minuto (desnaturação), 60°C por um minuto (anelamento do primer) e 72°C por um minuto e meio (extensão da fita de DNA); e por fim um ciclo a 72°C por 10 minutos (extensão final).

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TEB 1X (Tris-EDTA-Ácido bórico) corado com GelRed™ 1x (Uniscience) e padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). A visualização dos fragmentos foi realizada sob luz ultravioleta através de equipamento de fotodocumentação GEL DOC XR (BioRad).

3.6. Análise dos dados

Para a comparação entre as proporções de resultados positivos nos testes laboratoriais, no caso de amostras independentes, foi utilizado o teste de qui-quadrado, ou o teste exato de Fisher, quando as exigências do teste qui-quadrado não foram atendidas (frequências esperadas menores que 5). No caso de amostras relacionadas foi utilizado o teste binomial. Adotou-se o nível de significância (p) de 5% (BHATTACHARYYA; JOHNSON, 1977; SIEGEL, CASTELLAN JR., 2006). Os cálculos foram efetuados utilizando o software R (R Core Team, 2013).

Para avaliar a confiabilidade entre a associação dos resultados de SAM e PCR para *Leptospira* spp., foram utilizadas duas metodologias de análise: a análise de concordância-Kappa, em que valores dessa medida abaixo de 0,2 sugerem

concordância pobre; entre 0,21 a 0,4, concordância razoável; entre 0,41 a 0,6, concordância moderada; entre 0,61 a 0,8, concordância boa e entre 0,81 a 1, concordância muito boa (ALTMANN, 1999); e a análise bidimensional utilizando o coeficiente φ de Pearson ($-1 \leq \varphi \leq 1$) (BHATTACHARYYA; JOHNSON, 1977).

4. RESULTADOS

Durante o período de fevereiro a maio de 2012 foram capturados no total 84 *P. geoffroanus*, sendo 54 adultos, 27 jovens (subadultos) e três filhotes. Quanto ao sexo, foram 52 machos, 31 fêmeas e um indeterminado (filhote muito pequeno).

No decorrer do período de captura houve um evento de poluição no Córrego Cerradinho (mês de abril), atribuído ao composto de carbamato, identificado em amostras biológicas de *P. geoffroanus* enviadas ao CEATOX-Unesp, Câmpus de Botucatu. Tal evento desencadeou acentuada mortalidade de *P. geoffroanus* e de peixes e comprometeu a higidez dos animais sobreviventes, capturados nas expedições subsequentes.

A quantidade de amostras biológicas obtidas para processamentos laboratoriais estão descritas na Figura 8.

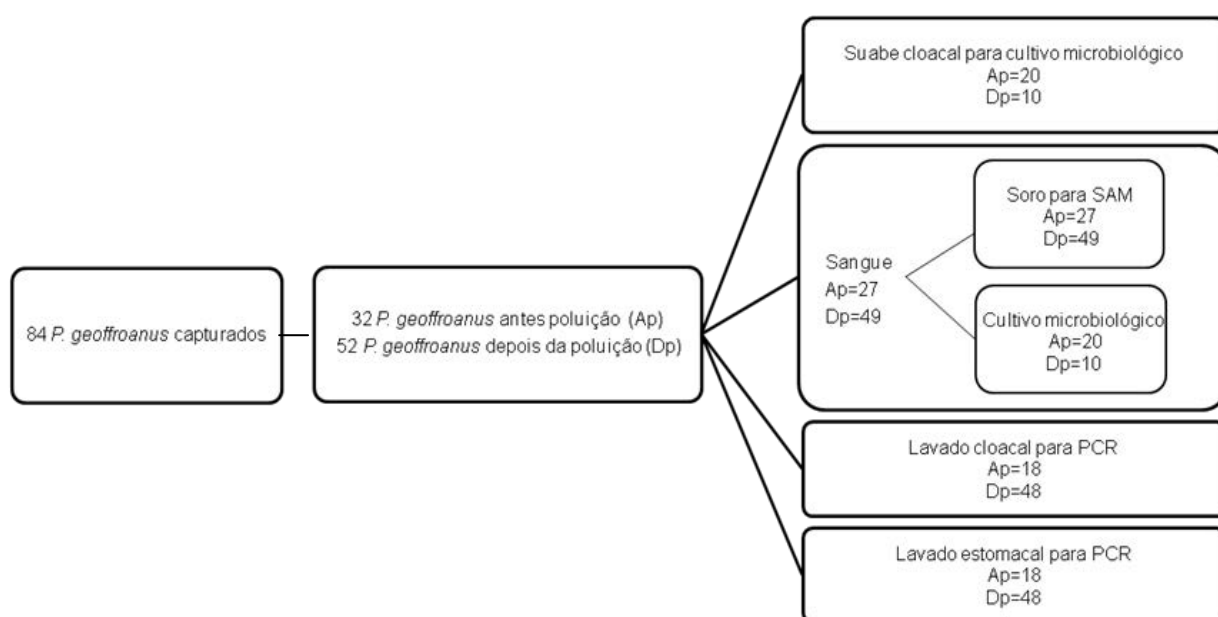


Figura 8: Diagrama do número de *P. geoffroanus* capturados no Córrego Cerradinho em Jaboticabal-SP de fevereiro a maio de 2012, e a quantidade de amostras biológicas colhidas para os diversos processamentos laboratoriais realizados na FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012. Ap: antes da poluição ambiental; Dp: depois da poluição ambiental.

4.1. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Todos os isolados de *Salmonella* spp. oriundos de *P. geoffroanus* e de amostras ambientais foram obtidos utilizando os caldos de enriquecimento seletivos tetrationato (37°C - 48h) ou selenito (37°C - 24h), seguidos de plaqueamento em meio XLT-4 (37°C - 24h). Quando foi utilizado o caldo de enriquecimento seletivo rappaport, não houve isolamento do agente.

4.1.1. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. oriunda de amostras de *P. geoffroanus*

De 30 *P. geoffroanus* foram realizados cultivos bacteriológicos de amostras de sangue (n=30), sendo 20 amostras oriundas de animais capturados antes do evento de poluição ambiental e 10 capturados após. Da mesma forma foram, colhidas três realizadas seriadas de suabes cloacais, totalizando 60 amostras de suabe antes e 30 após o evento de poluição ambiental.

Das amostras de sangue não foi isolado sorotipo de *Salmonella* spp. Por outro lado, ocorreu isolamento de sorotipos de *Salmonella* spp. oriundos de suabes cloacais de *P. geoffroanus* capturados antes e após o evento de poluição ambiental (Tabela 1). Pelo teste exato de Fisher ($p = 0,0312$), observou-se diferença estatisticamente significativa na quantidade de animais positivos para *Salmonella* spp. após o evento.

Tabela 1: Quantidade de *P. geoffroanus* capturados, suabes realizados e frequência (%) de isolamento de *Salmonella* spp. no período de fevereiro a maio de 2012, em Jaboticabal-SP.

Período de captura	Nº de <i>P. geoffroanus</i> capturados	Nº de suabes examinados	Nº de positivos animais/suabes	Frequência de positividade (%)
Antes da poluição	20	60	1/1	1/60 = 1,67%
Após a poluição	10	30	4/9	9/30 = 30 %

Com exceção de um isolado (C₃₉ - suabe do 1º dia), todos os suabes restantes (n=9) foram detectados de amostras oriundas de *P. geoffroanus* capturados após o evento de poluição ambiental.

