

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

***Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM TARTARUGAS-DA-
AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) DO VALE DO RIO
ARAGUAIA – GO**

José Roberto Ferreira Alves Júnior

Médico Veterinário

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM TARTARUGAS-DA-AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) DO VALE DO RIO ARAGUAIA – GO**

José Roberto Ferreira Alves Júnior

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Girio

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda S. Magajevski

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

2013

A474l Alves Júnior, José Roberto Ferreira
 Leptospira spp. e *Brucella* spp. em tartarugas-da-amazônia
(*Podocnemis expansa*) do vale do rio Araguaia - GO. / José Roberto
Ferreira Alves Júnior. – – Jaboticabal, 2013
 xix, 89 f. ; 29 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
 Orientador: Raul José Silva Girio
 Banca examinadora: Adriana Malvásio, Anna Monteiro Correia
Lima Ribeiro, Karin Werther, Luis Antonio Mathias
 Bibliografia

 1. Leptospirose. 2. Brucelose. 3. Tartaruga-da-amazônia. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:616.9:598.13

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES JÚNIOR – nascido em 24 de agosto de 1979, em Goiânia, Goiás, Médico Veterinário formado pela Universidade de Uberaba, Uberaba – MG, em julho de 2003. Atuou como Médico Veterinário responsável pelos Laboratórios de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Uberaba entre maio de 2004 e julho de 2005. Mestre em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Uberlândia em 2006. Foi Fiscal Estadual da Agência Goiana de Defesa Agropecuária entre setembro de 2006 e outubro de 2007, sendo transferido para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da mesma instituição, onde permaneceu de novembro de 2007 a fevereiro de 2008. Professor do curso de Medicina Veterinária da Anhanguera Institucional, onde ministrou a disciplina de Imunologia durante o período de agosto de 2007 a fevereiro de 2008. Em 2008, participou, como colaborador, junto à equipe do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação Répteis e Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) em parceria com a Universidade Federal do Tocantins com o Projeto “Desenvolvimento e Organização da Cadeia Produtiva de Quelônios na Amazônia Legal” entre fevereiro e dezembro de 2008. Iniciou o curso de Pós-graduação *Stricto Sensu*, Doutorado em Medicina Veterinária, Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, em março de 2009, o qual foi finalizado em janeiro de 2013. Aprovado no Concurso Público Federal do Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, município de Pires do Rio - GO, onde atua como docente do curso Técnico em Agropecuária, desde junho de 2012.

“Sou goiano de todo canto,
Da lua, do céu de anil
da prosa, do abraço apertado
Do coração do Brasil.
Goiano do carro-de-boi
das asas de um avião
Da guitarra e da viola,
Sou goiano de coração...”

(Marcelo Barra – André Pupulin – Rinaldo Barra)

Dedico

Aos meus pais, José Roberto e Arlene, e a
minha irmã, Alyne, pelo carinho, apoio e
confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e força, indispensáveis para lutar durante todos estes anos;

A todas as tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) que perderam suas vidas e/ou doaram amostras em prol desta pesquisa;

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Processo: 2009/09686-7) e pela bolsa (Processo: 2009/08224-0);

Ao Instituto Biológico, pela doação do antígeno acidificado tamponado utilizado para o teste sorológico da brucelose;

Ao Prof. Dr. Raul José Silva Girio, pela confiança, apoio e orientação;

À Profa. Dra. Fernanda Senter Magajevski, pela paciência, ajuda e orientação;

Às Professoras Laura Satiko Okada Nakaghi, Márcia Rita Fernandes Machado e Karin Werther, pela amizade e pelo acolhimento;

Aos Professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, Profa. Dra. Angela Cleusa Banzatto de Carvalho, Prof. Dr. Antonio Nader Filho, Prof. Dr. Luis Antonio Mathias, Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro, Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior, Prof. Dr. Samir Issa Samara, Prof. Dr. Adjair Antônio do Nascimento;

A todos os docentes da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pelo comprometimento com o ensino do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e pela minha formação;

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva;

Às amigas e companheiras Ana Paula Gomes Lustosa e Lilian Freitas Bastos, pelo auxílio nos trabalhos de campo tanto com as *P. expansa* selvagens quanto com as criadas em cativeiro;

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico da Brucelose e Leptospirose, Nivaldo Aparecido de Assis, e do Laboratório de Epidemiologia Molecular, Andressa de Souza, pela convivência e contribuição para a realização deste trabalho;

À equipe do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN/ICMbio), Ana Paula Gomes Lustosa, Cintia Maria Silva Coimbra, José Geraldo da Silva, Rafael Antônio Machado Balestra, Isaías José dos Reis, Vera Lúcia Ferreira Luz, José Wanderley Cambuim, Itamar da Silva Santos, Donizete Cristiano de Oliveira, Valdivino Rosa Fernandes, Paulo Henrique Soares de Aguiar, Kátia Costa Mendonça, Mônica Matos dos Santos, Ana Maria Januário de Abreu e Maria Divina Pereira Lima, pelo incentivo e auxílio nos trabalhos de campo com as *P. expansa* selvagens;

Às amigas de república Andréa Cristina Scarpa Bosso, Fernanda Nogueira Valentin, Maria do Carmo Faria Paes e Regiane Cristina da Silva, pelos felizes anos de convivência;

Aos colegas Bruna Alexandrino, Lucimara Antonio Borges, Ingrid Bortolin Affonso, Heloísa Cristina da Silva, Mônica Costa Oliveira, Laryssa Freitas Ribeiro, Mariana Casteleti Beraldo Massoli, Felipe Jorge da Silva, Renata Ferreira dos Santos, Gian Riccardo Ortunho Galli, Glaucenyra Cecília Pinheiro da Silva, Maurício Machado de Araújo, Juliana Cristina Baldin, Natália Maramarque Nespoli, Patrícia Gelli Feres, Rafael Massa, Maria Izabel Merino de Medeiros, Poliana Castro Melo, Kalina Maria de Medeiros Gomes Simplício, Thalita Masoti Blankenheim, Fernanda Rezende Pinto, Francine Faustino, Fernando Moraes Machado Brito, Juliana Paula de Oliveira, Aline Eyko Kawanami, Mayhara Martins Cordeiro Barbosa, Eliane de Sousa, Sérgio Fonseca Zaiden, Lilian Cristina Makino, pela alegre convivência e amizade durante todo o curso de pós-graduação;

Aos meus familiares, pela compreensão e apoio;

A todos que confiaram neste trabalho, meus sinceros agradecimentos!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
Objetivos.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Tartarugas-da-amazônia (<i>Podocnemis expansa</i>).....	3
2.2. Leptospirose.....	8
2.3. Brucelose.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Captura e colheita de material dos animais de vida livre.....	28
3.2. Captura e colheita de material dos animais de cativeiro.....	34
3.3. Técnicas de Diagnóstico.....	37
3.3.1. Teste sorológico para diagnóstico da leptospirose.....	37
3.3.1.1. Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM).....	37
3.3.2. Testes sorológicos para diagnóstico da brucelose.....	38
3.3.2.1. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT).....	38
3.3.2.2. Teste de polarização fluorescente (TPF).....	38
3.3.2.3. Reação de fixação de complemento (RFC).....	39
3.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
3.3.3.1. Preparo das amostras para a PCR e extração de DNA.....	40
3.3.3.2. Identificação da <i>Brucella</i> spp. e da <i>Leptospira</i> spp. pela PCR.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. <i>Leptospira</i> spp.....	44
4.1.1. Sorologia dos animais de vida livre.....	44
4.1.2. Sorologia dos animais criados em cativeiro.....	48

4.2. <i>Brucella</i> spp.....	52
4.2.1. Sorologia dos animais de vida livre.....	52
4.2.2. Sorologia dos animais de cativeiro.....	52
4.3. PCR.....	52
4.3.1. Animais de vida livre.....	53
4.3.2. Animais criados em cativeiro.....	55
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS.....	65

CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 010002 do trabalho de pesquisa intitulado "***Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em tartarugas-da-amazônia do Vale do Araguaia-GO, de vida livre e criadas em cativeiro.**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Raul José Silva Girio está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 17 de junho 2009.

Jaboticabal, 17 de junho de 2009.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEBEA
Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19662-1	Data da Emissão: 06/04/2009 16:10	Data de Validade: 06/04/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2204781	Nome: JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES JUNIOR	CPF: 892.530.781-20
Título do Projeto: Leptospira spp. E Brucella spp. EM TARTARUGAS-DA-AMAZÔNIA DO VALE DO ARAGUAIA – GO, CRIADAS EM CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE		
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL		CNPJ: 48.031.918/0012-87

Observações, ressalvas e condicionantes

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 exime o titular e a 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. 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.ibama.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, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO MIGUEL DO ARAGUAIA	GO	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL MEANDROS DO RIO ARAGUAIA	UC Federal
2	ARAGUAPAZ	GO	Fazenda Moenda da Serra	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Podocnemis expansa
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Podocnemis expansa
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Podocnemis expansa
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Podocnemis expansa (*Qtde: 400)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Ovos, Sangue, Regurgitação/conteúdo estomacal
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	Universidade

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

Código de autenticação: 24397357





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19662-1	Data da Emissão: 06/04/2009 16:10	Data de Validade: 06/04/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2204781	Nome: JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES JUNIOR	CPF: 892.530.781-20
Título do Projeto: Leptospira spp. E Brucella spp. EM TARTARUGAS-DA-AMAZÔNIA DO VALE DO ARAGUAIA – GO, CRIADAS EM CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE		
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL		CNPJ: 48.031.918/0012-87

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

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

Código de autenticação: 24397357



Página 2/2

***Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM TARTARUGAS-DA-AMAZÔNIA
(*Podocnemis expansa*) DO VALE DO RIO ARAGUAIA – GO**

RESUMO - No Brasil, alguns estados, como Mato Grosso e Goiás, que possuem regiões alagadiças e pouco exploradas, têm a bovinocultura de corte extensiva como um dos pilares da economia. Isso faz com que bovinos e animais selvagens compartilhem o mesmo ambiente, facilitando uma possível transmissão cruzada de doenças infectocontagiosas entre eles e até mesmo para humanos. Com o objetivo de identificar anticorpos e detectar o DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos diferentes materiais oriundos de tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) e do meio onde vivem, foram examinados 600 Testudines. As técnicas de diagnóstico sorológico empregadas foram a soroaglutinação microscópica (SAM), utilizada para a identificação de anticorpos anti-*Leptospira*, e a prova do antígeno acidificado tamponado (AAT), o teste da polarização fluorescente (TPF) e a reação de fixação de complemento (RFC), utilizados para a identificação de anticorpos anti-*Brucella*. Já a detecção de DNA dos agentes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Empregando-se a SAM observou-se que 483 (80,5%) amostras foram reagentes ao teste. Quatro amostras foram reagentes na AAT, porém no TPF e na RFC, não houve reagentes. Detectou-se DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos materiais oriundos dos animais e no ambiente onde vivem. Tal achado demonstra que há possibilidade da *P. expansa* ser hospedeiro natural da *Leptospira* spp. assim como da *Brucella* spp., permitindo a disseminação do agente para animais domésticos, outras espécies selvagens e humanos.

Palavras-chave: anticorpos, brucelose, leptospirose, PCR, réptil, sorologia

***Leptospira* spp. AND *Brucella* spp. IN GIANT AMAZON TURTLES (*Podocnemis expansa*) OF THE ARAGUAIA RIVER VALLEY - GO**

ABSTRACT – In Brazil, States such as Mato Grosso and Goiás, having flooded and little explored regions, maintain beef cattle as a pillar of their economies. This results in both cattle and wild animals sharing the same environment, and thus facilitating the potential cross transmission of infectious diseases among them and even to humans. With the goal of identifying antibodies and detecting the DNA of *Leptospira* spp. and *Brucella* spp. in various tissues and fluids from giant Amazon turtles (*P. expansa*) and the environment where they live, 600 Testudines were examined. The serological diagnostic techniques employed included the microscopic agglutination test (MAT) for the identification of anti-*Leptospira* antibodies, and the rose bengal plate test (RBPT), the fluorescence polarization assay (FPA) and the complement fixation test (CFT) for the identification of anti-*Brucella* antibodies. The detection of DNA was carried out by polymerase chain reaction (PCR). The MAT results showed that 483 (80.5%) of the samples tested were reagents to *Leptospira* spp. Four samples were reagents in RBPT, but in FPA and CFT, there weren't reagents. The DNA of these bacteria was detected in the biologic material from tested animals and in the environment where they live. This demonstrates the possibility of *P. expansa* being a natural host of *Leptospira* spp. as well as a natural host of *Brucella* spp. thus allowing dissemination of the agents to domestic animals, other wildlife and humans.

Keywords: antibodies, brucellosis, leptospirosis, PCR, reptile, serology

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Amostras biológicas colhidas das <i>Podocnemis expansa</i> de vida livre capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, entre o período de 2009 e 2010.....	32
Tabela 2 Amostras biológicas colhidas das <i>Podocnemis expansa</i> criadas em cativeiro capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, entre o período de 2009 e 2010.....	36
Tabela 3 Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das <i>Podocnemis expansa</i> de vida livre capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.....	44
Tabela 4 Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das <i>Podocnemis expansa</i> de vida livre, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010, demonstrando a quantidade de sororreagentes e o título.....	46
Tabela 5 Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das <i>Podocnemis expansa</i> de vida livre, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010, comparando as sorovariedades e títulos detectados nas matrizes aos dos respectivos recém-eclodidos.....	47
Tabela 6 Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das <i>Podocnemis expansa</i> criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.....	49
Tabela 7 Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das <i>Podocnemis expansa</i> criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010, demonstrando a quantidade de sororreagentes e o título.....	51
Tabela 8 Resultados da PCR para pesquisa de DNA de <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp. nas amostras de urina e conteúdo estomacal das <i>P. expansa</i> de vida livre capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, em 2009 e 2010.....	54

Tabela 9	Resultados da PCR para pesquisa de DNA de <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp. nas amostras de urina e conteúdo estomacal das <i>P. expansa</i> criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, em 2009 e 2010.....	56
Tabela 10	Resultados da PCR para pesquisa de DNA de <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp. nas amostras de fígado, rins e gônadas das <i>P. expansa</i> criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, em 2009 e 2010.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Localização da área de estudo. (A) Área de Proteção Ambiental - Meandros do rio Araguaia.....	28
Figura 2 Métodos de identificação de praias de desova e ninhos das <i>P. expansa</i> na APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Placa de identificação da praia; (B) Estaca de identificação do ninho (seta).....	29
Figura 3 Transporte das matrizes de vida livre, após a desova, para o acampamento da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010.....	30
Figura 4 Filhotes de <i>P. expansa</i> capturados nos bancos de areia da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Ninho contendo filhotes de <i>P. expansa</i> recém-eclodidos; (B) Filhote de <i>P. expansa</i> com defeito de casco.....	30
Figura 5 Cambuins utilizados para a pesca das <i>P. expansa</i> nos lagos da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Cambuim iscado com casca de melancia e quatro cambuins prontos para serem iscados; (B) Cambuim liberado no lago, pronto para a pesca de uma <i>P. expansa</i>	31
Figura 6 Colheita das amostras de sangue por punção do seio vertebral caudal das <i>P. expansa</i> da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010.....	32
Figura 7 Colheita dos órgãos dos recém-eclodidos da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Recém-eclodido com exposição dos órgãos; (B) Órgãos dos dez filhotes com defeitos de casco e casca dos ovos da fêmea número 142.....	33
Figura 8 Localização da área de estudo. (B) Criadouro comercial de <i>P. expansa</i>	34
Figura 9 <i>P. expansa</i> criadas em cativeiro sendo capturadas com rede de pesca no criadouro em 2009 e 2010.....	35
Figura 10 Técnicas de colheita de sangue das <i>P. expansa</i> do criadouro comercial, capturadas entre 2009 e 2010. (A) Colheita por punção do seio vertebral caudal; (B) Colheita por punção do seio vertebral cervical.....	36

Figura 11	Sorovariedades detectadas nas amostras de soro das <i>P. expansa</i> de vida livre, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.....	45
Figura 12	Sorovariedades detectadas nas amostras de soro das <i>P. expansa</i> criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.....	50
Figura 13	DNA genômico total encontrado nas amostras de água de tanque (T2A), sedimento de tanque (T2S), urina (UR), conteúdo estomacal (CE), fígado (FI), rins (R), gônadas (GO), cascas de ovos (CO) e órgãos dos filhotes (OF). PM: padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).....	53
Figura 14	Produto de PCR com os primers Lep1/Lep2 (331 pb) e B4/B5 (223 pb) de amostras de conteúdo estomacal (CE3, CE4 e CE6) e cascas dos ovos do ninho (138), como representante das amostras que apresentaram amplificação para <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). CP: controle positivo. CN: controle negativo (mix sem DNA).....	55
Figura 15	Produto de PCR com os primers Lep1/Lep2 (331 pb) e B4/B5 (223 pb) de amostras de urina (URF15 e URB16), água de tanque de criação (T2A), rim (RB16) e gônadas (GOT1), como representante das amostras que apresentaram amplificação para <i>Leptospira</i> spp. e <i>Brucella</i> spp. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). CP: controle positivo. CN: controle negativo (mix sem DNA).....	57

1. INTRODUÇÃO

No ambiente natural, as doenças fazem parte do conjunto de elementos que compõem um ecossistema, e a inter-relação entre eles contribui para a dinâmica das populações. Desta maneira, fatores ambientais, disponibilidade de alimentos, abrigo, temperatura, predadores e a integridade do habitat atuam sobre a população mantendo o equilíbrio. Nos indivíduos que sofrem com a degradação do habitat, proximidades com áreas urbanas e com animais domésticos, muitas dessas inter-relações podem ser afetadas tornando-os mais predispostos a agentes infecciosos que podem causar doenças com efeitos devastadores (SILVA, 2007).

O aparecimento de doenças em quelônios de cativeiro pode ser causado por manejo incorreto, falta de higiene dos recintos, fornecimento de alimentos inadequados e superlotação, que favorecem o estresse dos animais e os predispõem à instalação e ao desenvolvimento de moléstias infecciosas e parasitárias (FOWLER, 1986).

A leptospirose e a brucelose são enfermidades que afetam diversas espécies de animais selvagens e domésticos. Possuem ampla distribuição geográfica e podem ser transmitida de um animal ao outro e dos animais aos humanos. Nos mamíferos terrestres (METCALF; LUCHSINGER; RAY, 1994) e aquáticos (EWALT et al., 1994), a brucelose resulta em aborto e infertilidade, enquanto nos humanos os sintomas, na maioria das vezes, são inespecíficos, mas podem ser caracterizados por febre, insônia, impotência sexual, distúrbios digestivos, cefaleia, astenia, sinusite severa, fadiga, perda de peso, linfadenopatia e esplenomegalia (YOUNG, 1983; TRYLAND, 2000).

Os répteis podem ser reservatórios de leptospirosas, permanecendo saudáveis mesmo quando infectados pela bactéria (SANTA ROSA et al., 1980). Ao estudar serpentes peçonhentas e não peçonhentas, esses autores puderam observar que ambas foram reagentes à *Leptospira* e sugeriram que a infecção pode ter sido transmitida por roedores infectados predados por elas. As sorovariedades encontradas nessa investigação foram Andamana, Icterohaemorrhagiae, Ballum, Biflexa, Grippytyphosa e Pomona. Em estudos realizados com sapos africanos selvagens

(*Pyxicephalus edulis*) foi sugerida uma nova espécie de *Brucella* móvel e atípica com capacidade de utilizar todas as classes de vertebrados como hospedeiros, incluindo peixes, anfíbios e répteis (EISENBERG et al., 2012).

Conforme descrito anteriormente, já existem alguns trabalhos sobre a leptospirose e a brucelose em animais selvagens, mas essas doenças, tanto nas populações de *P. expansa* de vida livre quanto nas de cativeiro, ainda são pouco estudadas. Com isso, a falta de conhecimento da cadeia epidemiológica da doença nos animais selvagens dificulta a elaboração de planos estratégicos e a aplicação de medidas profiláticas.

A dificuldade de realização de exames clínicos apropriados devido às particularidades anatômicas e comportamentais da espécie, além de alterações metabólicas sem sinais e sintomas perceptíveis durante tais exames, prejudica o fechamento do diagnóstico. Isso faz das técnicas laboratoriais peças-chave para o manejo e as avaliações clínicas necessárias para a sobrevivência dos exemplares de vida livre e dos criados em cativeiro. Assim, torna-se essencial a utilização de exames complementares como a sorologia e a biologia molecular, a fim de verificar a passagem do agente ou a presença no organismo do indivíduo.

