



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

**SOROPREVALÊNCIA E DETECÇÃO
MOLECULAR DE *Leptospira* spp. E *Brucella*
spp. EM *Podocnemis expansa* CRIADAS EM
CATIVEIRO**

ELISÂNGELA DE SOUSA GREGÓRIO

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior

Urutaí, julho de 2019



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano
Reitor

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Campus Urutaí
Diretor Geral

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do
Cerrado**

Coordenador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Urutaí, julho de 2019

ELISÂNGELA DE SOUSA GREGÓRIO

**SOROPREVALÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE
LEPTOSPIRA SPP. E *BRUCELLA SPP.* EM *PODOCNEMIS*
*EXPANSA CRIADAS EM CATIVEIRO***

Orientador

Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano
– Campus Urutaí, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado para obtenção do título
de Mestre.

Urutaí (GO)
2019

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/IF Goiano**

GG821s Gregório, Elisângela de Sousa.

SOROPREVALÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM *Podocnemis expansa* CRIADAS EM CATIVEIRO / Campus Urutaí. [manuscrito] / Elisângela de Sousa Gregório; Urutaí, GO: IF Goiano, 2019.

39p.

Orientador Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior

Dissertação (Mestrado em Mestrado Profissional em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) - Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2019.

1. Anticorpos. 2. Brucelose. 3. Leptospirose. 4. Répteis. 5. PCR e sorologia. I. Título.

CDU 57

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES
TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Elisângela de Sousa Gregório

Matrícula: 2017101330940204

Título do Trabalho: SOROPREVALÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM *Podocnemis expansa* CRIADAS EM CATIVEIRO

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 24/07/2019

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

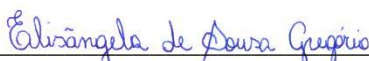
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

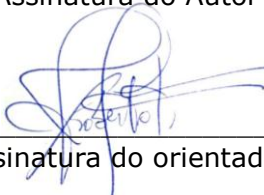
- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí - GO , 23/07/2019.



Assinatura do Autor

Ciente e de acordo:



Assinatura do orientador



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 032

Ata da 32ª Sessão Pública de Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí. Aos 24 dias do mês de maio de 2019, às 08:00h, reuniram-se na Sala da Pós-Graduação do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, a Banca Examinadora composta pelos Professores **Anna Monteiro Correia Lima**, **Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes** e **José Roberto Ferreira Alves Júnior** (orientador do trabalho), sob a presidência deste último, para avaliação da apresentação da mestrand **Elisângela de Sousa Gregório** e de sua dissertação intitulada “**Soro-incidência e detecção molecular de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em *Podocnemis expansa* criadas em cativeiro.**” Aberta a sessão pelo(a) Presidente da Banca, coube a candidata, na forma regimental, realizar a exposição de seu trabalho, dentro do tempo regulamentar, sendo em seguida questionada pelos membros da banca examinadora, tendo dado as explicações que foram necessárias. A banca examinadora, em caráter sigiloso, após análise e julgamento final, concluiu por:

- () Aprovar a dissertação sem alterações
- (X) Aprovar a dissertação com modificações (vide verso em caso de alteração do título)
- () Reprovar a dissertação

A apresentação e aprovação da dissertação é requisito parcial para a concessão do grau de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, tendo a candidata ciência de que o título de **MESTRA** só será concedido depois de atendidas as exigências feitas pela Banca Examinadora, bem como das demais exigências estabelecidas no Regulamento do Programa de Pós-graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado. A partir da presente data, a aluna terá o prazo de 60 dias para efetuar as alterações exigidas pela banca e entregar o volume da Dissertação corrigido, assinado pela banca e acompanhado de toda a **documentação pertinente** à abertura do **processo de solicitação de diploma**. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 10:30, sendo lavrada a presente Ata, que uma vez **aprovada**, foi assinada por todos os membros da Banca Examinadora e pela aluna.

Urutaí, 24 de maio de 2019.

Prof. Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior
Profª. Dra. Anna Monteiro Correia Lima
Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
Elisângela de Sousa Gregório

José Roberto Ferreira Alves Jr.
Anna Monteiro Correia Lima
Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes
Elisângela de Sousa Gregório

Por sugestão da Banca Examinadora, o novo título passa a ser:

"Sero prevalência e detecção molecular de *Leptospira*
spp. e *Bruella spp.* em *Podocnemis expansa* criadas
em cativeiro"

*Dedico este trabalho aos meus
avós José Coalhada e Iracema que
são exemplos de força,
determinação, respeito, humildade,
generosidade e amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela maravilhosa oportunidade da vida, por ser a Luz que sempre guia meus passos e por ter colocado pessoas tão incríveis no caminho no decorrer deste trabalho;

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí pelo excelente curso de Pós-Graduação em Conservação dos Recursos Naturais do Cerrado e pelos professores capacitados;

Ao meu Orientador professor Dr. José Roberto Ferreira Alves Júnior por cumprir com excelência todos deveres de orientador, por ter a capacidade de encontrar sempre solução diante das dificuldades, pela amizade, pelos ensinamentos, por acreditar e me acompanhar em todas as etapas deste trabalho;

Aos estudantes Liliam Rodrigues Pinheiro, Hudson Carneiro de Paiva Júnior, Everton Vinícius Leite, Mariana de Sousa Araújo, Amanda Pereira da Costa Araújo, Thaís Silva de Souza e ao meu pai José Gregório Júnior, que foram fundamentais no manuseio dos animais;