Das amostras dos suabes cloacais, foram isolados três sorotipos de *Salmonella* spp. (*S. Tennessee*, *S. Mbandaka* e *S. Oranienburg*) oriundos de cinco animais diferentes (10 suabes), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, resultantes do cultivo microbiológico de suabes colhidos em três dias consecutivos de 30 *Phrynops geoffroanus*, no período de fevereiro a maio de 2012, em Jaboticabal-SP.

Amostras (Nº total de analisadas/ Nº de positivas)	Sorotipo isolados	Identificação da amostra C _{nº}			
		1º dia	2º dia	3º dia	
Suabes cloacais (90/10)	<i>S. Tennessee</i>	C ₃₉ *			
	<i>S. Mbandaka</i>	C ₄₂			
	<i>S. Oranienburg</i>			C ₄₀	C ₄₀
				C ₄₂	C ₄₂
			C ₄₃	C ₄₃	C ₄₃
			C ₄₄		

C_{nº}= identificação do *Phrynops geoffroanus*; *= amostra obtida de *P. geoffroanus* capturado antes do evento da poluição ambiental.

Na tabela acima pode-se observar que, quando realizado suabe apenas no 1º dia, ocorreu isolamento do agente de amostras de três *P. geoffroanus* (C₃₉, C₄₂, C₄₃), quando realizado suabe no 1º e 2º dias foi isolado o agente de amostras de quatro *P. geoffroanus* (C₃₉, C₄₀, C₄₂, C₄₃) e realizando-se três colheitas em dias consecutivos foi isolado o agente de amostras de cinco *P. geoffroanus* (C₃₉, C₄₀, C₄₂, C₄₃, C₄₄). Todavia, pelo teste binomial, não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto à obtenção de isolamento de *Salmonella* spp. em três ou em uma colheita (p = 0,5), e em três ou em duas colheitas (p = 1).

Também se observou isolamento de sorotipos diferentes (*S. Mbandaka* e *S. Oranienburg*), oriundos de amostras de um mesmo *P. geoffroanus* (C₄₂), porém em dias diferentes.

Estes isolados foram obtidos apenas quando o protocolo incluiu o caldo de enriquecimento seletivo tetracionato (37°C - 48h) e posterior plaqueamento em meio

XLT-4 (37°C - 24h). Embora essa metodologia tenha resultado no isolamento de *Salmonella* spp. de cinco dos 30 animais examinados, e os outros métodos microbiológicos não tenham resultado em nenhum isolamento, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,0625$), pelo teste binomial.

A associação entre os fatores idade ou sexo, com o período (antes e após a poluição ambiental), não foi estatisticamente significativa, em nenhuma das comparações, pelo teste exato de Fisher.

4.1.2. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. oriunda de amostras ambientais

Foram colhidas no total 36 amostras do ambiente, sendo 18 oriundas de água superficial da margem do córrego e 18 de sedimento com água do fundo do córrego do mesmo local. Destas 18 amostras de cada material, 12 foram colhidas antes do evento de poluição ambiental e seis após.

Das 18 amostras de água superficial do córrego, foi isolado apenas um sorotipo de *Salmonella* spp. (*S. Mbandaka*), oriundo de uma única amostra (A_{15}), sendo utilizado o protocolo de caldo de enriquecimento seletivo tetrionato (37°C - 48h), seguido de plaqueamento em meio XLT-4 (37°C - 24h), para obtê-lo. Tal amostra foi colhida após a poluição ambiental. O teste exato de Fisher mostrou não ser estatisticamente significativa ($p = 0,3333$) a diferença entre as amostras colhidas antes e após o evento de poluição ambiental. Em relação ao o isolamento de *Salmonella* spp. de água superficial do córrego, o protocolo microbiológico que incluiu o caldo tetrionato, não diferiu significativamente de nenhum dos outros protocolos ($p = 1$), pelo teste binomial.

Do total de 18 amostras de sedimento com água do fundo do córrego, 11 foram positivas, para sete sorotipos de *Salmonella* spp. (*S. Tennessee*, *S. Anatum*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Worthington*, *S. Senftenberg* e *S. Idikan*) (Tabela 3).

Tabela 3: Sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolados de amostras de sedimento com água do fundo do córrego, colhidas no período de fevereiro a maio de 2012, em Jaboticabal-SP.

Amostras (Nº total de analisadas/ Nº de positivas)	Sorotipos isolados	Identificação das amostras
Sedimento (18/11)	S. Tennessee	S ₁
	S. Anatum	S ₂ ^{SL} S ₃ ^{SL}
	S. Typhimurium	S ₅ ^{SL} S ₅ ^{SL}
	S. Mbandaka	S ₄ S ₆ S ₈ S ₉
	S. Worthington	S ₇
	S. Senftenberg	S ₁₆ ^{**} S ₁₈ ^{**}
	S. Idikan	S ₁

S_n= identificação da amostra do sedimento com água do fundo do córrego; ^{SL}= amostras isoladas utilizando caldo selenito no protocolo; ** = amostra colhida após o evento da poluição ambiental.

Do total das 11 amostras de sedimento com água do fundo do córrego, nove foram colhidas antes do evento de poluição ambiental (de S₁ até S₉) e apenas duas amostras foram colhidas após o evento (S₁₆ e S₁₈). Pelo teste exato de Fisher ($p = 0,1165$), não houve interferência estatisticamente significativa do evento sobre o isolamento de *Salmonella* spp.

Das amostras analisadas, duas (S₃ e S₅) foram positivas para *Salmonella* spp. utilizando-se o caldo de enriquecimento seletivo selenito (37°C - 24h), seguido de plaqueamento em meio XLT-4 (37°C - 24h). As 10 amostras (S₁, S₂, S₄, S₅, S₆, S₇, S₈, S₉, S₁₆ e S₁₈) foram positivas no caldo de enriquecimento seletivo tetrionato (37°C - 48h), com plaqueamento em meio XLT-4. A comparação entre o uso do caldo tetrionato com o uso caldo selenito, revelou diferença estatisticamente significativa, pelo teste binomial ($p = 0,03906$).

4.2. Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp., pela técnica de SAM, foi realizada com 76 amostras de soro colhidas, das quais 50 (65,8%) apresentaram reatividade sorológica a uma ou mais sorovariedades concomitantemente (Tabela 4). Das 24 sorovariedades de *Leptospira* spp. testadas, foram detectados anticorpos contra 18, sendo elas: Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohemorrhagiae, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sentot, Shermani, Whitcombi e Wolffi.

Tabela 4: Frequência da quantidade de sorovariedades de *Leptospira* spp. detectadas em soros de *P. geoffroanus* (n=76) testados pela técnica de soroaglutinação microscópica e a discriminação das sorovariedades.