Diante do exposto, os objetivos do estudo foram:

- (i) Detectar anticorpos contra *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em soros sanguíneos de *P. expansa* de vida livre e criadas em cativeiro;
- (ii) Pesquisar a presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp., nas amostras dos animais de vida livre e criados em cativeiro e nas amostras do meio onde vivem, por meio da técnica de PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*)

Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia - SBH (2008), o Brasil é o país com a terceira maior diversidade de répteis do mundo, com 701 espécies. Os répteis são representados por quatro Ordens: Crocodilia, Rhynchocephalia, Squamata e Testudines (POUGH; JANIS; HEISER, 2003), sendo a última constituída de doze famílias, 90 gêneros e aproximadamente 280 espécies, das quais 20% ocorrem na América do Sul (SOUZA, 2004; BOYER; BOYER, 2006).

Os representantes da Ordem Testudines são ectotérmicos, têm o corpo protegido por um casco ósseo, apresentam crânio anápsido (LEGLER, 1993; ROSSI, 2006), são desprovidos de dentes e na parte rostral do crânio possuem bico córneo formando uma superfície trituradora (KELLNER; SCHWANKE, 2001). Além disso, possuem pálpebras, língua não extensível, pescoço geralmente retrátil e com oito vértebras, membros basicamente pentadáctilos e vivem em regiões tropicais e temperadas (ORR, 1999).

Dentro da família Podocnemididae, encontra-se o gênero *Podocnemis*, com seis espécies sul-americanas: *P. expansa*, *P. erythrocephala*, *P. vogli*, *P. lewyana*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989). Conforme Pritchard e Trebbau (1984) e Ernest e Barbour (1989), esse gênero originou-se antes do período Cretáceo, há cerca de 158 milhões de anos, e seus representantes apresentam o pescoço retrátil lateralmente, com especializações vertebrais associadas, 13 escudos plastrais, cintura pélvica fundida tanto à carapaça quanto ao plastrão, sem dobradiça, e possuem forma oval ligeiramente achatada.

A tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) é a espécie mais conhecida do gênero *Podocnemis*, sendo encontrada nas bacias do rio Orinoco, do rio Essequibo e na bacia do rio Amazonas, onde ocorre em quase todos os afluentes (IVERSON, 1992; PRITCHARD; TREBBAU, 1984). No Brasil, sua distribuição é ampla nos Estados do Amapá, Pará, Amazonas, Rondônia, Acre, Roraima, Tocantins, Goiás e Mato Grosso,

englobando ecossistemas da floresta equatorial e do cerrado, nas regiões Norte e Centro-Oeste (BRASIL, 1989).

É o maior Testudine de água doce da América do Sul (ALHO; CARVALHO; PÁDUA, 1979; MOLINA; ROCHA, 1996), chegando a medir 75 a 107 cm de comprimento por 50 a 75 cm de largura (RODRIGUES, 1992) e pesar aproximadamente 60 Kg (SMITH, 1979). Também pode ser conhecido, vulgarmente, como tartaruga-do-amazonas, tartaruga-gigante, tartaruga-do-corpo-escondido, uarara-açu e, os machos, como capitari (ALFINITO; VIANA; SILVA, 1997). Possuem vida longa, com demorada maturação sexual e, por isso, baixa taxa de substituição de indivíduos na população (ALFINITO, 1973; PRITCHARD, 1979). Conforme Ferri (2002), as taxas de sobrevivência de diversas espécies desses animais, até a idade adulta, chegam até 2%.

Geralmente, os padrões de atividade dos quelônios estão diretamente associados às condições climáticas, cujos índices de precipitação pluviométrica e a temperatura do ar ou da água estão entre os principais fatores ambientais que definem o comportamento das espécies (SOUZA, 2004). A reprodução da família Podocnemididae depende do ciclo anual de enchente e vazante dos rios, com a desova e a incubação realizadas na seca e o nascimento dos filhotes coincidindo com início da cheia dos rios (ALHO; PÁDUA, 1982a, FACHÍN-TERÁN, 1992; THORBJARNARSON; PEREZ; ESCALONA, 1993). Em vida livre, o início da vazante parece ser o estímulo que desencadeia a migração das fêmeas adultas de *P. expansa* até o local de nidificação, uma vez que no período da cheia os adultos são encontrados nos lagos e na seca, agregados nos rios (ALHO; PÁDUA, 1982a,b).

Segundo Vanzolini (1967), Alho, Carvalho e Pádua (1979) e Alho e Pádua (1982a), o comportamento de nidificação da espécie é composto por sete fases: agregação da população nas águas rasas próximas à praia de nidificação; subida à praia para se exporem ao sol durante as horas quentes do dia; subida à praia à noite com caminhada de vistoria e escolha do sítio de nidificação; escavação do ninho; postura; preenchimento e compactação do ninho e retorno à água

A saída da água para a desova ocorre após a meia-noite, momento em que as fêmeas adultas sobem para o banco de areia em grupos de centenas e até milhares, onde cada uma escava seu ninho na areia e deposita aproximadamente 100 ovos (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; DUPRE; DEVAUX; BONIN, 2006). A caminhada pelo banco de areia é lenta, e todas as etapas desde a saída para a postura até o retorno ao rio, após o fechamento do ninho, podem demorar mais de 2 horas. Durante esse período, as fêmeas estão vulneráveis, permitindo a aproximação de predadores, inclusive de humanos (ALHO; PÁDUA, 1982a; PRITCHARD; TREBBAU, 1984; VANZOLINI, 2003). De acordo com a CITES¹ (UNEP-WCMC, 2009) e IUCN² (IUCN, 2007), atualmente a espécie está classificada como dependente de conservação para que não entre em risco de extinção.

Desde o período pré-colonial os Testudines de água doce vêm sendo utilizados como fonte de alimento para populações humanas sul-americanas (THORBJARNARSON; PEREZ; ESCALONA, 1993; ESCALONA; FÁ, 1998), causando a diminuição gradativa no número de exemplares das espécies de maior porte (ESCALONA; FÁ, 1998). A espécie *P. expansa*, independentemente do tamanho ou da idade, vem sendo caçada e abatida ilegalmente até mesmo em áreas de proteção ambiental, para obtenção de carne, ovos, pele, gordura e casco necessários para a sobrevivência da população ribeirinha que, pela falta do dinheiro, as fazem de moeda, trocando animais vivos por remédios, roupas e outros bens básicos de consumo (escambo) (BRASIL, 1989).

Em 1863, o naturalista inglês Henry Bates relatou sobre a abundância de quelônios nos rios amazônicos, destacando a espécie *P. expansa* como muito comum até o final do século XIX (KEMENES; PANTOJA-LIMA, 2006). Além disso, Henry Bates afirmou que na época eram colhidos, anualmente, nos rios Solimões e Madeira, aproximadamente 48 milhões de ovos dessa espécie, os quais eram utilizados, em grande parte, para a extração de gordura a ser empregada na iluminação pública, abastecendo os postes nas ruas das cidades (KEMENES; PANTOJA-LIMA, 2006).

¹ Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

² International Union for Conservation of Nature and Natural Resources

Conforme Magnusson (1993), pela falta de pesquisas que visavam ampliar os conhecimentos para o uso sustentável das criações de animais selvagens, no Brasil, a atividade era pouco explorada. De acordo com os autores, essa atividade poderia trazer benefícios para a conservação e o desenvolvimento das regiões que a utilizariam.

Com a Lei de Proteção à Fauna (Lei 5.197/67), que proíbe a captura e a comercialização de animais selvagens da fauna brasileira oriundos de vida livre, surgiram novas alternativas, como a criação comercial legalizada, que se encontra em expansão (SÁ et al., 2004) e visa desestimular a captura ilegal de animais de populações selvagens e proteger as áreas de desova com a oferta de produtos e subprodutos de animais cativos (LIMA, 2000). A criação comercial está regulamentada sob a Portaria 142/92 do IBAMA³.

O alto potencial da espécie *P. expansa* para exploração comercial, particularmente pelo grande porte, pela rusticidade e pelo alto valor econômico dos seus produtos e subprodutos quando comparados aos dos animais domésticos tradicionais, despertou interesse dos produtores, tornando-a uma das espécies selvagens mais exploradas zootecnicamente (MALVÁSIO, 2001; SÁ et al., 2004; DORNELLES; QUINTANILHA, 2003).

De acordo com Souza (2004), as pesquisas com espécies selvagens tiveram grande aumento, principalmente nas áreas de morfologia, nutrição, reprodução, manejo e sanidade. O conhecimento das características relacionadas à bioecologia e ao comportamento é imprescindível para o desenvolvimento dos projetos que visam à conservação das espécies (MALVÁSIO et al., 2005a).

Soares (2000), em estudo realizado durante dez anos (1989 a 1998) no rio Guaporé, Estado de Rondônia, observou alta taxa de mortalidade dos filhotes e embriões de *P. expansa*, enquanto nas fêmeas adultas foi praticamente nula. O autor afirmou ser preocupante o número de animais abatidos pela caça exercida pela comunidade ribeirinha que ameaça a estabilidade da população, tornando ineficientes os resultados do trabalho de manejo e conservação como o Projeto Quelônios da

³ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Amazônia (PQA) daquela região. Conforme Salera Júnior et al. (2009a), a predação das fêmeas em desova no rio Javaés está restrita à onça-pintada (*Panthera onca*), cuja média anual de *P. expansa* abatidas por esse felino foi de 5,66%. A baixa sobrevivência de filhotes associada ao aumento da mortalidade de adultos pela caça ilegal predispõem a espécie ao risco de extinção (POUGH; HEISER; MCFARLAND, 1993).

Mesmo desconhecendo o status das populações naturais, a base das atividades de conservação de Testudines remete às atividades de proteção e manejo dos ninhos (CROUSE; CROWDER; CASWELL, 1987) e filhotes, já que a pressão de predação recai principalmente nessas fases do ciclo de vida desses répteis (GRAND; BEISSINGER, 1997).

De acordo com Rose (1972), os recém-eclodidos são dependentes dos anticorpos maternos até que se tornem imunocompetentes. Brambell (1969) afirmou que os anticorpos maternos induzidos por antígenos aos quais as mães foram expostas são transportados da gema de todo saco vitelino para a circulação do embrião em desenvolvimento, fornecendo aos filhotes imunidade eficaz.

Conforme Maros et al. (2003), os ovos podem ser predados por insetos. Segundo Gibbons (1970), o caminho do ninho até a água, para os filhotes de quelônios aquáticos, é a principal batalha para a sobrevivência, pois nesse trajeto os recém-eclodidos estão vulneráveis e podem ser atacados por anfíbios (IBAMA, 1989), aves, outros répteis e pequenos mamíferos (SALERA JÚNIOR et al., 2009a), e, chegando à água, por peixes (IBAMA, 1989; SALERA JÚNIOR et al., 2009a). De acordo com Salera Júnior et al. (2009b), as fêmeas adultas são predadas por onças-pintadas (*Panthera onca*), durante a fase de desova.

Trabalhos de biometria em ovos (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; MALVÁSIO et al., 2005a; MALVÁSIO et al., 2005b), em animais jovens e adultos (BATAUS, 1998; RODRIGUES et al., 2004) e em neonatos (ERNEST; BARBOUR, 1989; MALVÁSIO et al., 2005a; MALVÁSIO et al., 2005b, ALVES-JÚNIOR et al., 2010a; ALVES-JÚNIOR et al., 2010b) da espécie também já foram realizados em diferentes regiões do Brasil.

Segundo Packard, Packard e Boardman (1982), os ovos das *P. expansa* são

mais predispostos às interferências por fatores ambientais quando comparados aos de outras espécies de Testudines, pois, de acordo com Ernest e Barbour (1989), além de possuírem formato esférico, eles possuem casca flexível e, conseqüentemente, mais porosa.

Salera Júnior et al. (2009c) afirmaram que vários fatores ambientais, como a exposição dos ovos à baixa umidade (LYNN; ULLRICH, 1950), as baixas (MOLINA, 1995) e elevadas temperaturas durante a incubação (MALLMANN, 1994), podem interferir no desenvolvimento embrionário dos quelônios, provocando, assim, o aparecimento de defeitos de casco nos recém-eclodidos. Além disso, segundo Malvásio et al. (2005a), o manuseio dos ovos, como a translocação de ninhos, também pode favorecer o aparecimento de defeitos de escutelação.

Alves-Júnior et al. (2012), ao avaliarem as taxas reprodutivas de 327 ninhos naturais da espécie *P. expansa* na Área de Proteção Ambiental – Meandros do rio Araguaia, observaram que as porcentagens de eclosão dos ovos, não eclosão, sobrevivência e mortalidade dos filhotes nos ninhos foram, respectivamente, 94,63%, 5,37%, 94,24% e 5,76%. Conforme esses autores, a eficiência da incubação/eclosão pode ser afetada pela temperatura e pela umidade, além de doenças infecciosas e poluição ambiental. Futuras investigações a respeito de malformações ou anomalias de incubação merecem atenção, uma vez que podem representar um risco para a espécie (ALVES-JÚNIOR et al., 2012).

2.2. Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose bacteriana infectocontagiosa, aguda ou crônica, que pode acometer diversas espécies de animais domésticos, selvagens e humanos (COLEMAN, 2000; HORSCH, 1999).

De acordo com Plank e Dean (2000), essa enfermidade é cosmopolita, de incidência associada a períodos de alta pluviosidade, ocorrendo principalmente em países tropicais e subtropicais. Como características morfológicas, as leptospiros

apresentam-se em forma de espiroquetas, helicoidais, flexíveis, móveis (0,1 x 6 a 12µm), fortemente espiraladas e com extremidades em forma de gancho (FAINE, 1994; QUINN et al., 2005; FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008). Segundo Faine (1994), essas bactérias possuem dois filamentos axiais (flagelo periplasmático) na região do espaço periplasmático. Quinn et al. (2005) afirmaram que algumas sorovariedades podem ter limitada distribuição geográfica por serem exclusivas de algumas espécies de hospedeiros naturais.

A princípio as leptospiros eram diferenciadas por reações sorológicas, e duas espécies eram reconhecidas: uma patogênica, *L. interrogans*, e outra apatogênica, saprófita, isolada do ambiente, *L. biflexa* (ELLIS, 1995). Segundo Brenner et al. (1999), o gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae e à ordem Spirochaetales, e, de acordo com a nova classificação, elas podem ser diferenciadas por critérios genéticos ou por determinantes antigênicos, ambas as classificações compostas por espécies patogênicas e saprófitas. Além disso, Brenner et al. (1999) e Levett (2001) afirmaram que a classificação genética permite observar que espécies diferentes podem ser semelhantes sorologicamente, como, por exemplo, a sorovariedade Hardjo, que pertence a duas espécies, *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*, devido ao fato de os antígenos superficiais comuns serem compartilhados por esses dois micro-organismos geneticamente distintos. Todavia, alguns pesquisadores identificam as sorovariedades por meio de testes de aglutinação cruzada e testes de absorção de aglutininas (SURUJBALLI; MALLORY, 2004).

Mais de 260 sorovariedades agrupadas em 23 sorogrupos estão definidas, sendo a *L. interrogans* classificada em 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii* (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Diversos meios de cultura são utilizados para manutenção e isolamento dessas bactérias, os quais podem ser líquidos, semissólidos ou sólidos (ADLER et al., 1986; FAINE et al., 1999). Os mesmos autores afirmaram que para crescimento “*in vitro*” das leptospiros mais exigentes utilizam-se suplementos como a albumina sérica bovina e o

Tween 80. Segundo Baseman e Cox (1972), esses agentes utilizam os ácidos graxos saturados de cadeia longa na betaoxidação como fonte primária de carbono e de energia. Contudo, conforme Faine et al. (1999), esses componentes representam um importante fator limitante para o crescimento das leptospiros, devido à toxicidade quando utilizados em elevados níveis, a qual pode ser revertida pela adição de albumina e outros componentes como os detergentes (Tween80).

Os meios de cultura mais utilizados para isolamento e cultura de leptospiros são o EMJH, meio líquido, e o Fletcher, meio semissólido (FAINE, 1982). A temperatura adequada para o crescimento destas bactérias varia entre 28 e 30°C, sendo o tempo de geração, aproximadamente, 12 horas (FAINE et al., 1999).

Para descontaminação de culturas e inibição do crescimento de micro-organismos contaminantes utiliza-se o 5-fluorouracil, que é um análogo da pirimidina, a qual as leptospiros não incorporam (JOHNSON; FAINE, 1984).

Em temperaturas ambientais elevadas, essas bactérias podem sobreviver durante semanas a meses em lagoas, rios, superfícies d'água, solos úmidos e lamas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (PLANK; DEAN, 2000). Já dentro dos hospedeiros, as leptospiros, de espécies patogênicas, podem persistir nos túbulos renais ou no trato genital de animais portadores (QUINN et al., 2005).

São sensíveis à luz solar direta, à dessecação, ao pH ácido, à temperaturas inferiores a 7°C ou superiores a 37°C (BINDER; MERMEL, 1998; FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008), aos desinfetantes comuns e aos antissépticos (BINDER; MERMEL, 1998). Contudo, essas bactérias podem sobreviver, por longo período de tempo, às condições quentes e úmidas, em pH próximo à neutralidade, variando entre 7,2 e 7,4 (BINDER; MERMEL, 1998). Segundo Horsch (1999), apresentam grande sensibilidade à variação de pH, sendo pouco resistentes aos desinfetantes que desviam o pH abaixo de 6 e acima de 11.

Em temperaturas entre 76 e 96°C, as leptospiros morrem imediatamente, e com temperatura de 50°C morrem entre 10 e 35 minutos; a morte por dessecação ocorre entre 1,5 e 16 horas, pela luz difusa entre 8 e 20 dias, pelas soluções a 2% de ácido clorídrico, a 0,5% de fenol, a 0,025% de cloreto de cálcio e 0,25% de formalina, em 5

minutos. No suco gástrico, com ácido clorídrico, morrem entre 5 e 30 minutos, na bile têm sensibilidade considerável, na urina ácida e no leite morrem rapidamente, todavia, na urina com pH neutro ou suavemente básico sobrevivem durante 24 horas (HORSCH, 1999).

De acordo com Radostits et al. (2010a), a umidade e a água são os fatores mais importantes para a permanência e persistência do agente no solo, no qual, quando saturado com água, pode sobreviver até 183 dias. Conforme os autores, em água parada a sobrevivência das leptospiros é maior que em água corrente, na qual já foi descrita a sobrevivência destas espiroquetas durante 15 dias. Além disso, Radostits et al. (2010a) relataram que, pelo fato de a água ser um importante meio de disseminação do agente, maiores serão as chances de surgirem novos casos em áreas planas durante as estações chuvosas, quando a contaminação e a susceptibilidade forem elevadas.

Conforme Quinn et al. (2005) e Figueiredo, Girio e Lemos (2008), cada sorovariedade tem predileção por determinadas espécies animais que podem servir como hospedeiros naturais ou de manutenção, atuando como reservatórios do agente e causando a doença moderada ou subclínica, seguida por excreção prolongada da bactéria na urina, ou ainda como hospedeiros acidentais, que desenvolvem a doença severa e podem transmiti-la para outros animais.

Segundo Horsch (1999), em diversas partes do mundo existem populações selvagens infectadas por leptospiros, especialmente de roedores, que atuam como reservatórios do agente causal. Além disso, o autor afirmou que todos os animais endotérmicos, humanos, e até mesmo animais ectotérmicos podem ser susceptíveis à infecção; as espécies domésticas de maior sensibilidade são caninos, suínos e bovinos, nos quais notam-se diferenças dependendo do tipo e da virulência do agente causal.

Diversos grupos de animais, domésticos ou selvagens, podem servir como fontes de infecção da doença (GIRIO; LEMOS, 2002). Alt e Bolin (1996) relataram que os animais persistentemente infectados são as principais fontes de infecção para outros animais e para os humanos. No entanto, os roedores merecem maior destaque quando se trata a enfermidade como zoonose, já que albergam as leptospiros nos rins e as

eliminam pela urina durante longos períodos, contaminando águas e alimentos (FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008; RADOSTITS et al., 2010a).

Segundo Radostits et al. (2010a), todos os doentes, após a recuperação, podem eliminar estas bactérias pela urina de forma intermitente, agindo como portadores. Como principal via de eliminação das leptospiros destaca-se a urina das fontes de infecção durante a fase de leptospirúria (fase de eliminação de leptospiros na urina) (RADOSTITS et al., 2010a), porém esses micro-organismos também podem ser eliminados por sêmen, secreções vaginais e produtos de abortamento destes animais durante esta fase (FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008). Bovinos podem permanecer com leptospirúria intermitente por um período entre 10 e 180 dias (REBHUN, 1995), já equinos e ovinos não são fontes de infecção comuns, por apresentarem leptospirúria intermitente em grau reduzido (RADOSTITS et al., 2010a).