Quantidade de sorovariedades	<i>P. geoffroanus</i> % (n)	Sorovariedades detectadas
1	17,1% (13)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Canicola, Castellonis
2	18,4% (14)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Canicola, Icterohemorrhagiae, Australis, Shermani, Castellonis, Grippytyphosa
3	10,5% (8)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Canicola, Icterohemorrhagiae, Hebdomadis, Shermani, Pomona
4	3,9% (3)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Canicola, Icterohemorrhagiae, Australis, Andamana, Whitcombi
5	9,2% (7)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Canicola, Icterohemorrhagiae, Australis, Castellonis, Sentot, Grippytyphosa, Pomona, Butembo, Wolffi
6	1,3% (1)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Icterohemorrhagiae, Sentot
7	2,6% (2)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Canicola, Icterohemorrhagiae, Australis, Hebdomadis, Shermani, Whitcombi, Bataviae
8	2,6% (2)	Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Canicola, Icterohemorrhagiae, Australis, Hebdomadis, Shermani, Andamana, Sentot

A relação das sorovariedades por ordem de frequência e as respectivas titulações foram registradas na Tabela 5.

Tabela 5: Relação das sorovariedades de *Leptospira* spp., quantidade de *P. geoffroanus* sororreativos com sua respectiva diluição no teste de SAM.

Sorovariedade	Total de <i>P. geoffroanus</i>	<i>P. geoffroanus</i> por titulação	
Pyrogenes	29	11	1:10
		5	1:20
		5	1:40
		2	1:80
		6	1:160
Copenhageni	24	7	1:10
		3	1:20
		4	1:40
		6	1:80
		3	1:160
Patoc	16	1	1:1.280
		11	1:10
		3	1:20
		2	1:40
		6	1:10
Autumnalis	15	5	1:20
		1	1:40
		1	1:80
		2	1:160
		12	1:10
Canicola	15	1	1:20
		2	1:40
		8	1:10
Icterohemorrhagiae	15	4	1:20
		3	1:40
		3	1:10
Australis	6	1	1:20
		1	1:40
		1	1:160
		3	1:10
Hebdomadis	4	1	1:20
		3	1:10
Shermani	4	4	1:10
Castellonis	4	3	1:10
		1	1:20
Sentot	4	3	1:10
		1	1:20
Whitcombi	3	3	1:10
Andamana	2	1	1:20
		1	1:40
Grippotyphosa	2	1	1:20
		1	1:40
Pomona	2	2	1:10
Bataviae	1	1	1:10
Butembo	1	1	1:20
Wolffi	1	1	1:10

Quanto ao evento da poluição ambiental, 27 amostras de soro foram colhidas antes do evento, das quais 17 (63%) apresentaram reatividade sorológica. Das 49 amostras de soro colhidas após o evento, 33 (67,3%) foram sororreativas. Pelo teste qui-quadrado não foi observada diferença significativa na sororreatividade das amostras colhidas antes e após o evento ($p = 0,3499$).

4.3. PCR para identificação de *Leptospira* spp.

A PCR para identificação de *Leptospira* spp. em lavado estomacal e cloacal foi realizada em 132 amostras de 66 *P. geoffroanus* (Figura 9). Das 36 amostras colhidas (lavado estomacal e cloacal) antes do evento de poluição ambiental, três (8,33%) (duas de lavado estomacal e uma de lavado cloacal, de animais distintos) apresentaram amplificação específica. Das 96 amostras colhidas após o evento, oito (8,33%) (seis de lavado estomacal e duas de lavado cloacal, de animais distintos), revelaram material genômico de *Leptospira* spp.

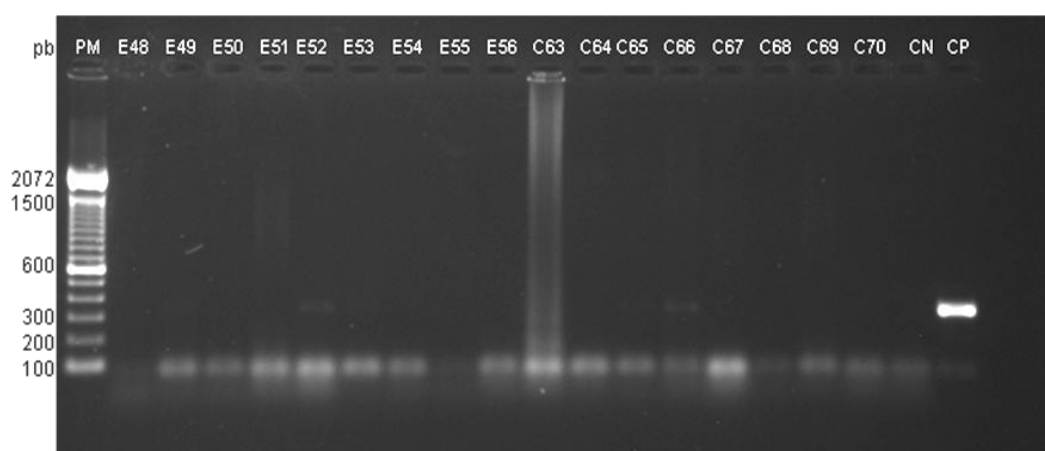


Figura 9: Amplificação específica de *Leptospira* spp. As amostras de lavado estomacal (E52) e cloacal (C66) apresentaram amplificação (331 pb) de *Leptospira* spp. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). CN: controle negativo (mix sem DNA). CP: controle positivo.

Ao aplicar o teste exato de Fisher, nos resultados obtidos da PCR, não foi observada diferença significativa entre os períodos de colheita antes e após o evento de poluição ambiental ($p = 0,6562$).

4.4. Relação entre os resultados das técnicas de sorologia microscópica (SAM) e PCR para diagnóstico de *Leptospira* spp.

Para confrontar os resultados da sorologia e da detecção de material genômico de *Leptospira* spp., utilizaram-se as amostras obtidas de 66 *P. geoffroanus*. Na Tabela 6 constam os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e da detecção de material genômico de *Leptospira* spp. de amostras estomacal/cloacal, por período (antes e após a poluição ambiental).

Tabela 6: Relação entre os resultados das técnicas de PCR e SAM para *Leptospira* spp., em 66 *P. geoffroanus* capturados no Córrego Cerradinho, Jaboticabal-SP, no período de fevereiro a maio de 2012, antes e depois do evento de poluição ambiental.

Resultado da técnica		Período de colheita das amostras	
PCR	SAM	Antes (n=18)	Depois (n=48)
Detectado	Reativo	2	3
Detectado	Não reativo	1	5
Não detectado	Reativo	9	29
Não detectado	Não reativo	6	11

Como já foi descrito no item 4.2, considerando apenas os resultados da técnica de SAM, e no item 4.3, relacionado aos resultados isolados da técnica da PCR, não houve significância estatística nos períodos antes e após o evento de poluição ambiental. Ao se aplicar o teste exato de Fisher nos resultados das técnicas diagnósticas (SAM e PCR), associando-os em cada um dos períodos (antes e após o evento), também não se observou diferença significativa entre estas técnicas tanto para o período antes ($p = 0,674$) como após o evento ($p = 0,0689$).

Foi observado baixo grau de concordância entre os testes de sorologia e biologia molecular ($Kappa = - 0,11$), assim como fraca associação entre os mesmos em análise bidimensional utilizando o coeficiente de Pearson ($\varphi = - 0,18$).

No Apêndice B foram relacionados os indivíduos capturados antes ou após a poluição ambiental, seus resultados da PCR de amostras estomacais e cloacais e da

sorologia, com detalhamento das sorovariedades detectadas e seus respectivos títulos sorológicos.

O teste exato de Fisher, aplicado aos resultados de detecção dos agentes/anticorpos de *Leptospira* spp., por período (antes e após poluição ambiental), mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as idades, bem como entre os sexos ($p > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A pesquisa de agentes etiológicos em testudines aquáticos de ambiente antrópico é considerada uma relevante ação para melhor conhecimento dos animais e de seu *habitat*. Este mesmo ambiente, ao qual os seres humanos e/ou animais domésticos estão expostos, favorece a possibilidade de transmissão de patógenos, comprometendo a saúde pública (BRITES, 2002).

O êxito no isolamento de *Salmonella* spp. depende da metodologia aplicada, sendo necessário o uso de protocolo específico (LOPES, 2008; MIRANDA et al., 2008; OIE, 2010). Das amostras de *P. geoffroanus* foi isolado o agente quando utilizado caldo tetrionato (37°C - 48h) e plaqueamento em XLT-4 (37°C - 24h), semelhante ao descrito na literatura. Todavia, os mesmos autores referem sucesso no isolamento utilizando o caldo rappaport (LOPES, 2008; MIRANDA et al., 2008), fato não constatado no presente estudo. No presente estudo não foi identificada diferença estatisticamente significativa, pelo teste binomial.

O isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras de sedimento com água do fundo do córrego, foi estatisticamente significativo, pelo teste binomial, como mencionado nos resultados, quando utilizados os caldos de tetrionato (37°C - 48h) ou selenito (37°C - 24h), seguidos do meio de plaqueamento XLT-4 (37°C - 24h). A partir das amostras de água superficial, só foi observado isolamento da bactéria quando utilizado o caldo tetrionato (37°C - 48h), seguido do meio de plaqueamento XLT-4 (37°C - 24h), fato estatisticamente não significativo, pelo teste binomial, com relação ao uso dos outros demais caldos. Na literatura pesquisada, referente ao isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras ambientais, não foram encontrados trabalhos com protocolos laboratoriais (meios e temperatura/ tempo de incubação) idênticos aos aplicados neste trabalho.

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa pelo teste binomial de duas proporções, entre as colheitas seriadas de suabes de *P. geoffroanus*, observou-se que ao se colher amostras repetidas de um mesmo animal aumentou a possibilidade de detectar o agente. Tal observação é justificada pela eliminação intermitente do agente pelos répteis (MERMIN et al., 2004). A fim de

detectar os animais portadores e os indivíduos livres da eliminação do agente, é importante a realização de colheitas repetidas (MIRANDA et al., 2008).

Na colheita repetida de suabes de um mesmo *P. geoffroanus* observou-se o isolamento de dois sorotipos (*S. Mbandaka* e *S. Oranienburg*), indicando que os répteis podem ser portadores de vários agentes simultaneamente, como foi verificado na literatura (LOPES, 2008).

Apesar de o objetivo inicial deste trabalho não incluir a abordagem dos efeitos de um evento de poluição ambiental acidental, considerou-se relevante a comparação dos resultados laboratoriais obtidos das amostras colhidas antes e após o evento. Houve diferença estatisticamente significativa, pelo teste exato de Fisher, quanto à frequência de isolamento de *Salmonella* spp. de *P. geoffroanus* antes (5%) e após (40%) o evento de poluição ambiental. Assim, os resultados deste estudo sugerem que o evento alterou a homeostase (higidez) e possivelmente tenha influenciado na imunidade dos animais. Segundo Ebani e Frantini (2005), situações de estresse representam importante fator na eliminação do agente. Nesta pesquisa, observou-se, que não houve diferença estatística significativa, pelo teste exato de Fisher, entre o isolamento de *Salmonella* spp. de amostras ambientais, antes e após a poluição, apesar de numericamente existir uma diferença entre a quantidade de amostras de sedimento com água do fundo do córrego positivas, antes (n=9) e após (n=2). Seria de interesse verificar uma possível influencia do carbamato no ambiente (sedimento), interferindo, assim, na viabilidade desta bactéria. Da mesma forma, o isolamento de *Salmonella* spp. da água superficial, observada somente após o acidente ambiental, pode estar relacionado com a maior eliminação do agente por parte dos animais, como descrito anteriormente, contaminando o ambiente.

De 30 *P. geoffroanus*, foram isolados três sorotipos de *Salmonella* spp., dos quais, o sorotipo *S. Oranienburg* (13,33%) foi o mais frequente seguido por *S. Tennessee* (3,33%) e *S. Mbandaka* (3,33%). Das 18 amostras examinadas de sedimento com água do fundo do córrego, foram isolados sete sorotipos de *Salmonella* spp., sendo *S. Mbandaka* (22,22%) o mais frequente, seguido de *S. Anatum* (11,11%), *S. Senftenberg* (11,11%), *S. Typhimurium* (5,56%), *S. Tennessee* (5,56%), *S. Worthington* (5,56%) e *S. Idikan* (5,56%). Das 18 amostras de água superficial do córrego, ocorreu isolamento de *Salmonella* spp. de apenas uma

amostra (5,56%), e o sorotipo isolado foi *S. Mbandaka*. Os dados acima mostram que ocorreu isolamento do sorotipo *S. Mbandaka* tanto dos animais, como do ambiente (água e sedimento) e *S. Tennessee* foi isolado de amostra do sedimento e de *P. geoffroanus*.

Todos esses sorotipos são potencialmente patogênicos para o ser humano (MCCULLOUGH; EISELE, 1951; L'ECUYER et al., 1996; SCHEIL et al., 1998; MULEY et al., 2004; WERBER et al., 2005; HALD et al., 2006; TORPDAHL et al., 2007; SHETH et al., 2011). As infecções por *Salmonella* spp. em humanos, relacionadas ao contato com répteis tendem a estar mais associadas a sintomatologias sistêmicas, do que as infecções por origem alimentar (HOELZER; SWITT; WIEDMANN, 2011), e causam quadros severos que podem levar à morte (CDC, 2007; 2012).

A literatura cita que os répteis podem atuar como importantes reservatórios de *Salmonella* spp. (LOPES, 2008) e possuem a capacidade de eliminá-la (MERMIN et al., 2004; CARVALHO, 2007; OIE, 2010), principalmente quando submetidos a situação de estresse (EBANI; FRANTINI, 2005).

Nos Estados Unidos, existem relatos de casos de diversos sorotipos de *Salmonella* spp. acometendo humanos, que tiveram contato direto e/ou indireto com répteis. Os genótipos dos sorotipos de *Salmonella* spp., de isolados humanos e de isolados de testudines aquáticos ou seus respectivos *habitats* foram indistinguíveis por PFGE (pulsed field gel electrophoresis) (CDC, 2005; 2007; 2008; 2012), indicando que os animais e os seres humanos compartilham os mesmos agentes.