A transmissão do agente pode ocorrer por contato direto ou indireto (FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008). Urina, sangue, tecidos, monta natural e inseminação artificial com sêmen de touros infectados são as principais vias de transmissão por contato direto, enquanto por contato indireto podem-se destacar água, alimentos e fômites contaminados com leptospiros (FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008). Horsch (1999) afirmou que alimentos contaminados também podem servir como vias de transmissão indireta, contudo, são pouco eficientes, já que estas bactérias são sensíveis à variação de pH gástrico dos hospedeiros.

Conforme Quinn et al. (2005), a patogenicidade das leptospiros está associada à virulência da sorovariedade infectante e à suscetibilidade da espécie do hospedeiro; geralmente a doença grave ocorre em hospedeiros acidentais, porém pode ocorrer em hospedeiros naturais jovens e/ou debilitados.

A invasão por essas bactérias é auxiliada pela motilidade e ocorre através da pele lesada e das mucosas, podendo ocorrer também pela pele íntegra, desde que tenha ficado submersa em água durante longo período de tempo (ALT; BOLIN, 1996; QUINN et al., 2005, FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008). Alt e Bolin (1996) afirmaram que o período de incubação varia entre sete e 14 dias, dependendo da sorovariedade e da dose infectante.

Nos hospedeiros, a leptospirose ocorre em duas fases, a primeira sendo a fase de leptospiremia e a segunda, a fase de leptospirúria (GIRIO; LEMOS, 2002). A leptospiremia ocorre quando as bactérias se multiplicam na corrente circulatória, nos órgãos, principalmente fígado, baço e rins, nos interstício, na linfa e no líquido, causando lesões em vasos que levam a hemorragias, trombos, lesões hepáticas que provocam icterícia e lesões renais que evoluem para problemas de filtração (GIRIO; LEMOS, 2002; FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008; RADOSTITS et al., 2010a). Contudo, Merien et al. (1997) sugeriram que as leptospirosas podem induzir a apoptose (morte celular programada) dos macrófagos, permitindo-lhes escapar da fagocitose na corrente sanguínea. Nos túbulos renais, trato reprodutivo, câmara anterior dos olhos, sistema nervoso e meninges, algumas bactérias podem escapar do sistema imunológico do hospedeiro e permanecer no organismo, sendo eliminadas pela urina, sêmen e corrimento vaginal de animais infectados durante meses a anos; fase de leptospirúria, fase intermitente (REBHUN, 1995; ALT; BOLIN, 1996; QUINN et al., 2005).

Conforme Quinn et al. (2005), tanto a gravidade quanto as manifestações clínicas da leptospirose são variáveis, podendo os infectados apresentar moderadas alterações do sistema urinário e genital ou doença sistêmica sérica. Outro detalhe a ser observado é a espécie infectada e a sorovariedade responsável pela infecção, pois os hospedeiros poderão ser naturais ou acidentais (FIGUEIREDO; GIRIO; LEMOS, 2008). Hanson (1982) e Thiermann (1984) relataram que em alguns animais a infecção é inaparente, tornando-os portadores são ou animais convalescentes, os quais eliminam as bactérias pela urina durante meses ou anos.

Como hospedeiros naturais da *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo destacam-se os bovinos e, além disso, acredita-se que essa sorovariedade seja hospedeiro-adaptada a ovinos (COUSINS et al., 1989). Segundo Ellis, Montcomeri e Mcparland (1989), a *L. interrogans* sorovariedade Hardjo também é hospedeiro-adaptada a bovinos, mas, por ser mais virulenta do que a *L. borgpetersenii* sorovariedade Hardjo, esporadicamente pode causar doença nesses ruminantes.

Novilhas introduzidas em rebanhos leiteiros infectados podem se infectar e apresentar a forma aguda da doença, resultando em febre, abortos, natimortos,

agalactia (ausência de leite durante o período de amamentação) e problemas de locomoção. Em rebanhos ovinos de criação intensiva, infecções com a sorovariedade Hardjo também podem causar os mesmos sinais anteriormente citados (QUINN et al., 2005).

Jovens ruminantes, bezerros e cordeiros, podem desenvolver a forma grave da leptospirose quando se infectam com as sorovariedades Icterohaemorrhagiae, Pomona ou Grippotyphosa, apresentando anorexia, febre, agalactia, mastite, icterícia e hemoglobinúria, além disso, caso haja lesão renal, resultando em uremia, a enfermidade pode levar ao óbito dos animais (BOLIN et al., 1991; QUINN et al., 2005). Horsch (1999) afirmou que os sinais mais perceptíveis são o abortamento e a hemoglobinúria. Natimortalidade, retenção de placenta, nascimento de crias fracas e infertilidade são sinais sugestivos de sequelas da infecção (BOLIN et al., 1989). Conforme Girio e Lemos (2002), a infecção pelas sorovariedades Hardjo ou Pomona pode permanecer por mais de 142 dias no útero de vacas prenhes e mais de 97 dias no útero de fêmeas não gestantes.

Para o diagnóstico seguro da leptospirose são necessárias complexas investigações laboratoriais, além do estudo clínico, patológico e epidemiológico da enfermidade (HORSCH, 1999).

Quinn et al. (2005) afirmaram que, mesmo sendo bactérias Gram-negativas, as leptospirosas não se coram bem com corantes bacteriológicos convencionais, sendo visualizadas em microscopia de campo escuro. Outros recursos para a visualização do agente sugeridos pelos autores supracitados são as técnicas de impregnação pela prata e as técnicas imunológicas utilizadas para identificação nos tecidos.

De acordo com Horsch (1999), o diagnóstico da leptospirose pode ser realizado de duas maneiras: diagnóstico direto, no qual se identifica o agente etiológico, e indireto, realizado a partir dos anticorpos produzidos pós-infecção.

Para o diagnóstico direto, pode-se fazer a histopatologia de órgãos que em seguida terão seus fragmentos corados pelo método de Levaditi (HORSCH, 1999); esfregaços de líquidos como sangue (RADOSTITS et al., 2010a), urina (LEVETT, 2001), sêmen e conteúdo estomacal de fetos abortados, corados pelo método de

Fontana-Tribondeau (RADOSTITS et al., 2010a); imunofluorescência direta em fetos abortados e natimortos (GIRIO; LEMOS, 2007); isolamento em meios de cultivo (Fletcher) (GIRIO; LEMOS, 2007); exame direto da urina, sangue, sêmen e conteúdo estomacal de fetos abortados com leitura em campo escuro (RADOSTITS et al., 2010a); e a identificação molecular realizada pelas técnicas de PCR (CETINKAYA et al., 2000) e PCR em tempo real (qPCR) (TRUCCOLO et al., 2002).

As provas sorológicas são utilizadas para o diagnóstico indireto de leptospirose, sendo a soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos a prova confirmatória de eleição e a prova de referência pela Organização Mundial de Saúde tanto para o diagnóstico em animais como em humanos (GIRIO; LEMOS, 2007).

Segundo Faine (1994), os antígenos vivos, conhecidos como sorovariedades, são provenientes de cultura de estirpes-padrão que, posteriormente, são mantidos em meios de cultura específicos até serem utilizados nas reações. Além disso, o autor afirmou que a escolha das sorovariedades que irão compor a coleção de um laboratório de diagnóstico da doença dependerá da prevalência na região, sendo necessário pelo menos um representante por sorogrupo.

Frequentemente os resultados da SAM demonstram que mais de uma sorovariedade está envolvida, sugerindo a existência de uma infecção mista ou reações cruzadas (GIRIO; LEMOS, 2002). Esses resultados dificultam a interpretação dos quadros, porém a repetição dos exames com nova amostra do mesmo animal normalmente indica título maior para a sorovariedade responsável pela infecção (DIESCH, 1980).

Título 100 ou superior pode ser interpretado como residual de uma infecção, porém em animais não vacinados se tornam significantes (DIESCH, 1980). O mesmo autor afirmou que títulos acima de 400 ou mudança de negativo para positivo de amostras pareadas em animais clinicamente afetados são indicativos de infecção ativa. Segundo Girio e Lemos (2002), quando o título permanece abaixo de 100, na repetição do teste, sugere-se que a doença ainda não foi observada ou está em fase de evolução. De acordo com Almeida et al. (1994), títulos entre 100 e 200 são considerados baixos.

Conforme Radostits et al. (2010a), o diagnóstico diferencial da enfermidade depende da forma como ela ocorre em cada espécie. De acordo com os autores supracitados, a leptospirose aguda nos bovinos deve ser diferenciada de outras doenças caracterizadas por provocarem anemia hemolítica, como hemoglobinúria pós-parto, hemoglobinúria bacilar, babesiose, anaplasmoses, intoxicação crônica por cobre, anemia hemolítica da água fria em bezerros, envenenamento por colza e couve, induzida por drogas e reações de transfusões de sangue. Já a leptospirose crônica provocando aborto nas espécies deve ser diferenciada de rinotraqueíte infecciosa bovina, aborto provocado por protozoários (*Sarcocystis* sp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*), brucelose, diarreia viral bovina, placentite micótica, *Campylobacter* e *Actinomyces pyogenes* (RADOSTITS et al., 2010a).

Ainda não está bem definida a função dos animais selvagens como fontes de infecção para os domésticos (BENDER; HALL, 1996). Conforme Girio et al. (2004), a enfermidade em espécies selvagens ainda é pouco estudada no Brasil, dificultando o conhecimento da cadeia epidemiológica e a elaboração de planos estratégicos de controle da leptospirose em regiões com grande densidade de animais, matas e rios.

Corrêa et al. (2004) afirmaram que diferentes espécies sinantrópicas e selvagens podem estar envolvidas na epidemiologia dessa enfermidade, atuando, inclusive, como fontes de infecção (MICHNA; CAMPBELL, 1970). De acordo com Richardson e Gauthier (2003), várias espécies de vida livre podem se tornar portadoras e contribuir para a disseminação da bactéria na natureza.

O primeiro estudo da leptospirose em animais selvagens foi realizado por Pestana, Santa Rosa e Troise (1961). Os autores investigaram o soro de 51 preás (*Cavia aperea azarae*) de vida livre, dos quais 26 (51,9%) apresentaram-se sororreagentes à sorovariedade Icterohaemorrhagiae.

Em uma investigação realizada com animais do pantanal sul-matogrossense, Ito et al. (1998), ao avaliarem amostras de soro pela prova de soroaglutinação microscópica (SAM), constataram que 66,6% dos queixadas (*Tayassu pecari*), 33,3% das capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e 14,3% dos catetos (*Pecari tajacu*) estudados foram reagentes à sorovariedade Patoc.

Mathias, Girio e Duarte (1999), ao estudarem 17 veados-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) do pantanal mato-grossense, identificaram quatro sororreagentes às sorovariedades Hardjo (n=2) (11,7%), Wolffi (n=1) (5,9%) e Mini (n=1) (5,9%). Posteriormente, Girio et al. (2004), avaliando esta espécie de veados oriundos da mesma região, verificaram que das 41 amostras testadas quatro (9,7%) foram reagentes, sendo duas (4,9%) à sorovariedade Wolffi, uma (2,4%) à Mini e outra (2,4%) à Hardjo.

Fontana (2011), ao avaliar sorologicamente 151 porcos-monteiros (*Sus scrofa domesticus*) capturados nas regiões de Nhecolândia e Abobral do pantanal sul-mato-grossense, identificaram 108 (71,5%) sororreagentes, sendo as sorovariedades mais frequentes a Icterohaemorrhagiae (n=67) (62,0%), a Pomona (n=29) (26,8%) e a Autumnalis (n=19) (17,6%).

Estudos sorológicos de 21 tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de vida livre, oriundos dos Parques Nacionais da Serra da Canastra e das Emas e da Reserva SESC do Pantanal, foram realizados por Miranda (2008). O pesquisador encontrou 12 (57,1%) espécimes sororreagentes a *Leptospira* spp., e as sorovariedades encontradas foram Autumnalis, Bataviae, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Sentot e Butembo.

Ao estudarem 61 amostras de soro de felídeos neotropicais do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e do Zoológico Municipal Bosque Guarani em Foz do Iguaçu - PR, Guerra-Neto et al. (2004) identificaram 28 (43,4%) reagentes, e as sorovariedades encontradas foram: Castellonis, Hardio, Grippytyphosa, Bratislava, Patoc, Butembo, Andamana, Autumnalis.

Guerra-Neto (2006), ao estudar 359 amostras de soro sanguíneo de diferentes espécies de felídeos neotropicais de cativeiro provenientes de 41 instituições localizadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, detectou 46 (12,81%) indivíduos reagentes na SAM. Segundo o autor, as espécies que apresentaram amostras de soro reagentes e as sorovariedades encontradas foram: *Panthera onca* (Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Pomona, Andamana e Patoc); *Puma concolor* (Canicola, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e

Grippotyphosa); *Leopardus pardalis* (Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona, Andamana e Patoc); *Leopardus tigrinus* (Icterohaemorrhagiae); e *Herpailurus yagouaroundi* (Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae).

Nos zoológicos brasileiros também já foram iniciadas investigações sorológicas dos animais cativos. Esteves et al. (2005), ao avaliarem os 166 animais que compunham o zoológico de Uberaba – MG, entre eles mamíferos, aves, répteis e peixes, detectaram reações sorológicas contra *Leptospira* spp. em 17 (10,2%) deles, sendo as sorovariedades encontradas Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Andamana e Patoc. Conforme esses autores, uma amostra (6,25%) dos *Chelonoidis* spp. (jabuti) foi reagente à sorovariedade Andamana e outra (5%) das *Trachemys* spp. (tigre-d'água) foi reagente à sorovariedade Patoc; os títulos foram 100 para ambas as amostras.

Silva et al. (2010), ao analisarem amostras de soro de 388 animais (110 (28,4%) répteis, 143 (36,8%) aves, 110 (28,4%) mamíferos e 25 (6,4%) peixes) do zoológico de Ribeirão Preto – SP, observaram que 103 (26,5%) amostras apresentaram aglutininas contra *Leptospira* spp., sendo as sorovariedades mais frequentes: Patoc, Andamana, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Panama. De acordo com os autores, das 44 amostras de soro de *T. scripta elegans*, 26 (59,1%) foram reagentes às sorovariedades Andamana, Tarassovi e Canicola; das 29 amostras de soro de *Chelonoidis* spp., oito (27,6%) apresentaram anticorpos contra as sorovariedades Patoc, Hebdomadis e Canicola e das amostras de soro das *Phrynops geoffroanus* (n=2), das *P. expansa* (n=4) e das *P. unifilis* (n=2), detectaram uma (50%), três (75%) e duas (100%) amostras reagentes na SAM, respectivamente; a sorovariedade diagnosticada nas *P. geoffroanus* foi a Canicola e nas *P. expansa* e *P. unifilis* foram a Panama e a Pomona.

Conforme Oliveira (2003), estudos de leptospirose em répteis são escassos, mas indicam que, em Testudines, a sorovariedade de maior frequência é a Pomona. Entretanto, Glosser et al. (1974) encontraram aglutininas contra a sorovariedade Tarassovi e a identificaram em cultura a partir de tecido renal de quelônios da espécie *Trachemys scripta elegans*.

2.3. Brucelose

A brucelose é uma zoonose bacteriana infectocontagiosa de evolução crônica, caracterizada pela infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, capaz de acometer animais domésticos, selvagens e humanos (BATHKE, 1999; PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003; OSÓRIO et al., 2008).

Segundo Bathke (1999), essa enfermidade também pode ser conhecida como aborto epidêmico, aborto endêmico, aborto de Bang, febre ondulante e epididimite ovina.

É amplamente disseminada pelo mundo, sendo uma das mais importantes zoonoses de acordo com a OIE (World Organization for Animal Health), a FAO (Food and Agriculture Organization) e a WHO (World Health Organization) (POESTER; GONÇALVES; LAGE, 2002).

Alguns países já conseguiram erradicá-la, entretanto, ainda causa problemas na África, na Ásia, na América do Sul e em alguns países do Mediterrâneo (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003).

Estudos realizados no Brasil demonstraram que a brucelose bovina está disseminada por todo o território nacional e a prevalência depende da região estudada (BRASIL, 2004). As prevalências de fêmeas adultas soropositivas na Bahia (ALVES et al., 2009) e no Tocantins (OGATA et al., 2009) foram de 0,66% e 4,4%, respectivamente. Já a prevalência de animais infectados observada em Santa Catarina foi 0,06% (SIKUSAWA et al., 2009); no Distrito Federal, 0,16% (GONÇALVES et al., 2009a); no Rio Grande do Sul, 1,0% (MARVULO et al., 2009); em Minas Gerais, 1,1% (GONÇALVES et al., 2009b); no Paraná, 1,7% (DIAS J. et al., 2009); em Goiás, 3,0% (ROCHA et al., 2009); em Sergipe, 3,4% (SILVA et al., 2009); no Espírito Santo, 3,5% (AZEVEDO et al., 2009); em São Paulo, 3,8% (DIAS R. et al., 2009); no Rio de Janeiro, 4,1% (KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009); em Rondônia, 6,2% (VILLAR et al., 2009); no Mato Grosso do Sul, 8,5% (CHATE et al., 2009); e no Mato Grosso, 10,2% (NEGREIROS et al., 2009).

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos, curtos,

pequenos, pleomórficos, intracelulares facultativos, imóveis, incapazes de formar cápsulas ou esporos (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003; BRASIL, 2004). Segundo a OIE (2012), esse micro-organismo mede entre 0,6 e 1,5 μm de comprimento e 0,5 e 0,7 μm de largura.

A morfologia das colônias está diretamente associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo da parede celular, que as classifica em lisas ou rugosas (BRASIL, 2004). Conforme Paulin e Ferreira-Neto (2003), a membrana celular das bactérias de colônias lisas é composta por lipídeo A, núcleo oligossacáride e cadeia O, enquanto nas rugosas esta composição é apenas de lipídeo A e parte do núcleo oligossacáride. A composição está relacionada com a virulência do agente, pois *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis* normalmente apresentam morfologia lisa, mas quando mudam para formas rugosas deixam de ser patogênicas (BRASIL, 2004).

Existem dez espécies de brucelas (SCHOLZ et al., 2008), que estão distribuídas em dois grupos: grupo das lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* e a *B. inopinata*) e o grupo das rugosas (*B. ovis*, *B. canis*) (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003; BRASIL, 2004; FOSTER et al., 2007; SCHOLZ et al., 2008; SCHOLZ et al., 2010). As espécies *B. neotomae* e *B. microti* foram isoladas de roedores selvagens (SCHOLZ et al., 2008), e *B. ceti* e *B. pinnipedialis* isoladas de mamíferos marinhos (FOSTER et al., 2007). Poester, Gonçalves e Lage (2002) afirmaram que, no Brasil, a *Brucella abortus* é a mais frequente, seguida pela *B. suis*, enquanto a *B. melitensis* e a *B. neotomae* nunca foram isoladas.

De acordo com Molnár et al. (1997) e Nielsen et al. (2004), a composição antigênica se torna importante devido às possíveis reações cruzadas entre as brucelas lisas no teste de aglutinação, assim como reações cruzadas com outros agentes como, por exemplo, *Leptospira*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Francisella*.

Para o exame bacteriológico do agente são utilizados meios de cultura especiais, tais como o ágar triptose e o ágar brucela. A proliferação da bactéria é lenta, levando,

aproximadamente, três a sete dias para que seja possível a visualização das colônias (CARTER; CHENGAPPA, 1991).

Segundo Bathke (1999), as brucelas são aeróbias, a temperatura ideal para o crescimento das colônias é de 37°C e o pH ótimo varia entre 6,6 e 7,4; em culturas primárias, algumas espécies do micro-organismo necessitam da adição de CO₂ a 5-10% para o desenvolvimento. Além disso, o autor afirmou que essas bactérias possuem crescimento lento em culturas “*in vitro*” por apresentarem grandes exigências nutricionais, sendo necessária a adição de suplementos como sangue, soro ou glicerina; nos meios sólidos as colônias são formadas entre três e sete dias quando mantidas a 37°C.

Devido à constituição da parede celular, as brucelas são resistentes quando em condições naturais, principalmente em ambientes úmidos, com sombreamento e matéria orgânica, o que favorece o agente até que entre em contato com algum organismo susceptível (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003; BRASIL, 2006). Essas bactérias podem sobreviver quatro a cinco horas sob a luz solar direta, quatro dias em solos secos, 66 dias em solos úmidos, 120 dias nas fezes, 150 dias em água poluída e 114 dias em água potável, 180 dias em feto à sombra e 200 dias em exsudato uterino (BRASIL, 2006), no entanto, a sobrevivência é diminuída quando expostas a luz solar direta (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003).