No Brasil, existem estudos em diversas espécies de testudines aquáticos cativos, incluindo *Trachemys scripta elegans* (tigre-d'água-de-orelha-vermelha), das quais foram isolados de suas fezes cloacais os sorotipos: *S. Albany*, *S. Kottbus*, *S. Litchfield*, *S. Loanda*, *S. Newport*, *S. Typhimurium* e *S. 60:r:z* (SÁ; SOLARI, 2001). Em outras espécies de testudines aquáticos foram descritos subespécies e sorotipos de *Salmonella* spp., tais como: em *Chelus fimbriatus* (mata-mata), o sorotipo *S. Muenchen*; em *Acanthochelys spixii* (cágado-preto), a *S. enterica* subsp. *diarizonae* (O:53); em *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), os sorotipos *S. Braenderup*, *S. Newport* e *S. Tennessee*; em *Kinosternon scorpioides* (muçua), a *S. enterica* subsp. *Houtenae*; e em *Chelydra serpentina* (tartaruga-mordedora), a *S. enterica* subsp. *diarizonae*

(LOPES, 2008). Brites (2002) isolou de suabes cloacais de *P. geoffroanus* de vida livre, no Estado de Minas Gerais, os sorotipos S. Typhimirium, S. Cholerae suis e S. Typhi.

Considerando a literatura apresentada acima e os achados de *Salmonella* spp. nos *P. geoffroanus* estudados, pode-se afirmar que os sorotipos S. Oranienburg e S. Mbandaka foram descritos pela primeira vez em testudines aquáticos no Brasil.

Sendo a *Leptospira* spp., um agente responsável por uma zoonose de interesse em saúde pública e veiculada pelo meio aquático, torna-se relevante o levantamento de sua presença nos animais que habitam este ambiente, também frequentado por seres humanos e animais domésticos.

Com relação à detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp., a observação de reatividade de 50/76 (65,8 %) dos soros analisados mostrou que os animais tiveram contato com o agente. Não houve diferença estatisticamente significativa, teste qui-quadrado, entre os resultados de amostras colhidas antes (62,97%) e após (67,35%) o evento de poluição ambiental. A literatura confirma a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp., pela técnica de SAM, em testudines aquáticos no Brasil, tais como: *T. scripta elegans* (ESTEVES, 2005), *Podocnemis unifilis* (tracajá) (SILVA et al., 2010), *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) (ALVES JÚNIOR et al., 2009; 2010; SILVA et al., 2010; ALVES JÚNIOR, 2013) e *P. geoffroanus* (SILVA et al., 2010), espécie estudada no presente trabalho.

Das 24 sorovariedades estudadas, observou-se reatividade contra 18 delas, sendo as mais frequentes: Pyrogenes, Copenhageni, Patoc, Autumnalis, Canicola, Icterohemorrhagiae. Alguns animais apresentaram simultaneamente anticorpos contra uma ou mais sorovariedades diferentes. Conforme Oliveira (2003), na ordem Testudinata, a sorovariedade de maior frequência é Pomona. Estudos sorológicos com espécies aquáticas descreveram a sorovariedade Patoc em *T. scripta elegans* (ESTEVES, 2005), enquanto Silva et al. (2010) citam reatividade contra as sorovariedades Andamana, Tarassovi e Canicola. Os soros de *P. unifilis* reagiram às sorovariedades Panama e Pomona (SILVA et al., 2010). Os soros de *P. expansa* foram reagentes às sorovariedades Bataviae, Butembo, Javanica, Patoc, Panama, Pomona, Andamana, Australis, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohemorrhagiae,

Pyrogenes, Sentot, Shermeni, Tarassovi, Whitcombi e Wolff (ALVES JÚNIOR et al., 2009; ALVES JÚNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2010; ALVES JÚNIOR, 2013), com maior prevalência das sorovariedades Panama, Bataviae, Pomona, Hardjo e Pyrogenes (ALVES JÚNIOR, 2013). Especificamente na espécie *P. geoffroanus*, Silva et al. (2010) identificaram anticorpos contra a sorovariedade Canicola em indivíduo cativo.

Com relação à literatura citada acima observou-se correspondência com os achados deste trabalho. Assim, a ocorrência de anticorpos contra a sorovariedade Canicola, foi descrita em duas espécies aquáticas (SILVA et al., 2010), sendo uma delas *P. geoffroanus*, objeto deste trabalho. Da mesma forma, a ocorrência de anticorpos contra a sorovariedade Pomona foi relatada em *P. unifilis* (SILVA et al., 2010) e *P. expansa* (ALVES JÚNIOR et al., 2009; ALVES JÚNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2010; ALVES JÚNIOR, 2013). A ocorrência de anticorpos contra as sorovariedades Pyrogenes Patoc, Andamana e Bataviae foram citadas comentando apenas uma espécie (ESTEVES, 2005; ALVES JÚNIOR et al., 2010; SILVA et al., 2010; ALVES JÚNIOR, 2013). Por fim, não foram encontrados na literatura, relatos da ocorrência de anticorpos contra as sorovariedades, Copenhageni, Autumnalis e Icterohemorrhagiae, acometendo testudines aquáticos no Brasil. Dessa forma o presente trabalho confirmou reatividade contra sorovariedades descritas previamente, além de descrever a ocorrência de anticorpos contra novas sorovariedades em *P. geoffroanus*.

Quanto às diluições utilizadas no protocolo do teste de SAM, verificaram-se reações a partir de 1:10 até 1:1.280, sendo as mais frequentemente observadas as de 1:10 a 1:40. A diluição mínima padrão, a partir da qual o teste de SAM é considerado positivo, para répteis ainda não foi estabelecida, sendo observados na literatura diversos valores, tais como 1:20 (ALVES JÚNIOR, 2013), 1:40 (SILVA et al., 2010) e 1:100 (ESTEVES et al., 2005; ALVES JÚNIOR et al., 2009; ALVES JÚNIOR et al., 2010). No presente estudo, foi adotada a diluição de 1:10, o que pode acarretar menor especificidade do teste, podendo resultar em aumento na frequência de resultados falso-positivos. Dessa maneira, torna-se relevante a determinação experimental do ponto de corte padrão para o teste se SAM em testudines aquáticos.

A PCR para identificação de *Leptospira* spp. foi realizada de amostras de lavado estomacal (LE) e cloacal (LC) de 66 *P. geoffroanus*, totalizando 132 amostras. Foi identificado material genômico do agente em duas amostras de LE colhidas antes do evento de poluição ambiental e seis após. Das amostras de LC foi identificado material genômico de *Leptospira* spp. em uma antes e duas amostras após o evento. Essa diferença na detecção genômica antes e após o acidente ambiental não foi estatisticamente significativa, pelo teste exato de Fisher. Trabalho semelhante, realizado com lavado estomacal e urina de *P. expansa* de vida livre e de cativeiro, constatou a presença de material genômico de *Leptospira* spp. (ALVES JÚNIOR, 2013).

A relação entre os testes sorológicos e de identificação molecular mostrou que os resultados obtidos pelos testes, tanto no período antes, como após o evento de poluição ambiental, não foram estatisticamente significativos, pelo teste exato de Fisher. Observou-se baixo grau de concordância ($Kappa = -0,11$; $\phi = -0,18$) entre os resultados dos testes de detecção de anticorpos e agente, em ambos os períodos. De modo geral, espera-se que, ao detectar o agente, os anticorpos estejam presentes, e vice-versa; porém neste trabalho observaram-se também situações contrárias. Alves Júnior (2013) verificou situações semelhantes quando pesquisou a detecção de *Leptospira* spp. e respectivos anticorpos em *P. expansa*.