Corrêa e Corrêa (1992) afirmaram que no leite a 10°C esses micro-organismos sobrevivem 10 dias, e até seis meses em queijos, todavia, os métodos de pasteurização ou fervura, assim como vários grupos de desinfetantes químicos, são capazes de inativar o agente (BRASIL, 2006).

De acordo com Bathke (1999), a brucelose é uma importante antropozoonose, pois pode afetar todas as espécies de animais domésticos, diversas espécies de animais selvagens e, ainda, humanos.

Apesar de cada *Brucella* ter seu hospedeiro preferencial, elas também podem acometer outras espécies (ACHA; SZYFRES, 2001; PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003). Conforme Vasconcellos, Ito e Côrtes (1987), há casos de infecções por *B. abortus* em outros animais, além dos bovinos. Nos suínos, a infecção é transitória, porém os

doentes podem servir como fonte de infecção para os bovinos. Paulin e Ferreira-Neto (2003) afirmaram que os equinos são susceptíveis à enfermidade, no entanto são considerados hospedeiros terminais. Já os cães não são acometidos, mas têm importante função na disseminação da doença por carregarem e espalharem restos de aborto nas propriedades rurais (VASCONCELLOS; ITO; CÔRTEZ, 1987).

Bathke (1999) afirmou que já são conhecidas 24 espécies de animais selvagens hospedeiras e transmissoras naturais de brucelas, assim como existem 33 espécies infectáveis experimentalmente.

Do ponto de vista epidemiológico podem ocorrer quatro situações como as infecções de animais selvagens vindas dos domésticos, porém sendo autolimitantes; infecções dos animais selvagens vinda dos domésticos, mas persistindo por longo tempo; infecções dos animais selvagens sem relação com a doença nos domésticos; e surtos da brucelose nos animais domésticos vinda dos selvagens (BATHKE, 1999).

Segundo Acha e Szyfres (2001), humanos são susceptíveis a quatro espécies da bactéria, cujo grau de patogenicidade segue a seguinte ordem decrescente: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*; a *B. ovis* e a *B. neotame* são considerados apatogênicas para humanos.

Conforme Corrêa e Corrêa (1992), a principal via de transmissão da brucelose para humanos ocorria pelo consumo de leite "*in natura*" e derivados, provenientes de animais infectados. Acha e Szyfres (2001) afirmaram que após os processos de industrialização do leite e seus derivados, a transmissão para humanos passou a ser, principalmente, por contato direto com animais infectados e aerossóis, sendo os médicos veterinários, trabalhadores rurais e magarefes os grupos mais afetados. A infecção acidental em laboratórios de diagnóstico também pode ocorrer (MARIANELLI et al., 2007).

A ocorrência da brucelose pode ser significativamente superior entre os animais de propriedades rurais vizinhas quando há contato por meio das pastagens ou da água de consumo, no caso de rios, lagos e represas (SALMAN; MEYER; HIRD, 1984).

A transmissão do agente pode ocorrer de forma direta, em contato com animais infectados, ou indireta, por meio de seus produtos (BRASIL, 2006). Os ovinos, caprinos,

bovinos e equinos podem se infectar com a *Brucella* quando em contato com pastagens, água e fômites contaminados com urina e/ou abortos; em suínos e caninos, a infecção com o agente é facilitada quando ocorre via venérea (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Tortora, Funke e Case (2000) afirmaram que em bovinos infectados a eliminação do agente pode ocorrer pelas fezes, pelo sêmen e por descargas uterinas e quando as fêmeas não estão prenhes a bactéria pode ser excretada no leite.

De acordo com Acha e Szyfres (2001) e Tortora, Funke e Case (2000), os principais fatores de contaminação ambiental por brucelas são os produtos do aborto, que eliminam grande quantidade de bactérias, contaminando, assim, água, alimentos e pastagens. Conforme Lyra (1984), as transmissões entre humanos e desses aos animais são raras e duvidosas.

A transmissão pelo coito não apresenta risco significativo em bovinos e bubalinos, pois o sêmen é depositado na vagina, onde o pH é ácido e a microbiota normal atua como barreira natural (ACHA; SZYFRES, 2001; BRASIL, 2004). Contudo, touros infectados não podem ser utilizados como doadores de sêmen porque na inseminação artificial o sêmen é depositado no útero, local de predileção do agente, permitindo a infecção da fêmea e difundindo a doença nos plantéis (VASCONCELLOS; ITO; CÔRTEZ, 1987; BRASIL, 2004). Bovinos jovens ou machos castrados, infectados, não representam problemas na transmissão para adultos, porém representam risco para os magarefes durante o abate (BATHKE, 1999).

A introdução de animais cuja condição sanitária é desconhecida aumenta o risco da disseminação da brucelose nas propriedades rurais. Assim, torna-se necessário que esses animais sejam procedentes de rebanhos livres ou submetidos aos exames sorológicos, garantindo a condição de não infectados (BRASIL, 2004).

Como porta de entrada destaca-se o trato digestório, cuja infecção se inicia quando o susceptível ingere alimentos e/ou água contaminados (ACHA; SZYFRES, 2001; BRASIL, 2004). No entanto, Acha e Szyfres (2001) afirmaram que a transmissão congênita também pode ocorrer e que o hábito de as vacas lambe-rem os órgãos genitais de suas companheiras também contribui para a transmissão da brucelose.

O período de incubação da doença é variável, podendo ocorrer em poucas

semanas, meses ou anos, e é inversamente proporcional ao desenvolvimento do feto; quanto mais adiantada a gestação, menor será esse período (BRASIL, 2004).

As brucelas penetram as mucosas oral, nasal, genital e/ou ocular, posteriormente são fagocitadas, reproduzidas nos linfonodos regionais e disseminadas pelas vias linfática e hemática no organismo, onde são mantidas nos tecidos ricos em células mononucleares fagocitárias, sobrevivendo por longos períodos dentro dos fagócitos, por escaparem do sistema imune do hospedeiro (BRASIL, 2006); tal fato justifica a cronicidade da doença (NIMRI, 2003). A opsonização do agente o torna mais susceptível à ação dos macrófagos (GORVEL; MORENO, 2002). Conforme Saldarriaga, Ossa e Rugeles (2002), a patogenia da infecção por *Brucella* spp. é complexa por depender das espécies do hospedeiro e da bactéria.

Essas bactérias se instalam preferencialmente nos linfonodos, no fígado, no baço, no úbere, no útero e nos testículos; no útero, o crescimento do agente é favorecido pelo eritritol produzido pelo feto e pelas membranas circundantes (BRASIL, 2006). De acordo com Tortora, Funke e Case (2000), o aborto é provocado pela interrupção da passagem de oxigênio e nutrientes da mãe para o feto pelas lesões placentárias.

De acordo com Nicoletti (1980), as manifestações clínicas da doença dependem da dose infectante e da virulência da cepa, assim como da resistência natural, do estado imunológico, da idade e do estado reprodutivo do animal.

Conforme Bathke (1999), os animais infectados apresentam febre em curto período de tempo, porém na grande maioria das vezes ela não é observada. O autor supracitado afirmou que o aborto é a principal manifestação clínica desta enfermidade, levando à retenção de placenta; nascimentos de crias fracas, natimortos, fetos mumificados e mastite subclínica também podem ocorrer. Nos machos, as orquites e epididimites, que levam à esterilidade, são os sinais mais frequentes (RADOSTITS et al., 2010b).

A brucelose pode ser diagnosticada tanto por métodos diretos, com a identificação do agente, quanto por métodos indiretos, pela detecção de anticorpos produzidos pela resposta imune do hospedeiro frente ao antígeno (BRASIL, 2006).

Existem três métodos diretos de identificação das brucelas como o isolamento e a identificação do agente a partir de materiais de aborto ou secreções, a imunohistoquímica, que pode ser realizada com o material de aborto após a fixação em formol, e a reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual detecta segmentos de DNA da bactéria em materiais oriundos de abortos, secreções e excreções vaginais; a PCR é uma técnica sensível e específica, mas requer equipamentos sofisticados e mão de obra qualificada (BRASIL, 2004).

Conforme Sutherland (1980) e Nimri (2003), o isolamento do micro-organismo é o método mais confiável, tanto para humanos quanto para animais, porém é exigente e não é um método de rotina, o que torna os exames sorológicos os mais utilizados.

Para que seja realizada a identificação das espécies de *Brucella* spp. utilizam-se as provas bioquímicas: necessidade de gás carbônico (CO₂), produção de ácido sulfídrico (H₂S), crescimento em presença de fucsina ou tionina e aglutinação frente a soros monoespecíficos (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

Como técnica alternativa e complementar ao isolamento, destaca-se a PCR, capaz de detectar um segmento de DNA específico da brucela em materiais suspeitos de forma rápida, quando comparado ao isolamento (BRICKER, 2002). Além disso, apresenta alta especificidade e sensibilidade, porém é de alto custo (PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003). Mattar, Khneisser e Abdenor (1998) afirmaram que para o diagnóstico da brucelose humana a melhor técnica é a PCR, por ser rápida e específica.

Existem vários testes indiretos disponíveis para o diagnóstico da brucelose, mas cada país escolhe aqueles mais adequados à sua realidade e que auxiliem no controle e erradicação da doença (BRASIL, 2004). No Brasil os testes oficiais definidos pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) são a prova do antígeno acidificado tamponato (AAT), utilizado para triagem, o teste do anel em leite (TAL), utilizado para vigilância epidemiológica, e o teste do 2-mercaptoetanol (2-ME) e a reação de fixação do complemento (RFC), utilizados como confirmatórios. Também existe o teste de polarização fluorescente (TPF), utilizado como teste único ou confirmatório em animais reagentes ao teste do AAT ou

inconclusivos no teste do 2-ME (BRASIL, 2010).

Ainda existem outros testes como o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto (I-ELISA), com sensibilidade e especificidade altas e semelhantes à do AAT, e o ELISA competitivo (C-ELISA), que é o teste indicado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como confirmatório e também possui alta sensibilidade e especificidade, porém é de alto custo (BRASIL, 2004).

Segundo Davis (1990), a transmissão da brucelose dos animais selvagens, considerados reservatórios naturais, para os domésticos assume importante papel na epidemiologia da doença. Metcalf, Luchsinger e Ray (1994) afirmaram que o ciclo da bactéria é complexo e incompreendido, e os animais selvagens são responsáveis pela manutenção da bactéria em ambientes naturais ou, ainda, pela reintrodução da doença em rebanhos livres.

De acordo com Paulin e Ferreira-Neto (2003), os principais reservatórios naturais são os ungulados selvagens, que atuam como mantenedores da *Brucella* spp. em regiões antrópicas. No Brasil, já foram diagnosticadas capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e catetos (*Tayassu tajacu*) da região do pantanal matogrossense, sororregantes (ITO et al., 1998), além de queixadas (*Tayassu pecari*) de vida livre e criados em cativeiro (MANGINI et al., 1998). Na Venezuela, anticorpos contra a enfermidade foram detectados em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (LORD; FLORES, 1983). Outros países já isolaram as brucelas em diversas espécies de mamíferos selvagens como lhamas, búfalos, bisões, camelos, dromedários e antílopes (ACHA; SZYFRES, 2001), e inclusive em espécies selvagens de mamíferos marinhos (CLOECKAERT et al., 2003).

Ewalt et al. (1994) isolaram a *Brucella* spp. em feto de golfinhos (*Tursiops truncatus*) de cativeiro. Posteriormente, na mesma espécie de golfinhos, Miller et al. (1999) detectaram o agente na placenta de dois fetos abortados. Tryland (2000) identificou anticorpos contra *Brucella* em análises sorológicas e isolou a bactéria em amostras de necropsia em várias espécies de cetáceos e pinípedes.

Eisenberg et al. (2012), ao estudarem amostras de sapos africanos selvagens, mortos ou moribundos, da espécie (*Pyxicephalus edulis*), observaram que os isolados

examinados apresentaram-se geneticamente relacionados com a *Brucella* spp. e, com isso, sugeriram se tratar de uma nova espécie de *Brucella*, móvel e atípica com capacidade de utilizar todas as classes de vertebrados como hospedeiros, incluindo peixes, anfíbios e répteis. De acordo com os autores, trata-se da primeira espécie de *Brucella* móvel registrada até o momento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Captura e colheita de material dos animais de vida livre

Os animais de vida livre utilizados na pesquisa foram capturados e tiveram suas amostras biológicas colhidas mediante a aprovação pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA), em reunião ordinária de 17 de junho de 2009 (página xi) e a licença SISBIO nº 19662-1, emitida dia 06 de abril de 2009 (páginas xii e xiii).

Todos os exemplares foram capturados na Área de Proteção Ambiental (APA) – Meandros do Araguaia (13°17'49.0"S 50°36'16.5"W até 13°30'00.0"S 50°43'29.51"W), uma das bases do Projeto Quelônios da Amazônia (PQA), do Centro Nacional de Manejo e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Figura 1).

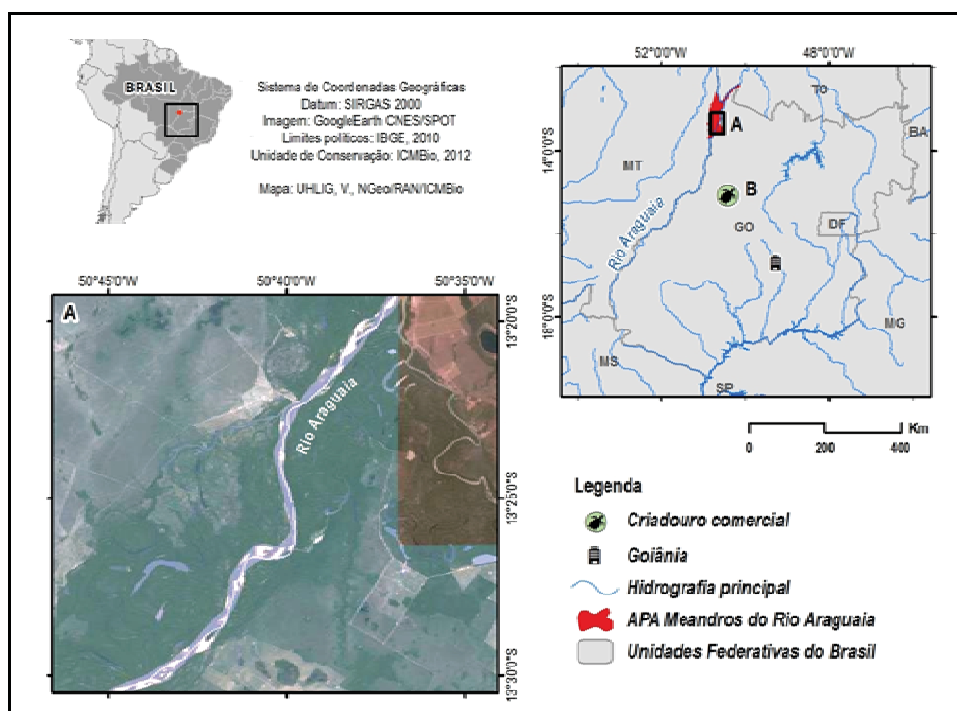


Figura 1: Localização da área de estudo. (A) Área de Proteção Ambiental - Meandros do rio Araguaia.

Nesta região, existiam fazendas com criações extensivas de bovinos de corte que utilizavam o rio Araguaia e os lagos (braços do rio) como fontes de fornecimento de água para os rebanhos.

Pela dificuldade em estimar a população de tartarugas-da-amazônia (*P. expansa*) que vivem na região onde foram colhidas as amostras, determinou-se que seriam utilizadas 480 *P. expansa* de vida livre, sendo: 40 fêmeas em desova, capturadas nos bancos de areia do rio Araguaia e 10 recém-eclodidos de cada uma dessas fêmeas, totalizando 400 filhotes; e 40 indivíduos capturados no lago (braço do rio Araguaia), independentemente de idade e sexo.

Planilhas foram confeccionadas e nelas foram identificadas praias, estacas, fêmeas, data da desova e provável data de eclosão dos filhotes. Todas as praias da APA – Meandros do rio Araguaia foram identificadas com placas em ordem alfabética (Figura 2a), e os ninhos de cada praia foram identificadas com estacas numeradas em algarismos arábicos (Figura 2b). As 40 matrizes de vida livre, após cobrirem os ninhos com areia, foram capturadas manualmente e transferidas em canoas (Figura 3) para o acampamento da APA, onde se realizou a colheita das amostras.

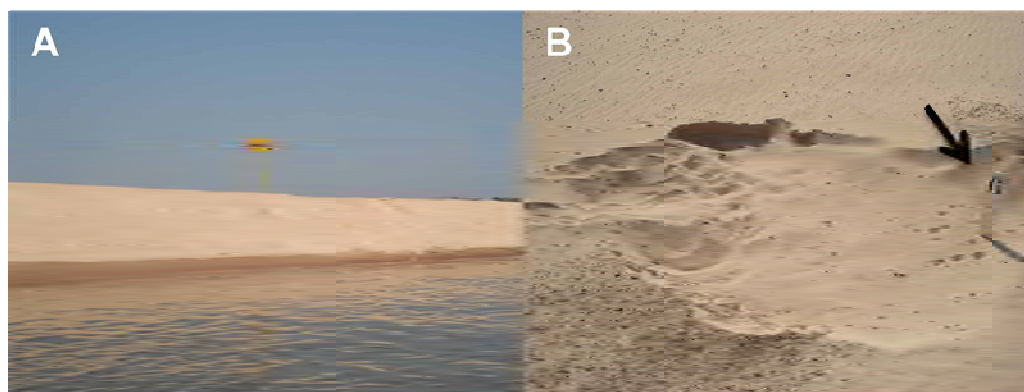


Figura 2: Métodos de identificação de praias de desova e ninhos das *P. expansa* na APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Placa de identificação da praia; (B) Estaca de identificação do ninho (seta).



Figura 3: Transporte das matrizes de vida livre, após a desova, para o acampamento da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010.

Todos os recém-eclodidos foram retirados dos ninhos após os 60 dias de incubação, data próxima à saída dos filhotes (Figura 4a). De cada fêmea foram selecionados 10 filhotes com deformidades de casco (Figura 4b), como: achatamento da carapaça e/ou plastrão, falta de escudos na carapaça e/ou plastrão e outras irregularidades do casco.

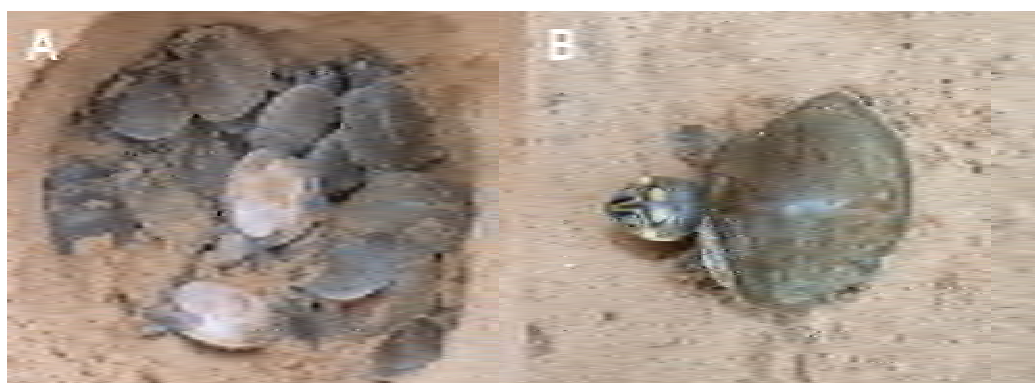


Figura 4: Filhotes de *P. expansa* capturados nos bancos de areia da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Ninho contendo filhotes de *P. expansa* recém-eclodidos; (B) Filhote de *P. expansa* com defeito de casco.

Os 40 Testudines de vida livre oriundos do lago foram capturados com armadilhas conhecidas como “cambuins” (Figura 5a,b), cada uma contendo cinco metros de linha e um anzol de aço oxidável. A captura dos animais foi realizada entre as oito e dez horas da manhã e as 16 e 18 horas da tarde. Após esses horários todas as armadilhas foram recolhidas do lago.