Possíveis razões/hipóteses sugeridas para a discordância da relação entre os achados da SAM e PCR seriam: (i) ocorrência de resultados falso-positivos (menor especificidade) na técnica de SAM, devido ao uso de ponto de corte 1:10; (ii) falha na qualidade das amostras (muito diluídas) utilizadas na PCR; (iii) falta de conhecimento da patogenicidade deste agente frente ao testudine aquático, uma vez que o animal e o agente possivelmente já convivam a longo tempo no ambiente aquático, podendo ter co-evoluído; (iv) desconhecimento da resposta imunológica humoral desta espécie e/ou possível falha do sistema imunológico (imunodeficiência) frente ao agente; (v) falta de informação a respeito da cinética de anticorpos contra *Leptospira* spp. em *P. geoffroanus*; (vi) ausência de estudos epidemiológicos de *Leptospira* spp. em testudines aquáticos. Algumas dessas hipóteses podem ser esclarecidas com uma infecção experimental de *Leptospira* spp. em testudines aquáticos.

O ser humano é susceptível à leptospirose causada por um grande número de sorovariedades, tais como Icterohemorrhagiae (ACHA; SZYFRES, 2001), Autumnalis (SPICHLER et al., 2007) e Copenhageni (KO et al., 1999). Os quadros clínicos e sua gravidade dependem da sorovariedade e da dose infectante de *Leptospira* spp., da espécie de hospedeiro, do seu estado imunitário, de sua idade e condição sanitária geral (ACHA; SZYFRES, 2001; CORRÊA, 2007; OIE, 2008). A caracterização de leptospirose severa em humanos pode abranger hemorragias no trato gastrointestinal, alterações hepáticas, insuficiência renal (ACHA; SZYFRES, 2001), insuficiência respiratória e morte (KO et al., 1999; SPICHLER et al., 2007).

Estudos epidemiológicos norte-americanos relatam o desenvolvimento da doença em humanos e surtos devido ao contato com ambiente pantanoso, na Flórida (STERN et al., 2010), e a ingestão de água de lago contaminado após período de fortes chuvas, em Illinois (MORGAN et al., 2002).

De acordo com a literatura, os répteis podem ser reservatórios de algumas sorovariedades e disseminá-las em ambientes antrópicos, infectando outras espécies (ALVES JÚNIOR, 2013).

Considerando os resultados expostos nesta investigação (detecção de *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. em *P. geoffroanus* e seu *habitat*), a viabilidade e a transmissão destes agentes no meio aquático (SAIDI et al., 1997; SÃO PAULO, 2009) e o contato de pessoas e animais domésticos com o ambiente do Córrego Cerradinho possibilitam a infecção de humanos, representando um possível problema para a saúde pública.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível averiguar que exemplares de *P. geoffroanus* avaliados estão infectados por *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. e que o ambiente está contaminado, podendo assim, representar risco de infecção para as populações humana e animal que entrarem em contato.

7. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v. 1, p. 175-186, 240-254. (Publicación Científica y Técnica, 580).

ALTMANN, D.G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall, 1999, p. 404.

ALVES JÚNIOR, J. R. F. ***Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) do vale do rio Araguaia - GO**. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

ALVES JÚNIOR, J. R. F.; BRITO, F. M. M.; SILVA, F. J.; BOSSO, A. C. S.; ASSIS, N. A.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S. *Leptospira* spp. em matrizes de tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criadas em cativeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 36., 2009, Porto Seguro. **Anais...**

ALVES JÚNIOR, J. R. F.; BRITO, F. M. M.; VALENTIN, F. N.; LUSTOSA, A. P. G.; ASSIS, N. A.; BASTOS, L. F.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S. *Leptospira* spp. in giant amazon river turtles *Podocnemis expansa* bred in captivity. In: AQUACULTURE EUROPE, 10., 2010, Porto. p. 457-458.

ALVES JÚNIOR, J. R. F.; SOUSA, E.; LUSTOSA, A. P. G.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; WERTHER, K. Procedure for collecting gastric contents in giant amazon turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) - Letter to the Editor. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 77-78, 2011.

BHATTACHARYYA, G. K.; JOHNSON, R. A. **Statistical concepts and methods**. New York: John Wiley & Sons, 1977. p. 308-312, 434-435.

BIASE, F. H.; FRANCO, M. M.; GOULART, L. R.; ANTUNES, R. C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 313-315, 2002.

BORGES, M. J.; GALBIATTI, J. A.; FERRAUDO, A. S. Monitoramento de qualidade hídrica e eficiência de interceptores de esgoto em cursos d'água urbanos da bacia hidrográfica do Córrego Jaboticabal. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 161-171, 2003.

BOYER, T. H.; BOYER, D. M.: Turtles, tortoises, and terrapins In: MADER, D. R. (Ed): **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 78-99.

BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae) expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais**. 2002. 196 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de répteis. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 250.

CAMPELLO, P. L. **Salmonella spp. em ovos brancos para consumo humano**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

CARVALHO, F. C. T. **Influências exógenas na qualidade bacteriológica da água, solo e camarão (*Litopenaeus vannamei*), em quatro fazendas de camarão do estado do Ceará**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) –Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2006.

CARVALHO, V. M. Colibacilose e salmonelose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 742, 745-750.

CDC. Salmonellosis associated with pet turtles – Wisconsin and Wyoming, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 54, n. 9, p. 223-226, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5409a3.htm>>. Acesso em: 08 jun. 2013.

CDC. Turtle-associated salmonellosis in humans - United States, 2006-2007. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 56, n. 26, p. 649-652, 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5626a1.htm>>. Acesso em: 08 jun. 2013.

CDC. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles – United States, 2007-2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 57, n. 3, p. 69-72, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5703a3.htm>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

CDC. Notes from the field: outbreak of salmonellosis associated with pet turtle exposures — United States, 2011. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 61, n. 4, p. 79, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6104a4.htm?s_cid=mm6104a4_w>. Acesso em: 12 fev. 2013.

CORRÊA, S. H. R. Leptospirose In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 736-739.

CUBAS, P. H.; BAPTISTOTTE, C. Chelonia (tartaruga, cágado, jabuti). In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 86, 88.

DASZAK, P; CUNNINGHAM, A. A. Emerging infectious diseases: a key role for conservation medicine. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.) **Conservation medicine: ecological health in practice**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 55.

EBANI, V. V.; FRATINI, F. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. **Annali Facolta di Medicina Veterinaria**, Parma, v. 58, p. 85-91. 2005.

ESTEVES, F. M. **Levantamento sorológico e plano de ação para controle da leptospirose no Zoológico Municipal de Uberaba, MG**. 2005. 90 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo. 2005.

ESTEVEES, F. M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R. J. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; CARVALHO, A. C F. B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do zoológico municipal de Uberaba, MG. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 283-288, 2005.

FERRONATO, B. O. ***Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) em ambiente antrópico: perfil hematológico e microbiota oral.** 2008. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FERRONATO, B. O.; GENOY-PUERTO, A.; PIÑA, C. I.; SOUZA, F. L.; VERDADE, L. M.; MATUSHIMA, E. R. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. **Zoologia**, Curitiba, v. 26, n.4, p. 795-798, 2009.

FRATAMICO, P. M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. **Molecular and Cellular Probes**, n. 17, p. 215–221, 2003.