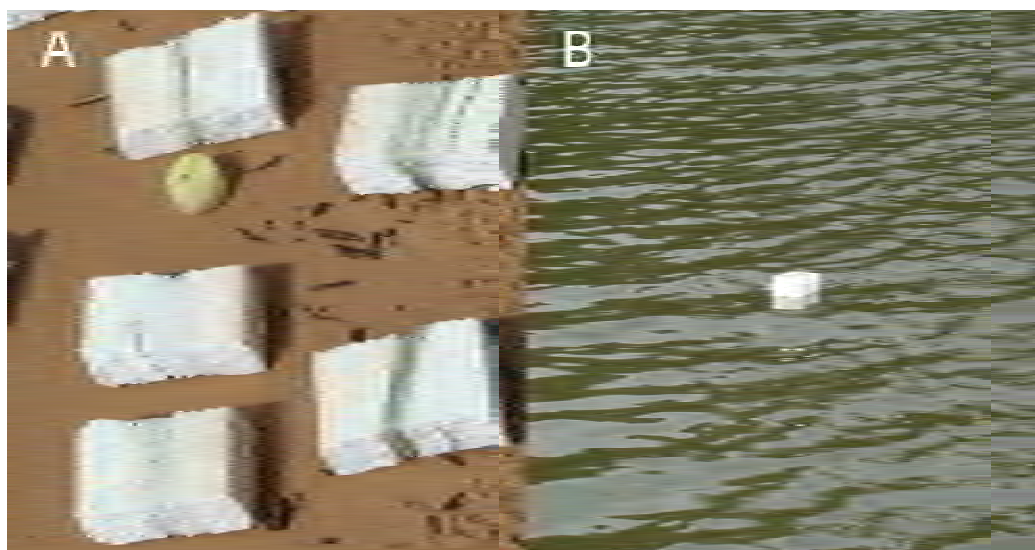


Figura 5: Cambuins utilizados para a pesca das *P. expansa* nos lagos da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Cambuim iscado com casca de melancia e quatro cambuins prontos para serem iscados; (B) Cambuim liberado no lago, pronto para a pesca de uma *P. expansa*.

Das 40 fêmeas em desova e dos 40 indivíduos capturados no lago foram colhidas amostras de sangue, conteúdo estomacal e urina e dos 400 filhotes colheram-se amostras de sangue e órgãos (Tabela 1). Amostras da água e do sedimento do boiادouro⁴ e do lago, assim como as cascas dos ovos dos ninhos utilizados na pesquisa, também foram colhidas.

⁴ Região do rio onde as matrizes em reprodução se aglomeram até o momento adequado para desova.

Tabela 1: Amostras biológicas colhidas das *Podocnemis expansa* de vida livre capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, entre o período de 2009 e 2010.

<i>P. expansa</i>		Sangue	Urina	Conteúdo estomacal	Rins	Fígado	Gônadas
Vida livre (n=480)	Matrizes (♀) (n=40)	X	X	X			
	Filhotes recém-eclodidos (n=400)	X	X	X	X	X	X
	Animais do lago (♀ e ♂) (n=40)	X	X	X			

Para a colheita do conteúdo estomacal seguiu-se a técnica descrita por Alves-Júnior et al. (2011). A colheita da urina foi realizada no momento do procedimento de lavagem estomacal, quando os animais, devido à manipulação, reagem urinando, o que favorecia a colheita.

A colheita do sangue das matrizes e dos exemplares capturados no lago foi realizada pela punção do seio vertebral caudal (Figura 6) utilizando agulhas (25 x 0,7mm) e seringas descartáveis de 3,0mL; o volume total de sangue colhido desses répteis foi 3,0mL.



Figura 6: Colheita das amostras de sangue por punção do seio vertebral caudal das *P. expansa* da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010.

Terminados os procedimentos de colheita de material, tanto as fêmeas adultas capturadas após a desova quanto os indivíduos capturados no lago foram liberados nos respectivos locais de captura.

Já dos recém-eclodidos, as amostras de sangue foram obtidas após a insensibilização e decapitação, conforme a técnica⁵ preconizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) para o abate sanitário de Testudines. Após abatidos, colheram-se as amostras dos órgãos desses filhotes (Figura 7a). Devido ao pequeno tamanho dos órgãos dos recém-eclodidos e à dificuldade de manipulação, optou-se pela colheita em “pool”. Dessa forma, os órgãos de cada filhote foram depositados em um único frasco plástico, esterilizado e identificado (Figura 7b), assim como as cascas dos ovos do ninho ao qual pertenciam.

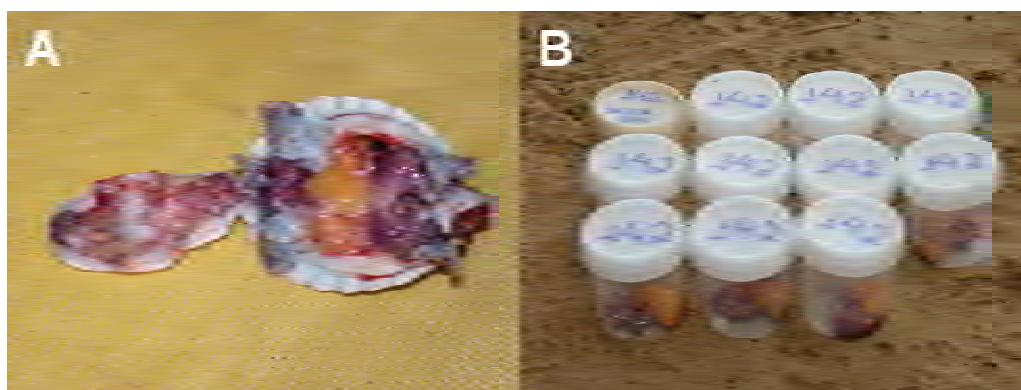


Figura 7: Colheita dos órgãos dos recém-eclodidos da APA – Meandros do rio Araguaia em 2009 e 2010. (A) Recém-eclodido com exposição dos órgãos; (B) Órgãos dos dez filhotes com defeitos de casco e casca dos ovos da fêmea número 142.

O soro extraído do sangue coagulado foi depositado em microtubos de 2,0mL e armazenado a – 20°C até o momento dos exames para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* e anti-*Brucella*.

⁵ A técnica preconizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) para o abate sanitário de testudines já se encontra no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas ainda está em fase de estudos e adaptações.

Todas as amostras de água, sedimento, cascas de ovos e órgãos foram depositadas em frascos plásticos esterilizados, identificados e armazenados à temperatura de -20°C até o momento do exame.

3.2. Captura e colheita de material dos animais de cativeiro

Os espécimes de cativeiro utilizados na pesquisa foram capturados e tiveram suas amostras biológicas colhidas mediante a aprovação pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA), em reunião ordinária de 17 de junho de 2009 (página xi) e a licença SISBIO nº 19662-1, emitida dia 06 de abril de 2009 (páginas xii e xiii).

Todas as *P. expansa* de cativeiro foram provenientes do Criadouro Comercial Fazenda Moenda da Serra (Registro IBAMA 28.771), localizado no município de Araguapaz-GO ($15^{\circ}04'18''\text{S}$ $50^{\circ}25'2.4''\text{W}$), na região do Vale do Araguaia (Figura 8).

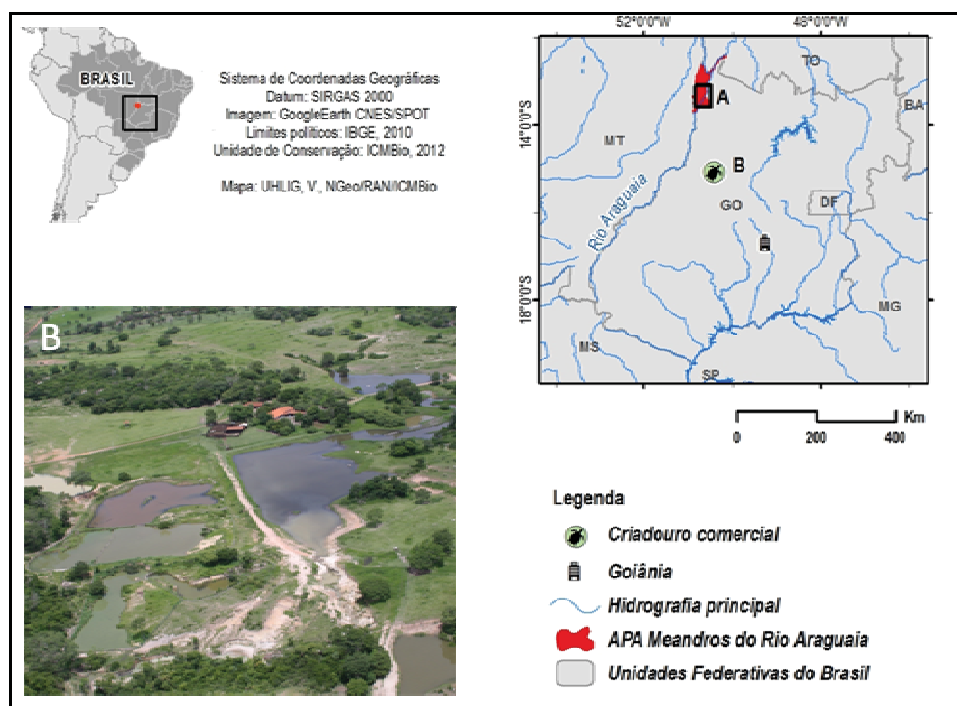


Figura 8: Localização da área de estudo. (B) Criadouro comercial de *P. expansa*.

No criadouro, a fonte de abastecimento de água dos tanques de criação das tartarugas-da-amazônia era a mesma represa que servia de aguada para o rebanho bovino.

A quantidade de animais de cativeiro utilizados nesta pesquisa também não foi determinada estatisticamente, com base na população. Dessa forma, utilizaram-se 120 Testudines, machos e fêmeas, criados em cativeiro (20 do tanque-berçário, 20 do tanque de crescimento 1, 20 do tanque de crescimento 2, 20 do tanque de engorda e 40 do tanque de reprodução).

Todos os exemplares criados em cativeiro foram capturados nos respectivos tanques de criação com o auxílio de redes (Figura 9).



Figura 9: *P. expansa* criadas em cativeiro sendo capturadas com rede de pesca no criadouro em 2009 e 2010.

De todos os indivíduos foram colhidas amostras de sangue, urina e conteúdo estomacal. Exceto dos 40 animais do tanque de reprodução, foram colhidas amostras de rins, fígado e gônadas (Tabela 2). Dos tanques de criação colheram-se amostras de água e sedimento.

Tabela 2: Amostras biológicas colhidas das *Podocnemis expansa* criadas em cativeiro capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, entre o período de 2009 e 2010.

<i>P. expansa</i>		Sangue	Urina	Conteúdo estomacal	Rins	Fígado	Gônadas
Cativeiro (n=120)	Matrizes (♀ e ♂) (n=40)	X	X	X			
	Tanque-berçário (n=20)	X	X	X	X	X	X
	Tanque de crescimento 1 (n=20)	X	X	X	X	X	X
	Tanque de crescimento 2 (n=20)	X	X	X	X	X	X
	Tanque de engorda (n=20)	X	X	X	X	X	X

A colheita do sangue das *P. expansa* acima de cinco quilos foi realizada pela punção do seio vertebral caudal (Figura 10a) e nos répteis de menor massa corporal, pela punção do seio venoso cervical (Figura 10b), ambos utilizando agulhas (25 x 0,7mm) e seringas descartáveis de 3,0mL; o volume total colhido de cada animal foi 3,0mL.

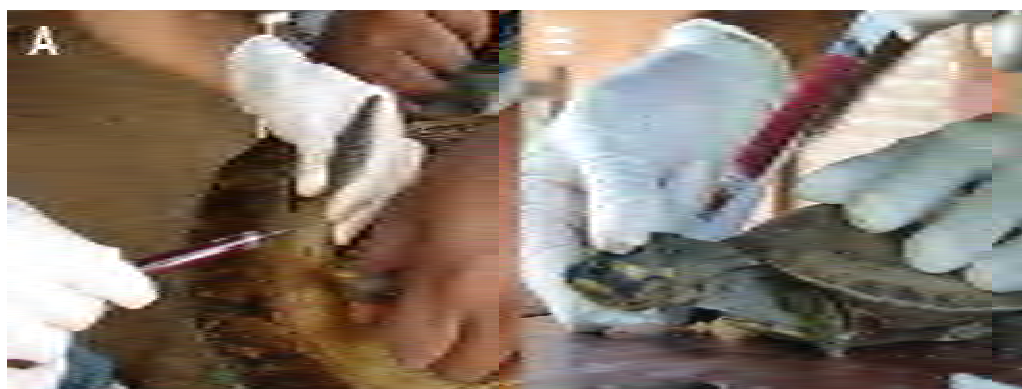


Figura 10: Técnicas de colheita de sangue das *P. expansa* do criadouro comercial, capturadas entre 2009 e 2010. (A) Colheita por punção do seio vertebral caudal; (B) Colheita por punção do seio vertebral cervical.

Das matrizes (♂ e ♀) criadas em cativeiro também colheram-se amostras de urina e conteúdo estomacal conforme as técnicas descritas para as matrizes de *P.*

expansa de vida livre e para os Testudines capturados no lago. Terminados os procedimentos, esses animais foram liberados no respectivo tanque da capturada. Já os outros espécimes do criadouro, após a colheita do sangue, foram abatidos, conforme a técnica de abate citada anteriormente, e deles colheram-se amostras de urina, conteúdo estomacal, fígado, rins e gônadas.

O soro extraído do sangue coagulado foi depositado em microtubos de 2,0mL e armazenado a – 20°C até o momento dos exames para a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* e anti-*Brucella*.

Todas as amostras de água, sedimento e órgãos foram depositadas em frascos plásticos esterilizados, identificados e armazenados à temperatura de – 20°C até o momento do exame.

3.3. Técnicas de Diagnóstico

3.3.1. Teste sorológico para diagnóstico da leptospirose

3.3.1.1. Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM)

No Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose (LDBL) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVPRA) da FCAV – UNESP, as amostras de soro sanguíneo foram diluídas em solução tamponada de Sörensen, segundo Santa Rosa et al. (1970), sendo a diluição inicial de 1/10. Dessa diluição, alíquotas de 50µL foram colocadas em placas de poliestireno, com fundo chato, e adicionada igual quantidade de antígeno, de 24 sorovariedades de leptospira, sendo elas: Wolffi, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Copenhageni, Grippotyphosa, Autumnalis, Panama, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Hebdomadis, Butembo, Cynopteri, Sentot, Andamana, Whitcombi, Pyrogenes, Javanica, Bratislava, Patoc e Castellonis, resultando na diluição de 1/20. A mistura soro-antígeno foi levemente agitada e incubada em estufa BOD à temperatura de 28°C por duas horas, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro (microscópio ZEISS - Axio Imager A1), com objetiva e ocular de 10x, diretamente dos poços da

placa. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiras aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. Os soros reagentes na diluição inicial foram reexaminados com diluições seriadas de razão dois, sendo a primeira diluição 1/50 e as subsequentes 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400. O título do soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição que apresentou pelo menos 50% de aglutinação.

Como não existe padronização do teste para répteis, consideraram-se sororreagentes as amostras cujos títulos foram iguais ou superiores a 20.

3.3.2. Testes sorológicos para diagnóstico da brucelose

3.3.2.1. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT)

Esse método, também conhecido como teste rosa Bengala e “card test”, foi realizado segundo a técnica recomendada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

No LDBL do DMVPRA da FCAV – UNESP, colocaram-se 30µL de soro em contato com 30µL do antígeno em uma placa de vidro, homogeneizou-se a mistura durante quatro minutos, mantendo a placa em movimentos rotatórios constantes, e, em seguida, fez-se a leitura, observando a formação de grumos de aglutinação. O antígeno empregado nessa técnica foi preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3, pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), na concentração de 8% de volume celular, pH 3,63 e corado pelo rosa de Bengala.

3.3.2.2. Teste de polarização fluorescente (TPF)

Para o diagnóstico da brucelose, o método de polarização fluorescente usa o Polissacarídeo-O (OPS) extraído de células de *B. abortus* e conjugado com fluoresceína. O equipamento de leitura de polarização fluorescente modelo Sentry 100® (Diachemix, USA) foi usado para mensurar a taxa de despolarização da luz. Quando não há anticorpos contra *B. abortus*, o teste apresenta leitura baixa. Quando há anticorpos, estes se ligam ao conjugado, resultando em leituras mais altas.

No LDBL do DMVPRA da FCAV – UNESP, foi utilizado o “*Brucella abortus* Antibody Test Kit” produzido por Diachemix, USA. O Kit é composto de quatro componentes, são eles: um controle negativo; um controle positivo; um tampão de reação concentrado 25X; e o antígeno conjugado. Foram utilizados tubos de borossilicato (10 X 75 mm) em perfeito estado de conservação, evitando-se aqueles tubos arranhados, sujos ou que tivessem qualquer defeito próximo à área de leitura.

Utilizou-se a metodologia descrita na bula do kit, com pontos de corte variáveis (FPAa), ou seja, foram consideradas positivas as amostras com leituras superiores a 20 mP (unidades de milipolarização) acima da média de três leituras do soro controle negativo.

3.3.2.3. Reação de fixação de complemento (RFC)

No LDBL do DMVPRA da FCAV – UNESP, empregou-se a microtécnica com incubação a 37°C nas duas fases da reação, recomendada por Alton et al. (1988), com antígeno preparado com *Brucella abortus* amostra 1119/3 para a prova de soroaglutinação em tubos. Todos os reagentes utilizados foram padronizados de acordo com a técnica acima citada.

O complemento utilizado foi o soro de cobaia, sendo empregadas 5 unidades hemolíticas 50%. Já como sistema hemolítico utilizou-se a suspensão de hemácias de carneiro, padronizada em espectrofotômetro para a concentração de hemoglobina de 0,95g/dL, acrescida de igual volume de uma suspensão de hemolisina, que consistia de anticorpos de coelho contra hemácias de carneiro.

O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U”, onde foram adicionados 25µL do soro a ser testado, inativado em banho-maria a 58°C por 30 minutos, em diluições duplas de 1:2 até 1:128, 25µL de antígeno e 25µL de complemento. Após agitação em agitador de microplacas, incubou-se em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 25µL do sistema hemolítico, a placa foi novamente agitada e o material incubado nas condições mencionadas acima, com uma nova agitação, após os primeiros 15 minutos. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. Realizou-se a

leitura comparando com uma escala de hemólise, observando-se o grau de fixação de complemento, com base na quantidade de hemácias restantes e no aspecto do sobrenadante.

O resultado final do teste foi expresso em título, ou seja, a maior diluição do soro que apresentou pelo menos 25% de fixação de complemento. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram título maior ou igual a quatro.

3.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.3.3.1. Preparo das amostras para a PCR e extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras do presente estudo foi utilizado o protocolo de Biase et al. (2002) modificado.

No Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM) do DMVPRA da FCAV – UNESP, aproximadamente dois gramas de cada amostra clínica de fígado, rins e gônadas foram macerados individualmente em solução fisiológica. Para extração de DNA de fígado, rins, gônadas e conteúdo estomacal foram coletados 400µL de cada amostra macerada e transferidos para microtubos de 2,0mL. Para a extração a partir da urina, água e sedimento, 2,0mL de cada amostra foram centrifugados a 13.400 x g e, após, 1,8mL do sobrenadante foi descartado, para que os sedimentos e as bactérias pudessem se concentrar no fundo do tubo. Já para extração do DNA das cascas de ovos de tartaruga, cada amostra foi macerada com nitrogênio líquido e, após, transferiu-se 0,1g para microtubos de 2,0mL.

Para extração de DNA das amostras de fígado, rim, gônadas, urina, conteúdo estomacal, água e sedimento, foram acrescentados ao microtubo 800µL de tampão de extração [Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 25mM pH 8, NaCl 400mM e SDS 0,5% (p/v)] e, para as amostras de ovos, acrescentaram-se 800µL do tampão de extração constituído por Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, NaCl 100 mM e SDS 0,5% (p/v). As amostras foram agitadas em vórtex e mantidas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, sendo agitadas a cada 10 minutos, suavemente. Posteriormente, foram acrescentados 400µL de acetato de potássio 5M à solução, que foi misturada suavemente por

inversão. Nesta etapa, as amostras foram mantidas no gelo por 30 minutos, invertendo-se os tubos a cada 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 13.400 x g por 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi transferido para tubos novos, sendo acrescentados a estes 700µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Para as amostras de fígado e rins acrescentou-se uma etapa anteriormente à do clorofórmio:álcool isoamílico, na qual foram adicionados aos tubos 700µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Em ambas as etapas 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 1.000µL de etanol absoluto gelado, e a solução, após ser misturada suavemente, foi mantida em freezer -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 1.000µL 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 $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 30µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8; EDTA 1mM pH 8) por 24 horas a 4°C.

A avaliação da quantidade e qualidade do DNA foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience), medindo-se a absorbância de cada amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A relação da absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0 caracteriza um DNA de boa qualidade (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo GelRed™ 1x (Uniscience) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®) para verificação da qualidade e quantidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC™ EQ (BioRad).

3.3.3.2. Identificação da *Brucella* spp. e da *Leptospira* spp. pela PCR

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') (MERIEN et al., 1992). Já a identificação de *Brucella* spp. foi realizada pela utilização do par de primers B4 (5'-TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA-3') e B5 (5'-CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG-3'), que amplifica um fragmento de 223 bp desenhado a partir da sequência gênica codificadora do antígeno de 31 kDa de *Brucella abortus* (BAILY et al., 1992).