GENOY-PUERTO, E. A. **Citometria de fluxo de leucócitos sanguíneos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) provenientes de ambientes poluídos: metodologia de isolamento e estimulação.** 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GRABOW, W. **Waterborne diseases:** upgrade on water quality assessment and control. **Water SA**, Pretoria, v. 22, n. 2, p.193-201, 1996.

GRACZYK, T. K. Zoonotic infections and conservation. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. (Ed.). **Conservation medicine: ecological health in practice.** New York: Oxford University Press, 2002. p. 223-224.

HALD, T.; WINGSTRAND, A.; BRONDSTED, T.; WONG, D. M. A. L. F. Human health impact of *Salmonella* contamination in imported soybean products: A semiquantitative risk assessment. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 3, n. 4, p. 422-431, 2006.

HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J. Quelônios. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J. (Ed.). **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Paulo: Interbook, 2007. p. 187-188.

HOELZER, K.; SWITT, A. I. M.; WIEDMANN, M. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. **Veterinary Research**, London, v. 42, n. 1, p. 34, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-42-34>>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE cidades@**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/index.pph>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

IMAGENS ©2013 Cnes/Spot Image, DigitalGlobe, GeoEye, TerraMetrics, Dados cartográficos ©2013 Google, MapLink. **Google Maps**. Disponível em: <<http://maps.google.com/>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

KO, A.; GALVÃO-REIS, M., RIBEIRO-DOURADO, C. M., JOHNSON JR, W. D.; RILEY, L. W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Salvador Leptospirosis Study Group. **The Lancet**, London, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIN, J. R. W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Brasília: Editora MEDSI, 2001. 1.465p.

LECHEVALLIER, M. W.; WELCH, N. J.; SMITH, D. B. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2201-2221, 1996.

L'ECUYER, P.; DIEGO, J.; MURPHY, D.; TROVILLION, E.; JONES, M.; SAHM, D. F.; FRASER, V. J. Nosocomial outbreak of gastroenteritis due to *Salmonella senftenberg*. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 356-362, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/clinids/23.4.734>>.

LEGLER, J. M.; GEORGES, A. Family Chelidae. In: GLASBY, C. J.; ROSS, G. J. B.; BEESLEY, P. L. (Ed.). **Fauna of Australia**. Canberra: Australian Government Publishing Service. 1993. p. 142-152.

LOPES, L. F. L. **Salmonella sp. em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo**: frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as consequências para o manejo em cativeiro e reintrodução. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LORENZON, C. S.; GATTI JUNIOR, P.; NUNES, A. P.; PINTO, F. R.; SCHOLTEN, C.; HONDA, S. N.; AMARAL, L. A. Perfil microbiológico de peixes e água de cultivo em pesque-pagues situados na região nordeste do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 617-624, 2010.

MCCULLOUGH, N. B.; EISELE, C. W. Experimental human salmonellosis: I. pathogenicity of strains of *Salmonella meleagridis* and *Salmonella anatum* obtained from spray-dried whole egg. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 278-289, 1951.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT-GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 9, p. 2219–2224, 1992.

MERMIN, J.; HUTWAGNER, L.; VUGIA, D.; SHALLOW, S.; DAILY, P.; BENDER, J.; KOEHLER, J.; MARCUS, R.; ÂNGULO, F. J. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 38, suppl. 3, p. 253-261, 2004.

MIRANDA, B. S.; LOPES, L. F. L.; GREGO, K. F.; BAUAB, A. R.; MATUSHIMA, E. R. Avaliação das frequências de isolamento de *Salmonella* sp. através de coletas seriadas em répteis de cativeiro. In: CONGRESSO, 9.; ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 17., 2008, Santos. **Anais eletrônicos ...** Santos: ABRAVAS, 2008. p. 114-117. Disponível em: <<http://www.abravas.org.br/images/download/anais/2008.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

MOLINA, F. B. Biology, management, and free-living populations. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. (Ed.). **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 15-20.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BRUCE, M.; BOLIN, C. A.; AUSTIN, C. C.; WOODS, C. W.; LINGAPPA, J.; LANGKOP, C.; DAVIS, B.; GRAHAM, D. R.; PROCTOR, M.; ASHFORD D. A.; BAJANI M.; BRAGG, S. L.; SHUTT, K.; PERKINS, B. A.; TAPPERO, J. W. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1593-1599, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/340615>>.

MULEY, V. A.; POL, S. S.; DOHE, V. B.; NAGDAWANE, R. P.; ARJUNWADKAR, V. P.; PANDIT, D. P.; BHARADWAJ, R. S. Neonatal outbreak of *Salmonella* *worthington* in a general hospital. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, v. 22, n. 1, p. 51-53, 2004.

NUNES, O. C.; OLIVEIRA, E. D.; LABORDA; S. S.; HOHLENWERGER, J. C.; MORAES NETO, M.; FRANKE, C. R. Isolamento e identificação de *Salmonella* sp. de jabutis-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) oriundos do tráfico de animais silvestres. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 168-173, 2010.

OIE. Leptospirosis. In: _____. **OIE Terrestrial manual 2008**. World Organisation for Animal Health, 2008. chap. 2.1.9, p. 252-255. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2013.

OIE. Salmonellosis. **OIE Terrestrial manual 2010**. World Organisation for Animal Health, 2010. chap. 2.9.9. p. 1-10 Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELL OSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELL_OSIS.pdf)>. Acesso em: 04 jun. 2013.

OLIVEIRA, P. M. A. **Animais silvestres e exóticos na clínica particular**. São Paulo: ROCA, 2003. 375 p.

PIÑA, C. I.; LANCE, V. A.; FERRONATO, B. O.; GUARDIA, I.; MARQUES, T. S.; VERDADE, L. M. Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a River Basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 83, n. 6, p.771-775, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00128-009-9866-6>>.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp in humans. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 1, p. 1265-1266, 2000.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <URL <http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 25 jun. 2013.

RIBEIRO, Í. C.; VENANCIO, L. P. R.; SILVA, M. I. A.; LUCENA-SILVA, T.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus* Testudines: Chelidae) como espécie sentinela em ambientes degradados: estudo ecotoxicológico e hematológico. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 11., 2009, São José do Rio Preto. **Anais eletrônicos...** São José do Rio Preto: UNESP, 2009. p. 5764-5767. Disponível em: < http://prope.unesp.br/xxi_cic/>. Acesso em: 25 jun. 2013.

ROSSI, J. V. General husbandry and management. In: MADER, D. R. (Ed.): **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 25- 41.

RUEDA-ALMONACID, J. V.; CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-MAHECHA, J. V.; MAST, R. B.; VOGT, R. C.; RHODIN, A. G. J.; OSSA-VELÁSQUEZ, J.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C. G. **Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico**. Conservación Internacional. Bogotá, Colombia: Editorial Panamericana, 2007. p. 194-198. (Serie de guías tropicales de campo, 6).

SÁ, I. V. A.; SOLARI, C. A. *Salmonella* in Brazilian and imported pet reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 293-297, 2001.

SAIDI, S. M.; IJIMA, Y.; SANG, W. K.; MWANGUDZA, A. K.; OUNDO, J. O.; TAGA, K.; AIHARA, M.; NAGAYAMA, K.; YAMAMOTO, H.; WAIYAKI, P. G.; HONDA, T. Epidemiological study on infectious diarrhea diseases in children in a coastal rural area of Kenya. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 41, n. 10, p. 773-778, 1997.