A amplificação de ambos os fragmentos foi realizada utilizando-se o protocolo da PCR multiplex contendo tampão 1X [100mM Tris-HCl pH 8,8; 500mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40]; MgCl₂ 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,5U de *Taq DNA polimerase*, 5,0 pmol de cada primer (Invitrogen®), 10µL de DNA genômico estoque e água pura estéril q.s.p. 20µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) programado para realizar 1 ciclo a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minuto, e para finalizar, um ciclo a 72°C por 10 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), GelRed™ 1x (Uniscience) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®) para verificação da qualidade e quantidade do DNA. O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC™ EQ (BioRad).

Como controle positivo da *Brucella* spp. utilizou-se o DNA das bactérias (*B. abortus*) oriundas da vacina B19 ou o DNA das bactérias vivas (*B. abortus*) cultivadas no LDBL do DMVPRA da FCAV – UNESP. Já para o controle positivo da *Leptospira* spp. utilizou-se o DNA das leptospiros de qualquer das sorovariedades utilizadas como antígeno nas provas sorológicas. Para a escolha da sorovariedade avaliaram-se, a olho nu, a ausência de contaminação do meio de cultura EMJH, pela coloração, e a formação da nuvem de leptospiros, ao agitar o tubo. Além disso, também foi realizada, em placa tipo ELISA de fundo chato, a avaliação microscopícópica do vigor das bactérias. Para a extração do DNA desses controles positivos de *Leptospira* spp. e

Brucella spp. foi utilizado o reagente comercial DNAzol (Invitrogen®), segundo instruções do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. *Leptospira* spp.

4.1.1. Sorologia dos animais de vida livre

Ao realizar a sorologia das amostras de soro das *P. expansa* de vida livre (n=480) pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), observou-se que 381 (79,38%) amostras foram reagentes (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das *Podocnemis expansa* de vida livre capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.

Teste de SAM				
<i>P. expansa</i>		Nº total	Nº reagentes	Sorovariedades Detectadas
Vida livre (480/381)	Matrizes capturadas nos bancos de areia	40	40	Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Autumnalis, Panama, Bataviae, Australis, Cynopteri, Sentot, Andamana, Whitcombi, Pyrogenes, Javanica, Bratislava, Patoc, Castellonis
	Testudines capturados no lago	40	39	Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Autumnalis, Panama, Bataviae, Australis, Hebdomadis, Butembo, Cynopteri, Sentot, Whitcombi, Pyrogenes, Bratislava, Patoc, Castellonis
	Recém-eclodidos	400	302	Todas as 24 testadas

As sorovariedades de maior prevalência detectadas foram a Panama, a Bataviae, a Pomona, a Hardjo e a Pyrogenes (Figura 11).



Figura 11: Sorovariedades detectadas nas amostras de soro das *P. expansa* de vida livre, capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, entre o período de 2009 e 2010.

A quantidade de animais de vida livre sororreagentes e o título para cada sorovariedade podem ser visualizados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das *Podocnemis expansa* de vida livre, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010, demonstrando a quantidade de sororreagentes e o título.

SOROVARIEDADES	<i>Podocnemis expansa</i> DE VIDA LIVRE n=480			Total de Sororreagentes
	Matrizes (n=40)	Capturadas no lago (n=40)	Recém-eclodidos (n=400)	
Wolffi (n/T)	Nr	nr	15/800	15
Hardjo (n/T)	2/20	10/100	15/1600	27
Icterohaemorrhagiae (n/T)	1/20	8/20	10/800	19
Canicola (n/T)	Nr	nr	8/100	8
Pomona (n/T)	28/400	8/400	8/200	44
Copenhageni (n/T)	Nr	nr	6/200	6
Grippytyphosa (n/T)	Nr	nr	8/200	8
Autumnalis (n/T)	1/50	2/100	9/200	12
Panama (n/T)	37/1600	38/3200	262/6400	337
Bataviae (n/T)	1/20	1/50	51/50	53
Tarassovi (n/T)	Nr	nr	5/100	5
Australis (n/T)	2/100	1/20	10/100	13
Shermani (n/T)	Nr	nr	12/50	12
Hebdomadis (n/T)	Nr	1/20	11/100	12
Butembo (n/T)	Nr	4/50	11/100	15
Cynopteri (n/T)	1/50	2/50	12/100	15
Sentot (n/T)	2/50	4/50	9/200	15
Andamana (n/T)	2/100	nr	9/100	11
Whitcombi (n/T)	1/50	1/50	13/200	15
Pyrogenes (n/T)	1/20	8/200	17/100	26
Javanica (n/T)	2/50	nr	17/100	19
Bratislava (n/T)	1/50	2/50	12/100	15
Patoc (n/T)	3/100	1/50	5/50	9
Castellonis	4/50	3/50	6/100	13

n: número de animais sororreagentes; nr: animais não reagentes; T: título máximo encontrado.

As sorovariedades, detectadas nos Testudines de vida livre, que apresentaram maiores títulos foram: a Panama (6400), a Hardjo (1600), a Wolffi (800), a *Icterohaemorrhagiae* (800) e a Pomona (400).

Os resultados da sorologia das matrizes em relação à sorologia dos respectivos recém-eclodidos podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5: Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das *Podocnemis expansa* de vida livre, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010, comparando as sorovariedades e títulos detectados nas matrizes aos dos respectivos recém-eclodidos.

Sorologia	
Matrizes (n/sorovariedade)	Filhotes (n/sorovariedade)
5/Panama	nenhum filhotes reagiu a esta sorovariedade
2/Castellonis	20/Panama
1/Pomona	10/Panama
1//Panama	10/Bataviae
1/Panama	20/Panama e Pomona
18/Panama	180/Panama
12/Panama	nem todos reagiram a mesma sorovariedade da mãe

Ao comparar os resultados sorológicos das matrizes de vida livre ao dos respectivos filhotes recém-eclodidos, pode-se observar que:

- Cinco dessas fêmeas tiveram amostras reagentes à sorovariedade Panama, apresentando títulos 1600, 1600, 400, 200 e 50, porém nenhum dos filhotes reagiu a esta sorovariedade;
- Duas matrizes que foram reagentes à sorovariedade Castellonis (100, 50) tiveram todos os filhotes reagentes à sorovariedade Panama;
- Uma cujo o soro apresentou reação à sorovariedade Pomona (100), todos os filhotes apresentaram reações sorológicas à sorovariedade Panama;

- d. Em uma que houve detecção de anticorpos contra a sorovariedade Panama (50), detectaram-se anticorpos contra a sorovariedade Bataviae em todos os recém-eclodidos;
- e. Uma dessas fêmeas reagiu sorologicamente à sorovariedade Panama (200) e todos os filhotes às sorovariedades Panama e Bataviae.
- f. 18 fêmeas tiveram soros reagentes à sorovariedade Panama, sendo todos os filhotes reagentes à mesma sorovariedade.
- g. 12 matrizes foram reagentes à sorovariedade Panama, mas nem todos os filhotes apresentaram anticorpos contra a sorovariedade da mãe.

O título sorológico mais alto entre os recém-eclodidos foi 6400, contra a sorovariedade Panama, e somente foi detectado em três filhotes provenientes de ninhos diferentes. Os títulos das respectivas mães contra a mesma sorovariedade foram 50, 200 e 200.

4.1.2. Sorologia dos animais criados em cativeiro

Ao realizar a sorologia das amostras de soro dos exemplares criados em cativeiro (n=120) pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), observou-se que 117 (97,50%) amostras foram reagentes (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das *Podocnemis expansa* criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.

Teste de SAM				
<i>P. expansa</i>		N° total	N° reagentes	Sorovariedades Detectadas
Criadas em cativeiro (120/117)	Tanque-berçário	20	19	Panama, Castellonis
	Tanque Crescimento 1	20	19	Autumnalis, Panama, Castellonis
	Tanque Crescimento 2	20	20	Autumnalis, Panama, Castellonis
	Tanque Engorda	20	19	Autumnalis, Panama, Hebdomadis, Castellonis
	Tanque Reprodução	40	40	Autumnalis, Panama, Hebdomadis, Castellonis

Nos répteis criados em cativeiro as sorovariedades de maior prevalência detectadas na sorologia foram a Panama, a Castellonis, a Autumnalis e a Hebdomadis (Figura 12).

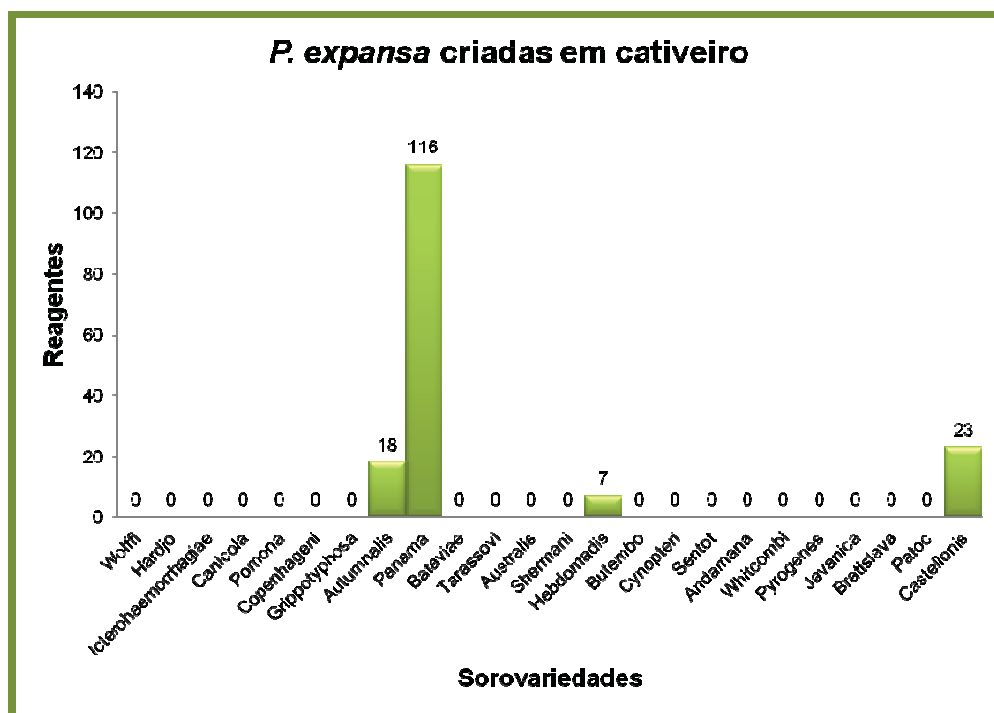


Figura 12: Sorovariedades detectadas nas amostras de soro das *P. expansa* criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010.

A quantidade de *P. expansa* criadas em cativeiro sororreagentes e o título para cada sorovariedade podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 7: Resultados da sorologia realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em amostras de soro das *Podocnemis expansa* criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia - GO, entre o período de 2009 e 2010, demonstrando a quantidade de sororreagentes e o título.

SOROVARIEDADES	<i>Podocnemis expansa</i> CRIADAS EM CATIVEIRO n=120					Total de Sororreagentes
	TB (n=20)	TC 1 (n=20)	TC 2 (n=20)	TE (n=20)	TR (n=40)	
Wolffi (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Hardjo (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Icterohaemorrhagiae (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Canicola (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Pomona (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Copenhageni (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Grippytyphosa (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Autumnalis (n/T)	nr	1/20	6/20	6/20	5/20	18
Panama (n/T)	19/3200	19/1600	20/1600	18/3200	40/1600	116
Bataviae (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Tarassovi (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Australis (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Shermani (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Hebdomadis (n/T)	nr	nr	nr	4/20	3/20	7
Butembo (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Cynopteri (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Sentot (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Andamana (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Whitcombi (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Pyrogenes (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Javanica (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Bratislava (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Patoc (n/T)	nr	nr	nr	Nr	nr	0
Castellonis (n/T)	1/20	1/20	5/20	9/20	7/100	23

n: número de animais sororreagentes; nr: animais não reagentes; T: título máximo encontrado.

As sorovariedades, detectadas nos animais criados em cativeiro, que apresentaram maiores títulos foram: a Panama (3200) e a Castellonis (100).

4.2. *Brucella* spp.

4.2.1. Sorologia dos animais de vida livre

As 480 amostras foram submetidas a prova do antígeno acidificado tamponado e apenas quatro foram reagentes; as quatro eram das *P. expansa* recém-eclodidas. Todas as amostras de soro sanguíneo também foram testadas pela técnica da polarização fluorescente e não reagiram a ela. As quatro amostras sorológicas dos filhotes de vida livre foram reavaliadas utilizando a reação de fixação de complemento e nenhuma foi reagente.

4.2.2. Sorologia dos animais de cativeiro

As 120 amostras dos espécimes criados em cativeiro foram submetidas a prova do antígeno acidificado tamponado e ao teste da polarização fluorescente, no entanto, nenhuma reagiu a qualquer um dos testes.

4.3. PCR

O DNA genômico total das amostras mostrou-se de boa qualidade quando avaliado em gel de agarose, sendo representado por uma banda íntegra de alto peso molecular (Figura 13). A relação da absorbância entre estes dois comprimentos de onda resulta no valor referente à qualidade do DNA, que se estiver no intervalo de 1,8 a 2,0 caracteriza um DNA de boa qualidade (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

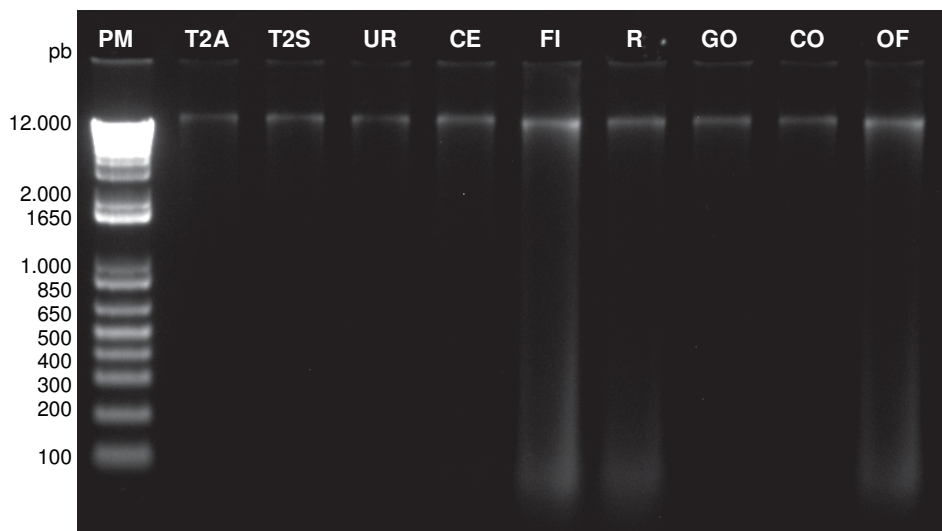


Figura 13: DNA genômico total encontrado nas amostras de água de tanque (T2A), sedimento de tanque (T2S), urina (UR), conteúdo estomacal (CE), fígado (FI), rins (R), gônadas (GO), cascas de ovos (CO) e órgãos dos filhotes (OF). PM: padrão de tamanho molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

4.3.1. Animais de vida livre

Pela reação em cadeia da polimerase observou-se que todas as amostras de urina das *P. expansa* de vida livre foram negativas tanto para *Leptospira* spp. quanto para *Brucella* spp.

Ao avaliar as amostras de DNA do conteúdo estomacal dos répteis de vida livre foram observadas três amostras positivas, sendo a CE3 positiva para *Leptospira* spp., a CE4 para *Brucella* spp. e a CE6 positiva para os dois agentes (Tabela 8). Pela técnica de SAM, o animal T3 (CE3) apresentou título 200 contra as sorovariedades Pomona e Panama, o T4 (CE4) não foi reagente e o T6 (CE6) apresentou título 100 contra a Pomona e 50 contra a Panama.

Tabela 8: Resultados da PCR para pesquisa de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nas amostras de urina e conteúdo estomacal das *P. expansa* de vida livre capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, em 2009 e 2010.

Reação em Cadeia da Polimerase				
<i>P. expansa</i> (total)	Amostras			
	Urina		Conteúdo estomacal	
	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>
Matrizes (40)	-	-	-	-
Animais do lago (40)	-	-	2	2

Todas as amostras de água e sedimento do lago e do boiadeiro foram negativas.

Nos recém-eclodidos não se detectou DNA de ambas as bactérias.

Nas cascas de ovos dos ninhos 138 e 148 identificou-se DNA de *Brucella* spp., porém não houve detecção do DNA desse agente nas amostras biológicas das matrizes 138 e 148 e de seus filhotes.

O produto de PCR, com os primers Lep1/Lep2 (331 pb) e B4/B5 (223 pb), das amostras que apresentaram amplificação pode ser visualizado na Figura 14.

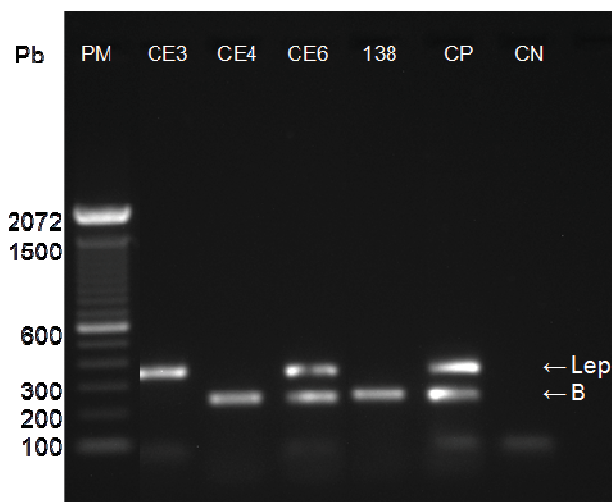


Figura 14: Produto de PCR com os primers Lep1/Lep2 (331 pb) e B4/B5 (223 pb) de amostras de conteúdo estomacal (CE3, CE4 e CE6) e cascas dos ovos do ninho (138), como representante das amostras que apresentaram amplificação para *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). CP: controle positivo. CN: controle negativo (mix sem DNA).

4.3.2. Animais criados em cativeiro

Pela reação em cadeia da polimerase observou-se que nas amostras de urina dos Testudines criados em cativeiro detectaram-se duas positivas para *Leptospira* spp., animais F15 e F17, e uma para *Brucella* spp., animal B16 (Tabela 9). As matrizes F15 e F17 foram reagentes na SAM contra a sorovariedade Panama e apresentaram títulos de 50 e 100, respectivamente.

Tabela 9: Resultados da PCR para pesquisa de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nas amostras de urina e conteúdo estomacal das *P. expansa* criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, em 2009 e 2010.

Reação em Cadeia da Polimerase				
<i>P. expansa</i> (total)	Amostras			
	Urina		Conteúdo estomacal	
	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>
Tanque-berçário (20)	-	1	-	-
Tanque de crescimento 1 (20)	-	-	-	-
Tanque de crescimento 2 (20)	-	-	-	-
Tanque de engorda (20)	-	-	-	-
Tanque de reprodução (40)	2	-	-	-

Não foi encontrado DNA das bactérias nas amostras de fígado dos répteis criados em cativeiro. Nas amostras de rins de dois indivíduos (B7 e B16) do tanque-berçário foi detectado DNA de *Brucella* spp. Em três espécimes criados em cativeiro foi encontrado DNA de *Brucella* spp. nas amostras de gônadas; um do tanque-berçário (B17), um do tanque de crescimento 1 (D16) e um do tanque de crescimento 2 (T1) (Tabela 10).

Tabela 10: Resultados da PCR para pesquisa de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nas amostras de fígado, rins e gônadas das *P. expansa* criadas em cativeiro, capturadas na região do vale do rio Araguaia – GO, em 2009 e 2010.

Reação em Cadeia da Polimerase						
<i>P. expansa</i> (total)	Amostras					
	Fígado		Rins		Gônadas	
	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Brucella</i>
Tanque-berçário (20)	-	-	-	2	-	1
Tanque de cresc. 1 (20)	-	-	-	-	-	1
Tanque de cresc. 2 (20)	-	-	-	-	-	1
Tanque de engorda (20)	-	-	-	-	-	-

Apenas no cágado B16 identificaram-se duas amostras distintas, urina e rins, contendo DNA de *Brucella* spp.

Todas as amostras de sedimento dos tanques de criação foram negativas. Já na amostra de água do tanque de crescimento 1 e na amostra do tanque de reprodução foi observado DNA de *Brucella* spp.

O produto de PCR, com os primers Lep1/Lep2 (331 pb) e B4/B5 (223 pb), das amostras que apresentaram amplificação pode ser visualizado na Figura 15.

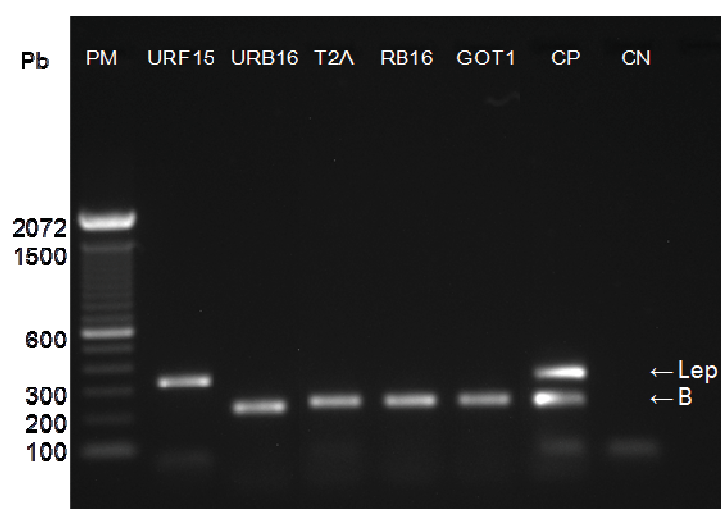


Figura 15: Produto de PCR com os primers Lep1/Lep2 (331 pb) e B4/B5 (223 pb) de amostras de urina (URF15 e URB16), água de tanque de criação (T2A), rim (RB16) e gônadas (GOT1), como representante das amostras que apresentaram amplificação para *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). CP: controle positivo. CN: controle negativo (mix sem DNA).

5. DISCUSSÃO

Segundo Girio et al. (2004), no Brasil pouco se sabe sobre a leptospirose em animais de vida livre, o que dificulta o conhecimento da cadeia epidemiológica da doença e a elaboração dos planos de controle nas regiões com grandes populações selvagens e ambientes ecologicamente favoráveis ao micro-organismo. De acordo com Corrêa et al. (2004), diferentes espécies sinantrópicas e selvagens podem estar envolvidas na epidemiologia dessa enfermidade, atuando, inclusive, como fontes de infecção (MICHNA; CAMPBELL, 1970). Silva et al. (2010) afirmaram que vem sendo realizados levantamentos sorológicos em espécimes de zoológicos e criadouros, a fim de se obter dados sobre a doença nas populações cativas.

Conforme Richardson e Gauthier (2003), várias espécies de vida livre podem se tornar portadoras e contribuir para a disseminação da bactéria na natureza. Glosser et al. (1974) e Charon, Johnson e Muschel (1975), em estudos realizados com répteis, sugerem que esses animais servem como possíveis reservatórios da *Leptospira* spp., pois foram detectados indivíduos saudáveis portadores desse agente. Os mesmos autores ainda afirmaram que a infecção pode permanecer incubada por até seis meses e meio, aparentemente sem sinais clínicos ou lesões patológicas, embora em alguns casos se encontre nefrite intersticial.

Ao avaliar o soro de diferentes espécies de Testudines pertencentes ao plantel do Zoológico Municipal de Uberaba-MG, Esteves et al. (2005) detectaram uma amostra (6,25%) dos *Chelonoidis* spp. (jabuti) reagente à sorovariedade Andamana e outra (5%) das *Trachemys* spp. (tigre-d'água) reagente à sorovariedade Patoc, cujos títulos foram 100 em ambas as amostras.

Silva et al. (2010), ao realizarem estudos sorológicos de répteis do Zoológico Municipal de Ribeirão Preto com 44 *T. scripta elegans*, identificaram 26 (59,1%) amostras reagentes às sorovariedades Andamana, Tarassovi e Canicola com títulos entre 40 - 5120; 80 - 320 e 40 - 160, respectivamente. Avaliando 29 amostras de soro de *Chelonoidis* spp., os pesquisadores supracitados observaram que oito (27,6%)

apresentaram aglutininas contra as sorovariedades Patoc (40 - 160), Hebdomadis (80) e Canicola (40). Os mesmos autores, ao realizarem a SAM das amostras das *Phrynops geoffroanus* (n=2), das *P. expansa* (n=4) e das *P. unifilis* (n=2), detectaram uma (50%), três (75%) e duas (100%) amostras reagentes, respectivamente; a sorovariedade diagnosticada e o título das *P. geoffroanus* foi a Canicola (40) e das *P. expansa* e *P. unifilis* foram a Panama (2560) e Pomona (1280).

Na sorologia contra leptospirose dos espécimes de *P. expansa*, Silva et al. (2010) observaram que reações imunológicas intensas e títulos maiores em relação aos outros Testudines. Esses achados justificam a detecção dos títulos 6400 e 3200 contra a sorovariedade Panama nas *P. expansa* de vida livre e nas criadas em cativeiro do presente estudo, respectivamente. Além disso, os indivíduos selvagens também apresentaram a sorovariedade Pomona como uma das mais frequentes; título 400.

Almeida et al. (1994) afirmaram que títulos inferiores a 100 não são considerados positivos na SAM, mas demonstram que o animal já entrou em contato com o agente; títulos entre 100 e 200 são considerados baixos, porém indicam infecções passadas ou recém-instaladas; e títulos iguais ou superiores a 400 sugerem a doença clínica. Os altos títulos encontrados contra a sorovariedade Panama (6400) e contra a sorovariedade Pomona (400) encontrados nas *P. expansa* de vida livre e contra a sorovariedade Panama (3.200) detectados nos répteis cativos indicam que esses animais tiveram intensa reação imunológica ao antígeno, sugerindo uma possível doença clínica.

Mesmo as reações com títulos baixos são informações relevantes, pois ainda não se sabe o tipo de resposta imunológica que estes animais desenvolvem nem se a padronização da SAM utilizada é correta, tornando de fundamental importância o estudo sorológico da leptospirose em répteis, já que o comportamento da doença nesses animais ainda não é conhecido (SILVA et al., 2010).

Segundo Silva et al. (2010), os títulos altos encontrados em Testudines sugerem infecção ativa, podendo ou não apresentarem manifestações clínicas da doença e, conseqüentemente, a eliminação de leptospiros na urina; no entanto, não se sabe o ciclo dessas bactérias nestes répteis. Conforme Quinn et al. (2005) e Figueiredo, Girio e

Lemos (2008), os hospedeiros acidentais desenvolvem a doença severa e também proporcionam a transmissão inter e intraespécies. Tal fato sugere que as *P. expansa* podem ser hospedeiros naturais e atuar como reservatórios das sorovariedades Panama e Pomona, eliminando-as durante longos períodos na urina, o que justifica a detecção de DNA de *Leptospira* spp. em duas amostras de urina das matrizes criadas em cativeiro; matriz F15, título 50 e matriz F17, título 100, ambas reagentes para a sorovariedade Panama. Além disso, também detectou-se DNA desse agente em amostras de conteúdo estomacal de dois animais de vida livre capturados no lago; o animal T3 apresentou título 200 para as sorovariedades Pomona e Panama e o animal T6 apresentou título 100 para a sorovariedade Pomona e 50 para a Panama.

A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* nos recém-eclodidos pode ter ocorrido pela transferência dos anticorpos maternos via imunidade passiva, pois, de acordo com Brambell (1969), em aves, os anticorpos maternos oriundos de antígenos aos quais as mães foram expostas são transportados da gema de todo o saco vitelino para a circulação do embrião em desenvolvimento, fornecendo aos filhotes imunidade eficaz, porém temporária, contra agentes infecciosos. O mesmo autor ainda afirmou que a imunidade passiva se torna muito importante, pois há grande possibilidade de os filhotes encontrarem os mesmos antígenos no ambiente onde nasceram. Segundo Rose (1972), os recém-eclodidos são dependentes dos anticorpos maternos até que se tornem imunocompetentes.

Conforme Girio e Lemos (2002), é comum mais de uma sorovariedade ser detectada na SAM, sugerindo a existência de uma infecção mista ou reações cruzadas, justificando, assim, os resultados encontrados no presente estudo. Entretanto, Diesch (1980) relatou que nesses casos a sorovariedade a ser considerada responsável pela infecção é aquela cujo título foi maior.

Bathke (1999) afirmou que as brucelas podem afetar animais domésticos, diversos animais selvagens e humanos, e cada espécie dessa bactéria tem predileção por distintos hospedeiros naturais (BRASIL, 2004). No entanto, apesar de o micro-organismo ter seu hospedeiro preferencial, também podem acometer outros grupos animais (ACHA; SZYFRES, 2001; PAULIN; FERREIRA-NETO, 2003). Já são

conhecidas 24 espécies de animais selvagens hospedeiras e transmissoras naturais desse agente (BATHKE, 1999). Em estudos realizados com sapos africanos selvagens (*Pyxicephalus edulis*) foi sugerida uma nova espécie de *Brucella* capaz de utilizar vários animais como hospedeiros, incluindo peixes, anfíbios e répteis (EISENBERG et al., 2012).

A detecção de DNA de *Brucella* spp. em amostras de conteúdo estomacal dos répteis de vida livre e em amostras de urina, rins e gônadas dos indivíduos criados em cativeiro demonstra que o agente está presente em ambas as populações de *P. expansa*. Tal achado pode ser justificado pela proximidade de rebanhos bovinos nas margens de lagos e rios infectando quelônios de populações selvagens, ou ainda, bovinos contaminando a água de açudes ou represas que servem como fonte de abastecimento de água para os tanques de criação onde vivem os Testudines cativos. Contudo, também existe a possibilidade de a infecção não ser causada pela *Brucella abortus*, e sim por uma nova espécie de *Brucella* spp. que utiliza as *P. expansa* como hospedeiro natural, podendo ou não causar doença nesses animais.

Além disso, os rebanhos bovinos não devem ser considerados vilões e principais fontes de infecção para os animais selvagens, pois, de acordo com Bathke (1999), em ambientes antrópicos, onde há o convívio de animais domésticos e selvagens, as doenças podem ser transmitidas de domésticos para selvagens, de selvagens para domésticos, ou ainda, de selvagens para selvagens. Tal afirmação levaria à hipótese de haver a possibilidade de as *P. expansa* terem sido infectadas por outras espécies de animais de vida livre ou serem responsáveis pela infecção nos bovinos.

Os animais selvagens, considerados reservatórios da *Brucella* spp., assumem importante papel na epidemiologia da doença por transmitirem para outros animais (DAVIS, 1990), além de serem responsáveis pela manutenção da bactéria em ambientes naturais, tornando o ciclo da bactéria complexo e incompreendido (METCALF; LUCHSINGER; RAY, 1994).

Conforme Paulin e Ferreira-Neto (2003), os ungulados selvagens atuam como mantenedores da *Brucella* spp. em regiões antrópicas. No Brasil, anticorpos contra a bactéria já foram detectados em outros animais como em capivaras (*Hydrochoerus*

hydrochaeris) e *caititus* (*Tayassu tajacu*) da região do pantanal matogrossense (ITO et al., 1998). Já Mangini et al. (1998) diagnosticaram a doença em queixadas selvagens e cativos.

A detecção de DNA de *Brucella* spp. nas cascas dos ovos de dois ninhos de *P. expansa* leva à hipótese de essa bactéria possivelmente penetrar na porção interna do ovo e interferir no desenvolvimento embrionário. Conforme Bathke (1999), os sinais mais perceptíveis da brucelose em mamíferos são o abortamento, natimortalidade e nascimento de crias fracas, que também podem ser observados na leptospirose (BOLIN et al., 1989; HORSCH, 1999). Entretanto, não há aborto em Testudines, mas existe a possibilidade de ocorrer o aparecimento dos defeitos de casco, além de outros defeitos de escutelação, assim como a eclosão de filhotes fracos ou mortalidade embrionária, que são associados, por outros pesquisadores, apenas aos fatores ambientais. Além disso, ainda há a possibilidade das cascas dos ovos, nas quais detectou-se DNA de *Brucella* spp. não serem apenas dos filhotes com defeitos.

Segundo Salera Júnior et al. (2009c), existem várias causas do aparecimento de defeitos de casco em quelônios recém-eclodidos, como por exemplo exposição dos ovos a baixa umidade (LYNN; ULLRICH, 1950), baixas temperaturas (MOLINA, 1995) e elevadas temperaturas durante a incubação (MALLMANN, 1994) e o manuseio dos ovos, como a translocação de ninhos (MALVÁSIO et al., 2005a). Já Alves-Júnior et al. (2012), sugerem que o insucesso na incubação e o aumento nas taxas de mortalidade dos filhotes também podem ser provocados pela presença de produtos químicos na água e, ainda, pelo aparecimento de possíveis doenças infectocontagiosas, fato a ser considerado um possível risco ou ameaça à população natural da espécie. No entanto, não há relatos sobre a correlação entre malformações e taxas de mortalidade de filhotes que sejam causadas pela poluição ambiental ou por micro-organismos.

De acordo com Ernest e Barbour (1989), os ovos das *P. expansa* possuem formato esférico e casca flexível. Segundo Packard, Packard e Boardman (1982), os ovos que apresentam casca flexível possuem a camada calcária porosa e são mais dependentes do ambiente hídrico. Essas características poderiam favorecer uma possível penetração de agentes, como a *Brucella* spp., no interior das cascas dos ovos

das *P. expansa*, levando ao aparecimento de mal-formações dos embriões.

Dessa forma, os estudos da *Leptospira* spp. e da *Brucella* spp. nas *P. expansa* oriundas de ambientes naturais ou cativeiros devem ser continuados para que a cadeia epidemiológica dessas bactérias seja compreendida, considerando que são zoonoses e podem ser transmitidas para espécies domésticas, espécies selvagens e humanos.

6. CONCLUSÕES

A espécie *P. expansa* pode ser hospedeiro natural das sorovariedades Panama e Pomona de *Leptospira*, assim como hospedeiro natural da *Brucella* spp.;

As *P. expansa* podem disseminar esses agentes em ambientes antrópicos, infectando espécies domésticas, ou, ainda, disseminar em ambientes não antropizados, infectando outras espécies selvagens;

Há a possibilidade de existir uma nova espécie de *Brucella* específica de Testudines.

7. REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses y micoses**. 3ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, v.1, p.266-283, 2001. 416p.

ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W. L.; CHAPPEL, R. J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.377-381, 1986.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, 287-296, 2010.

ALFINITO, J. **Fundamentos ao serviço de proteção à tartaruga. Preservação da tartaruga da Amazônia**. Ministério da Agricultura. DEMA/ PA, IBDF, Belém (PA), p.1-36, 1973.

ALFINITO, J.; VIANA, C. M.; SILVA, M. M. F. Biología y manejo de la tortuga *Podocnemis expansa* (Testudines, Pelomedusidae). **Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**. Set. 1997. Disponível em: <<http://www.otca.org.br/publicacao/SPT-TCA-VEN-63.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

ALHO, C. J. R.; CARVALHO, A. G.; PÁDUA, L. F. M. Ecologia da tartaruga da Amazônia e avaliação de seu manejo na Reserva Biológica do Trombetas. **Brasil Florestal**, v.38, p. 29-47, 1979.

ALHO, C. J. R.; PÁDUA, L. F. M. Reproductive parameters and nesting behavior of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae) in Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, v.60, n.2, p.97-103, 1982a.

ALHO, C. J. R.; PÁDUA, L. F. M. Sincronia entre o regime de vazante do rio e o comportamento de nidificação da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae). **Acta Amazônica**, v.12, n. 2, p.323-326, 1982b.

ALMEIDA, L. P.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S.; GERMANO, P. M. L. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.28, n.1, 1994.

ALT, D. P.; BOLIN, C. A. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* sorovar Pomona infection in hamsters and swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.1, p. 59- 62, 1996.

ALTON, G. G.; JONES, L. M.; ANGUS, R. D.; VERGER, J. M. **Techniques for the Brucellosis Laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 189p.

ALVES, A. J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BAHIENSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.6-13, 2009.

ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; LUSTOSA, A. P. G.; BOSSO, A. C. S.; SOUSA, N. A. J.; SOUZA, V. L.; MALVÁSIO, A.; MIRANDA, L. B.; SANTOS, A. L. Q. Biometria de neonatos de tartaruga-da-Amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) oriundos de ninhos naturais. **PUBVET**, v.4, n.19, 2010a.

ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; LUSTOSA, A. P. G.; BASTOS, L. F.; JORGE, R. F.; VERÇOSA, L. F. S.; BOSSO, A. C. S.; MALVÁSIO, A.; MIRANDA, L. B. Biometria de neonatos de tartaruga-da-Amazônia *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) oriundos de ninhos translocados. **PUBVET**, v.4, n.17, 2010b.

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). **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.77-78, 2011.

ALVES-JUNIOR, J. R. F.; LUSTOSA, A. P. G.; BOSSO, A. C. S.; BALESTRA, R. A. M.; BASTOS, L. F.; MIRANDA, L. B.; SANTOS, A. L. Q. Reproductive indices in natural nests of giant Amazon river turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) in the Environmental Protection Area Meanders of the Araguaia river. **Brazilian Journal of Biology**, v.72, n.1, p.199-203, 2012.

AZEVEDO, S. S.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; SOUZA, A. C.; VASCONCELLOS, S. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 19-26, 2009.

BAILY, G. G.; KRAAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; STOKER, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, n.4, p.271-275, 1992.

BASEMAN, J. B.; COX, C. D. Intermediate energy metabolism of *Leptospira*. **Journal of Bacteriology**, v.97, p.992-1000, 1972.

BATAUS, Y. S. L. **Estimativa de Parâmetros Populacionais de *Podocnemis expansa* (Tartaruga-da-Amazônia) no Rio Crixás-açu (GO) a partir de dados biométricos.** 1998. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. 1998.

BATHKE, W. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** Parte 2, cap.42, p.163-188, 1999.

BENDER, L. C.; HALL, P. B. *Leptospira interrogans* exposure in free-ranging elk in Washington. **Journal of Wildlife Diseases**, v.32, n.1, p.121–124, 1996.

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**, v.25, n.3, p.313-315, 2002.

BINDER, W. D.; MERMEL, L. A. Leptospirosis in na urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **Journal of Emergency Medicine**, v.16, n.6, p.851-856, 1998.

BOLIN, C. A.; THIERMANN, A. B.; HANDSAKER, A. L.; FOLEY, J. W. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* infection of pregnant cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.1, p.161-165, 1989.

BOLIN, C. A.; CASSELS, J. A.; ZUERNER, R. L; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* vaccine on type *hardjo-bovis* infection of cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.10, p.1639-43, 1991.

BOYER, T. H.; BOYER, D. M. Turtles, tortoises, and terrapins In: MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. 2ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, cap.7, p.78-99, 2006. 1242p.

BRAMBELL, F. W. R. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.28, p.35–41, 1969.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis IBAMA. **Projeto quelônios da Amazônia 10 anos**. Brasília, 1989. 119 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Manual Técnico. 2004. 132p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT)**. Manual Técnico. Brasília, 2006. 188p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Instrução Normativa n°27, de 20 de outubro de 2010**. Brasília, 2010. 188p.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; WEYANT, R. S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, n.2, 839-858, 1999.

BRICKER, J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1, p.435-446, 2002.

CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. Filadelfia: Lea & Febiger, p.196 – 200, 1991.

CETINKAYA, B.; ERTAS, H. B.; ONGOR, H.; MUZ, A. Detection of leptospira species by polymerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v.24, n.1., p.123-130, 2000.

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A.; MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 46-55, 2009.

CHARON, N. W.; JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. Antileptospiral activity in lower-vertebrate sera. **Infection and Immunity**, v.12, n.6, p.1386-91, 1975.

CLOECKAERT, A.; GRAYON, M.; GRÉPINET, O.; BOUMEDINE, K. S. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. **Microbes and Infection**, v.5, n.7, p.593-602, 2003.

COLEMAN, T. J. The Public Health Laboratory Service (PHLS) and its role in the control of zoonotic diseases. **Acta Tropica**, v.76, n.1, p.71-75, 2000.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. São Paulo, Medsi, 2ed., p.195-215, 1992. 844p.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F.; FERREIRA-NETO, J. S. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 189-193, 2004.

COUSINS, D. V.; ELLIS, T. M.; PARKINSON, J.; MCGLASHEN, C. H. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. **Veterinary Record**, v.124, n.1, p.123-124, 1989.

CROUSE, D. T.; CROWDER, L. B.; CASWELL, H. A stage-based population model for loggerhead sea turtles and implications for conservation. **Ecology**, v.68, n.5, p.1412-1423, 1987.

DAVIS, D. S. Brucellosis in wildlife. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. **Animal Brucellosis**, Boca Raton, CRC Press: 1990, p.322-330.

DIAS, J. A.; MÜLLER, E. E.; DIAS, R. A.; FREITAS, J. C.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SILVA, M. C. P.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 66-76, 2009.