SÃO PAULO. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Centro de Vigilância Epidemiológica. DDTHA/ CVE. **Doenças relacionadas à água ou de transmissão hídrica - perguntas e respostas e dados estatísticos**: (Informe Técnico). São Paulo, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/dta09_pergresp.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2013.

SCHEIL, W.; CAMERON S.; DALTON, C.; MURRAY, C.; WILSON, D. A South Australian *Salmonella* Mbandaka outbreak investigation using a database to select controls. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, Richmond, v. 22, n. 5, p. 536-539, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-842X.1998.tb01434.x/pdf>>.

SHETH, A.; HOEKTRA, M.; PATEL, N.; EWALD, G.; LORD, C.; CLARKE, C. VILLAMIL, E.; NIKSICK, K.; BOPP, C.; NGUYEN, T.; ZINK, D.; LYNCH, M. A national outbreak of *Salmonella* serotype Tennessee infections from contaminated peanut butter: a new food vehicle for salmonellosis in the Unites States. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 356-362, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir407>>.

SIEGEL, S. CASTELLAN JR., N. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 2. ed. p. 64-71, 95-102, 125-152.

SILVA, C. S.; GÍRIO, R. J. S.; GUERRA NETO, G.; BRICH, M.; SANTANA, L. A. S.; AMÂNCIO, F. H.; MARIANI, J. R.; WESSORT, P. M. F. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 237-242, 2010.

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L.F.; FAGLIARI, J. J.; GIRIO, R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBA, M. R.; MATHIAS, L. A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012.

SOUSA, E.; WERTHER, K.; RASO, T. F.; BERCHIERI JR, A. *Salmonella* Carrau Septicemia in a South American River Turtle (*Podocnemis expansa*). **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 3, p. 181-182, 2011.

SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.

SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtles *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of the Zoological Society of London**, London, v. 252, p. 437-446, 2000.

SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, London, v. 36, n. 1, p. 57-62, 2001.

SPICHLER A.; ATHANAZIO D.; BUZZAR M.; CASTRO B.; CHAPOLLA E.; SEGURO A.; VINETZ, J. Using death certificate reports to find severe leptospirosis cases, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 13, n. 10, 2007. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/10/07-0150.htm>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

STERN, E.; GALLOWAY, R.; SHABOMY, S. V., WANNEMUEHLER, K.; DAVID, A.; BLACKMORE, C.; WOFFORD, TAYLOR.; WILKINS, P. P.; ARI, M. D.; HARRIS, L.; CLARK, T. Outbreak of leptospirosis among adventure race participants in Florida, 2005. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.50, n.6, p.843-849, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/650578>>. Acesso em: 07 jun. 2013.

TORPDAHAL, M.; SORENREN, G.; LINDSTEDT, B.-A.; NIELSEN, E. M. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. **Emerging Infectious Disease Journal**, Atlanta, v. 13, n. 3, p. 388-395, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1303.060460>>.

WERBER, D.; DREESMAN, J.; FEIL, F.; TREECK, U.; FELL, G.; ETHELBERG, S.; HAURI, A. M.; ROGGENTIN, P.; PRAGER, R.; FISHER, I. S. T.; BEHNKE, S. C.; BARTELT, E.; WEISE, E.; ELLIS, A.; SIITONEN, A.; ANDERSON, Y.; TSCHÄPE, H.; KRAMER, M. H.; AMMON, A. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, n. 7, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-5-7>>.

APÊNDICES

Apêndice A: Protocolo de isolamento e identificação de *Salmonella* spp. a partir amostras de colhidas de *P. geoffroanus* (suabe e sangue) e ambientais (água superficial e sedimento com água do fundo do Córrego), no período de fevereiro a maio 2012, Jaboticabal-SP.

Origem	Pré-enriquecimento	Enriquecimento seletivo	Plaqueamento em meios semissólidos	Testes bioquímicos presuntivos	Incubação das colônias suspeitas	Prova sorológica	Destinos das alíquotas sorologicamente positivas		
Amostra original	APT 1%	Tetracionato	XLT-4	TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR		
							TIPIFICAÇÃO		
							-80°C		
						LIA			
				Verde brilhante		TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR
			TIPIFICAÇÃO						
			-80°C						
						LIA			
				MacConkey		TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR
			TIPIFICAÇÃO						
			-80°C						
						LIA			
		Selenito	XLT-4	TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR		
	TIPIFICAÇÃO								
	-80°C								
				LIA					
		MacConkey		TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR		
	TIPIFICAÇÃO								
	-80°C								
				LIA					
		Rappaport	XLT-4	TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR		
	TIPIFICAÇÃO								
	-80°C								
				LIA					
		MacConkey		TSI	LB	Soro polivalente "O" e "H"	PCR		
	TIPIFICAÇÃO								
	-80°C								
				LIA					

Apêndice B: Relação entre os resultados da PCR e dos exames sorológicos para *Leptospira* spp., de 66 *P. geoffroanus* capturados no Córrego Cerradinho, Jaboticabal-SP, entre fevereiro e maio de 2012, dos quais, 18 animais foram capturados antes e 48 após o evento de poluição ambiental.

<i>P. geoffroanus</i> (n=66)	Resultados PCR (n=132)		Resultados dos exames sorológicos (n=66)	
	Estômago (n=66)	Cloaca (n=66)	Sorovariedades	Diluição máxima
C ₁₅ ^{Ap}	Detectado	Não detectado	Australis Autumnalis	1:40 160
C ₆₈ ^{Dp}	Detectado	Não detectado	Autumnalis	1:20
			Bataviae	1:10
			Copenhageni	1:160
			Patoc	1:10
			Pyrogenes	1:40
			Shermani	1:10
			Whitcombi	1:10
C ₅₉ ^{Dp}	Detectado	Não detectado	Icterohemorrhagiae	1:10
			Pomona	1:10
			Pyrogenes	1:20
C ₁₂ ^{Ap}	Detectado	Não detectado	Canicola	1:20
			Castellonis	1:10
			Copenhageni	1:40
			Patoc	1:10
			Pyrogenes	1:160
C ₄₉ ^{Dp} , C ₅₁ ^{Dp} , C ₆₀ ^{Dp} e C ₇₈ ^{Dp}	Detectado	Não detectado	Não reativo	---
C ₆₆ ^{Dp}	Não detectado	Detectado	Autumnalis	1:10
			Copenhageni	1:80
			Icterohemorrhagiae	1:20
			Hebdomadis	1:10
			Patoc	1:10
			Pyrogenes	1:10
			Sentot	1:10
			Shermani	1:10
C ₃₂ ^{Ap} e C ₆₇ ^{Dp}	Não detectado	Detectado	Não reativo	----
6 ^{Ap}	Não detectado	Não detectado	Não reativo	----
11 ^{Dp}	Não detectado	Não detectado	Não reativo	----
9 ^{Ap}	Não detectado	Não detectado	Reativo	----
29 ^{Dp}				

C_n^o= identificação individual do *P. geoffroanus*; ^{Ap}= *P. geoffroanus* capturado antes da poluição ambiental; ^{Dp}= *P. geoffroanus* capturado depois da poluição ambiental.