DIAS, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; LIMA, Z. M. B.; PAULIN, L. M. S.; GUNNEWIEK, M. F. K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 118-125, 2009.

DIESCH, S. L. Leptospirosis: vaccination and titer evaluation. **Modern Veterinary Practice**, v.61, n.11, p.905-908, 1980.

DORNELLES, A. M. G.; QUINTANILHA, L. C. **Relatório do abate experimental da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro**. Goiânia, Brasília: IBAMA – RAN, 2003.

DUPRE, A., DEVAUX, B.; BONIN, F. **Turtles of the world**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1 ed., 2006. 416p.

EISENBERG, T.; HAMANN, H.; KAIM, U.; SCHLEZ, K.; SEEGER, H.; SCHAUERTE, N.; MELZER, F.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H. C.; KOYLASS, M. S.; WHATMORE, A. M.; ZSCHÖCK, M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.10, p.3753 – 3755, 2012

ELLIS, W. A.; MONTCOMERI, J. M.; MCPARLAND, P. J. An experimental study with a *Leptospira interrogans* serovar *bratislava* vaccine. **Veterinary Record**, v.125, n.12, p.319-321, 1989.

ELLIS, W. A. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the Meetings, 1 and 2 July 1994, Prague, Czech Republic. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n.4, p.872-874, 1995.

ERNEST, C. H.; BAUBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. 313p.

ESCALONA, T.; FÁ, J. E. Survival of nests of the terecay turtle (*Podocnemis unifilis*) in the Nichare-Tawadu Rivers, Venezuela. **Journal of Zoology**, n.244, p.303-12, 1998.

ESTEVEES, F. M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R. J. S.; LEON, M.; VERGARA, S.; CARVALHO, A. C. F. B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, Minas Gerais. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.3., p. 283-288, 2005.

EWALT, D. R.; PAYEUR, J. B.; MARTIN, B. M.; CUMMINGS, D. R.; MILEER, G. Characteristics of *Brucella* species from bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, n.1, p.448-452, 1994.

FACHÍN-TERÁN, A. Desove y uso de playas para nidificación de taricaya (*Podocnemis unifilis*) en el rio Samiria, Loreto-Perú. **Boletín de Lima**, v.79, n.1, p.65-75, 1992.

FAINE, S. **Guidelines for Leptospirosis Control**. Geneva: WHO Offset Publication n.67, 1982. 98p.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: CRC Press, 1994. 353p.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. A.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: CRC Press, 1999. 272p.

FERRI, V. **Turtles & Tortoises: A Firefly Guide**. Ontario: Firefly Books, 2002. 256p.

FIGUEIREDO, A. O.; GIRIO, R. J. S.; LEMOS, R. A. A. Leptospirose. In: LEMOS, R. A. A.; LEAL, C. R. B. **Doenças de Impacto Econômico em Bovinos de Corte: Perguntas e Respostas**. Campo Grande: UFMS, v.1, n.1, 2008, 385-398. 450p.

FONTANA, I. **Avaliação do papel do porco-monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal sul-mato-grossense**. 2011. 62f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

FOWLER, M. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 2ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. 1127p.

GIBBONS, J. W. Terrestrial activity and the population dynamics of aquatic turtles. **The American Midland Naturalist**, v.83, n.2, p.404-414, 1970.

GIRIO, R. J. S.; LEMOS, R. A. A. Leptospirose. In: LEMOS, R. A. A.; BARROS, N.; BRUM, K. B. **Enfermidades de Interesse Econômico em Bovinos de Corte – Perguntas e Respostas**. 1ed. Campo Grande: UFMS, v.1, n.1, p.253-260, 2002. 292p.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; MARCHIORI FILHO, M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunoistoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.165-169, 2004.

GIRIO, R. J. S.; LEMOS, R. A. A. Leptospirose. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3ed. Santa Maria: Pallotti, v.1, p.331-347, 2007.

GLOSSER, J. W.; SULZER, C. R.; EBERHARDT, M.; WINKLER, W. G. Cultural and serologic evidence of *Leptospira interrogans* serotype tarassovi infection in turtle. **Journal of Wildlife Diseases**, v.10, n.4, p.429-435, 1974.

GONÇALVES, V. S. P.; RIBEIRO, L. A.; CALDAS, R. A.; FRANCISCO, P. F. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BORGES, J. R. J. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 14-18, 2009a.

GONCALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; PORTO, T. B.; ALVES, C. M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.35-45, 2009b.

GORVEL, J. P.; MORENO, E. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1, p.281-97, 2002.

GRAND, J; BEISSINGER, S. R. When relocation of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) nests becomes a useful strategy. **Journal of Herpetology**, v.31, n.3, p.428-434, 1997.

GUERRA NETO, G.; GIRIO, R. J. S.; ANDRADE, T. M.; KOPROSKI, L. P.; MORAES, W.; SANTOS, L. C. Ocorrência de anticorpos para *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais pertencentes ao criadouro de animais silvestres da Itaipu Binacional e ao Zoológico Municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu-PR.. **ARS Veterinária**, v.1, n.1, p.69-75, 2004.

GUERRA-NETO, G. **Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil**. 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals. The public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.181, n.1, p.1505-1509, 1982.

HORSCH, F. Leptospirose. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Roca, Cap. 53, v.2, p.305-326, 1999. 398p.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1989. Projeto Quelônios da Amazônia: Manual Técnico. Brasil: IBAMA. p.125.

ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A.; BERNARDINI, F.; NASCIMENTO, A. A.; LABRUNA, M. A.; ARANTES, I. G. Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por ixodídeos em animais silvestres do pantanal Sul-Mato-Grossense. **ARS Veterinária**, v.14, n.3, p.302-310, 1998.

IUCN 2007. **2007 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/17822/all>>. Acesso em: 08 jun. 2009.

IVERSON, J. B. **A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world**. Richmond: J.P. Iverson, 1992. p.363.

JOHNSON, R. C.; FAINE, S. Leptospira. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v.1, p.62-67, 1984.

KELLNER, A. W. A.; SCHWANKE, C. Répteis fósseis do Brasil: breve introdução à herpetologia. In: BRITO, I. M.. **Geologia Histórica**. Uberlândia: EDUFU, cap. 16, p.303-363. 2001.

KEMENES, A.; PANTOJA-LIMA, J. Tartarugas sob ameaça. **Ciência Hoje**, v.228, n.1, p.70-72, 2006.

KLEIN-GUNNEWIEK, M. F. C.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GITTI, C. B.; PEREIRA, L. A.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LOBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 77-84, 2009.

LEGLER, J. M. Morphology and Physiology of the Chelonia, In: GLASBY, C. J.; ROSS, G. J. B.; BEESLEY, P. L. **Fauna of Austrália**, Canberra, v.2, p.108-119, 1993. 439p.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LIMA, A. C. **Caracterização socioeconômica e ambiental da criação de quelônios no Estado do Amazonas**. 2000. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2000.

LORD, V. R.; FLORES, C. R. *Brucella* spp. from the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Venezuela: serologic studies and metabolic characterization of isolates. **Journal of Wildlife Diseases**, v.19, n.4, p.314-18, 1983.

LYNN, G.; ULLRICH, S. M. C. Experimental production of shell abnormalities in turtles. **Copeia**, v.4, p.253-262, 1950.

LYRA, T. M. P. Epidemiologia da brucelose. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.8, n.2, p.177-186, 1984.

MAGNUSSON, W. E. Manejo da Vida Silvestre Na Amazônia. In: FERREIRA, E. J. G.; SANTOS, G. M.; LEÃO, E. L.; OLIVEIRA, A. A. **Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia**. Manaus: INPA, v.2, n.1, p.313-318, 1993.

MALLMANN, M. T. O. **Influência da temperatura de incubação na determinação sexual em *Geochelone carbonária* (Spix, 1824) (Reptilia, Testudines, Testudinidae).** 1994. 52 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 1994.

MALVÁSIO, A. **Aspectos do mecanismo alimentar e da biologia reprodutiva em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *P. unifilis* (Troschel, 1848) e *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) (Testudines, Pelomedusidae).** 2001. 199 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

MALVÁSIO, A.; SALERA JÚNIOR, G.; SOUZA, A. M.; MODRO, N. R. Análise da interferência do manuseio dos ovos no índice de eclosão e no padrão de escutelação do casco e as correlações encontradas entre as medidas das covas, ovos e filhotes em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**, v.8, n.1, p.15-38, 2005a.

MALVÁSIO, A.; SOUZA, A. M.; SCHLENZ, E.; SALERA JÚNIOR, G.; SAMPAIO, F. A. A. Influência da manipulação dos ovos no sucesso das eclosões e no padrão normal de escutelação do casco em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**, v.8, n.1, p.39-52, 2005b.

MANGINI, P. R.; JOINEAU, M. E. G.; PATRÍCIO, M. A. C.; FORTES, M. A. T.; GONÇALVES, M. L. L.; MARGARIDO, T. C. C.; KLUCZKOVSKI, J. R.; KLEMZ, C. Estudo da ocorrência de soros positivos para doenças infectocontagiosas em populações selvagens e cativas de *Tayassu pecari*, na região de Quedas do Iguaçu - Paraná. In: V Simpósio de Ciências Médicas e Biológicas, 1998, Curitiba, **Anais...** Curitiba, 1998.

MARIANELLI, C.; GRAZIANI, C.; SANTANGELO, C.; XIBILIA, M. T.; AMATO, R.; NERI, D.; CUCCIA, M.; RINNONE, S.; DI MARCO, V.; CIUCHINI, F. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.9, p.2923-2928, 2007.

MAROS, A.; LOUVEAUX, A.; GODFREY, M. H.; GIRONDOT, M. *Scapteriscus didactylus* (Orthoptera, Gryllotalpidae), predator of leatherback turtle eggs in French Guiana. **Marine Ecology Progress Series**. v.249, n.1, p.289-296, 2003.

MARVULO, M. F. V. FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GROFF, A. C. M.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 93-102, 2009.

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S.; DUARTE, J. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v.35, n.1, p.112-114, 1999.

MATTAR, G. M.; KHNEISSER, I. A.; ABDENOR, A. M. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31 – kilodalton *Brucella* antigen DNA, **Journal of Clinical Microbiologic**, v.34, n.2, p. 477-478, 1998.

MERIEN, 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**, v.30, n.9, p.2219–2224, 1992.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v.65, n.2, p.729-738, 1997.

METCALF, H. E.; LUCHSINGER, D. W.; RAY, W. C. Brucellosis. Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic. In: BERAN, G.W.; STEELE, J. H. **Handbook of Zoonoses**. 2ed. Ontario: CRC Press, p.9-39, 1994.

MICHNA, S. W.; CAMPBELL, R. S. F. Leptospirosis in wild animals. **Journal of Comparative Pathology**, v.8, p. 101-106, 1970.

MILLER, W. G.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A.; CHEVILLE, N. F.; PAYEUR, J. P.; HARLEY, D. R.; HOUSE, C.; RIDGEWAY, S. H. *Brucella*-induced abortions and infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v.30, n.1, p.100-110, 1999.

MIRANDA, F. R. **Pesquisa de anticorpos contra bactérias do gênero *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Chlamydia* spp. em tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758) da RPPN SESC Pantanal, Parque Nacional da Serra da Canastra e Parque Nacional das Emas**. 2008. 116f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MOLINA, F. B. **Observações sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron, 1835) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Emydidae)**. 1995. 307 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MOLINA, F. B.; ROCHA, M. B. **Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia Brasileira**. Belém: Centro Nacional dos Quelônios da Amazônia, 1996, 24p. Apostila.

MOLNÁR, L.; MOLNÁR, E.; TURY, E.; SOUZA J. S. Concepções modernas para o diagnóstico da brucelose. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, n.4, p. 157-162, 1997.

NEGREIROS, R. L.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FREITAS, J.; AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 56-65, 2009.

NICOLETTI, P. The epidemiology of bovine brucellosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.24, n.1, p.69-98, 1980.

NIELSEN, K.; SMITH, P.; WIDDISON, J.; GALL, D.; KELLY, L.; KELLY, W.; NICOLETTI, P. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7, **Veterinary Microbiology**, v.100, n.1, p.25-30, 2004.

NIMRI, L. F. Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. **BMC Infectious Diseases**, v.3, n.5, p.1-7, 2003.

OGATA, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; RODRIGUES, A. L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 126-134, 2009.

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

OIE - World Organisation for Animal Health. **Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2012**. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.03.%20Brucelosis%20bovina.pdf>. Acesso em 31 jul. 2012.

ORR, R. **Biologia dos vertebrados**. 5ed. São Paulo: Roca, 1999. 508 p.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MATHIAS, L. A.; CAVALLERO, J. C. M.; POESTER, F. P. In: LEMOS, R. A. A.; LEAL, C. R. B. **Doenças de Impacto Econômico em Bovinos de Corte: Perguntas e Respostas**. Campo Grande: UFMS, v.1, n.1, p.365-383, 2008. 450p.

PACKARD, M. J.; PACKARD, G. C.; BOARDMAN, T. J. Structure of eggshells and water relations of reptilian eggs. **Herpetologica**, v.38, n. 1, p.136-155, 1982.

PAULIN, L. M.; FERREIRA-NETO, J. S. **O combate à brucelose bovina: situação brasileira**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 154p.

PESTANA, C. A. F.; SANTA ROSA, C. A.; TROISE, C. Preás (*Cavia aperae azarea*) (Rodentia: Cavidae) como reservatório de leptopira em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.28, n.1, p.219-223, 1961.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, v.2, n.10, p.1265-1276, 2000.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P. Brucellosis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.90, n.1, p.55-62, 2002.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. **A Vida dos Vertebrados**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1993. 839p.

POUGH, F. H.; JANIS, C. H.; HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. 3ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 699p.

PRITCHARD, P. C. H. **Encyclopedia of Turtles**. New Jersey: Neptune, 1979. 859p.

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The turtles of Venezuela**. Oxford: Society for the study of amphibians and reptiles, 1984. 403p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, p.179-188, 2005. 512p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas pelas *Leptospira* spp. In: RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.874-887, 2010a. 1737p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Doenças causadas pelas *Brucella* spp. In: RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.778-801, 2010b. 1737p.

REBHUN, W. C. **Diseases of dairy cattle**. Baltimore: Willians & Wilkins, p.472-474, 1995. 530p.

RICHARDSON, D. J.; GAUTHIER, J. L. A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 3, n.4, p. 187-193, 2003.

ROCHA, W. V.; GONÇALVES, V. S. P.; COELHO, C. G. N. F. L.; BRITO, W. M. E. D.; DIAS, R. A.; DELPHINO, M. K. V. C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BRITO, L. A. B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 27-34, 2009.

RODRIGUES, R. M. Quelônios. In: **A fauna da Amazônia**. Belém: CEJUP, p.209-214, 1992.

RODRIGUES, M. J. J.; CARDOSO, E. C.; CINTRA, I. H. A. Morfometria e rendimento de carcaça da tartaruga-da-amazônia, *Podocnemis expansa* (SCHWEIGGER, 1812), capturada em ambiente natural. **Boletim Técnico Científico CEPNOR**, v.4, n.1, p.67-75, 2004.

ROSE, M. E. Immunity to coccidiosis: Maternal transfer in *Eimeria maxima* infections. **Parasitology**, v.65, p.273–282, 1972.

ROSSI, J. V. General husbandry and management In: MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, cap. 4, p. 25-41, 2006. 1242p.

SÁ, V. A.; QUINTANILHA, L. C.; FRENEAU, E.; LUZ, V. L. F.; BORJA, A L. R.; SILVA, P. C. Crescimento ponderal de filhotes de tartaruga gigante da Amazônia (*Podocnemis expansa*) submetidos a tratamento com rações isocalóricas contendo diferentes níveis de proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.2351-2358, 2004.

SALDARRIAGA, O. A.; OSSA, J. E.; RUGELES, M. T. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección com *Brucella* spp. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v.15, n.2, p.180-187, 2002.

SALERA JÚNIOR, G.; MALVÁSIO, A.; PORTELINHA, T. C. G. Avaliação da predação de *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Javaés, Tocantins. **Acta Amazônica**, v.39, n.1, p.207-214, 2009a.

SALERA JÚNIOR, G.; PORTELINHA, T. C. G.; MALVÁSIO, A. Predação de fêmeas adultas de *Podocnemis expansa* Schweigger (Testudines, Podocnemididae) por *Panthera onca* Linnaeus (Carnivora, Felidae), no Estado do Tocantins. **Biota Neotropica**, v.9, n.3, p.387-391, 2009b.

SALERA JÚNIOR, G.; MALVÁSIO, A.; PORTELINHA, T. C. G. Avaliação de padrão irregular dos escudos do casco em *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae). **Acta Amazônica**, v.39, n.2, p.429-436, 2009c.

SALMAN, M. D.; MEYER, M. E.; HIRD, D. W. Epidemiology of bovine brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: data gathering and survey results. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.8, p.1561-1566, 1984.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. Londres: CSHL Press, 2001. 1448p.

SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F. P. D.; SILVA, A. S. D.; TERUYA, J. M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.30, n.1, p.19-27, 1970.

SANTA ROSA, C. A.; HYAKUTAKE, S.; BIASI, P.; BELLUOMINI, H. E.; KAWARABAYASHI, M.; GODANO, A. Contribuição ao estudo das leptospiroses em serpentes do Brasil. Levantamento sorológico em *Crotalus durissus terrificus* – Laurenti, 1768 (Viperidae: Crotalinae) – Cascavel. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.40, n.1, p.9-13, 1980.

SBH. 2008. **Lista de Répteis do Brasil.** Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 01 de março de 2009.

SCHOLZ, H. C.; HUBALEK, Z.; SEDLÁČEK, I.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; MELZER, F.; KÄMPFER, P.; NEUBAUER, H.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; FALSÉN, E.; BAHN, P.; GÖLLNER, C.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; NÖCKLER, K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.58, p.375-382, 2008.

SCHOLZ, H. C.; NÖCKLER, K.; GÖLLNER, C.; BAHN, P.; VERGNAUD, G.; TOMASO, H.; AL DAHOUK, S.; KÄMPFER, P.; CLOECKAERT, A.; MAQUART, M.; ZYGMUNT, M. S.; WHATMORE, A. M.; PFEFFER, M.; HUBER, B.; BUSSE, H. J.; DE, B. K. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.801-808, 2010.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 103-108, 2009.

SILVA, C. S. **Levantamento sorológico para leptospirose nos animais pertencentes ao Bosque Zoológico Municipal Dr. Fábio de Sá Baneto de Ribeirão Preto, SP.** 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo. 2007.

SILVA, V. G. S. O.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; COSTA, E. L. S.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 109-117, 2009.

SILVA, C. S.; GIRIO, R. J. S.; GUERRA-NETO, G.; BRICH, M.; SANTANA, L. A. S.; AMANCIO, 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**, v.47, n.3, p.237-242, 2010.

SMITH, N. J. H. Quelônios aquáticos da Amazônia: um recurso ameaçado. **Acta Amazônica**, v.9, n.1, p.87-97, 1979.

SOARES, M. F. G. S. **Distribuição, mortalidade e caça de *Podocnemis expansa* (Testudines: Pelomedusidae) no rio Guaporé**. 2000. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia/Ecologia) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazônia, Brasil. 2000.

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

SURUJBALLI, O.; MALLORY, M. An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.68, n.1, p.1-6, 2004.

SUTHERLAND, S. S. Immunology of bovine brucellosis. **Veterinary Bulletin**, v.50, n.5, p.359-368, 1980.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.184, n.6, p.722-725, 1984.

THORBJARNARSON, J. B.; PEREZ, N.; ESCALONA, T. Nesting of *Podocnemis unifilis* in the Capanaparo River, Venezuela. **Journal of Herpetology**, v.27, n.3, p.344-347, 1993.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, p.607-609, 2000. 964p.

TRUCCOLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicilin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.3, p.848-853, 2002.

TRYLAND, M. Zoonoses of arctic marine mammals. **Infectious Diseases Reviews**, v.2, n.2, p.55-64, 2000.

UNEP-WCMC. **UNEP-WCMC Species Database: CITES-Listed Species** Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>. Acesso em 09 jun. 2009.

VANZOLINI, P. E. Notes on the nesting behavior of *Podocnemis expansa* in the Amazon valley (Testudines, Pelomedusidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.20, n.17, p.191-215, 1967.

VANZOLINI, P. E. On clutch size and hatching success of the South American turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *P. unifilis* Troschel, 1848 (Testudines, Podocnemididae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.75, n.4, p.415-430, 2003.

VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, n.1, p.25-36, 1987.

VILLAR, K. S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 85-92, 2009.

YOUNG, E. J. Human brucellosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.821-42, 1983.