Ao proprietário do criatório, Sr. José Roberto Ferreira Alves, pela matéria prima cedida para a realização do trabalho;

Aos meus pais, José Gregório Júnior e Maria Piedade de Sousa Gregório, e aos meus avós, José Coalhada e Iracema Rosa, que desde sempre me deram força, apoiaram minhas decisões e acreditaram em minhas escolhas;

Ao meu namorado Magnus Schoninger que sempre me fez acreditar que esse sonho daria certo, pelos momentos de incentivo, dedicação, ensinamentos, pelo amor e carinho, que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus irmãos, Jânio que colaborou significativamente com os exames de brucelose, e a Elis Regina pela compra dos materiais farmacêuticos;

À professora Dr. Pabline Vieira por auxiliar e colaborar com a extração de DNA e realização das PCRs. Obrigada por todo ensinamento, dicas e paciência;

À Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia pelo auxílio nas realizações da PCR;

À doutoranda Thuanna Mota, por me ajudar na realização de todas as PCR, pelos conselhos, pelas dicas e pela companhia no dia a dia do laboratório de Enzimologia da UFG;

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus Jaboticabal, São Paulo, e ao técnico de laboratório Nivaldo de Assis pelo auxílio na realização da etapa sorológica da leptospirose;

Às minhas amigas Victória Christine, Vanessa Marcelo e Liliam Pinheiro por me acompanhar em Goiânia e por me hospedar em suas próprias casas;

Aos meus amigos Eurípedes, Laene e Igor (componentes do nosso quarteto fantástico) que tanto me incentivaram e me motivaram no decorrer deste percurso;

Às minhas diretoras Neusa Canedo e Cassinha Leite, pela compreensão e pela ajuda em conciliar minha carreira profissional com a acadêmica;

Ao professor Ivandilson Menezes pelos ensinamentos de biologia molecular e por me auxiliar nas PCRs;

Agradeço as contribuições da professora Adriana Santos integrante da banca de qualificação desse trabalho, dos professores Ivandilson e José Roberto também da banca de qualificação e defesa, e da Professora Anna Monteiro presente na banca da defesa dessa dissertação.

A todos os meus colegas de turma pelos ensinamentos, conselhos, união e momentos de descontrações;

A todos que acreditaram neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELA.....	xiii
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. Animais.....	18
2.2. Colheita das amostras.....	19
2.3. Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico da leptospirose.....	21
2.4. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico da brucelose.....	22
2.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
2.5.1. Extração de DNA.....	22
2.5.2. Identificação da <i>Leptospira</i> spp. e da <i>Brucella</i> spp. pela PCR.....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. <i>Leptospira</i> spp.	24
3.1.1. Sorologia.....	24
3.1.2. PCR.....	24
3.2. <i>Brucella</i> spp.	25
3.2.1. Sorologia.....	25
3.2.2. PCR.....	25
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	29
6. REFERÊNCIA.....	31
ANEXO.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Localização da área de estudo. (A) criadouro comercial de <i>P. expansa</i>	18
Figura 2: Captura das <i>P. expansa</i> de cativeiro com rede de pesca	19
Figura 3: Colheita de sangue das <i>P. expansa</i> de cativeiro por venopunção do seio venoso caudal	20
Figura 4: Colheita do conteúdo estomacal das <i>P. expansa</i> criadas em cativeiro	20
Figura 5: Resultado da PCR com os <i>primers</i> Lep1/Lep2 (331 pb). (PM) padrão de tamanho molecular 100 pb; (A8) animal 8; (A13) animal 13; (CP) controle positivo; (CN) controle negativo	25
Figura 6: Resultado da PCR com os <i>primers</i> B4/B5 (223pb). (PM) padrão de peso molecular 100 pb; (A26) animal 26; (A27) animal 27; (POOL) pool dos animais 26 e 27; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo	26

LISTA DE TABELA

	Pág.
Tabela 1: Resultado da titulação realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) nas amostras de soro das <i>P. expansa</i> criadas em cativeiro para a sorovariedade Sentot	24

SOROPREVALÊNCIA E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM *Podocnemis expansa* CRIADAS EM CATIVEIRO

RESUMO

Com o objetivo de detectar anticorpos anti-*Leptospira* e anti-*Brucella* em amostras de soro sanguíneo de *Podocnemis expansa* criadas em cativeiro e pesquisar a presença do DNA das bactérias nesses animais e nas amostras do meio onde vivem, foram colhidas amostras de sangue, lavado estomacal, rins, urina e gônadas de 60 espécimes e amostras de água e sedimentos da represa de criação. Para a identificação de anticorpos anti-*Leptospira* foi utilizada a técnica de soroprecipitação microscópica (MAT) e para a detecção de anticorpos anti-*Brucella*, realizou-se o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT). Já a detecção de DNA dos agentes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Na MAT encontraram-se cinco animais reagentes para a sorovariedade Sentot, com títulos entre 50 e 200. No AAT não houve reagentes. Pela PCR detectou-se que três *P. expansa* continham o DNA de *Leptospira* spp. nas amostras de rins e um réptil continha o DNA de *Brucella* spp. nas amostras de gônadas. Dos indivíduos com presença de DNA de *Leptospira* spp. apenas um deles apresentava anticorpos anti-*Leptospira*, sendo o título mais alto, 200. Os resultados demonstram que as *P. expansa* podem ser hospedeiro de manutenção da sorovariedade Sentot no ambiente onde vivem, e ainda, ser hospedeiro natural da *Brucella* spp. permitindo a disseminação do agente.

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

SOROPREVALENCE AND MOLECULAR DETECTION OF *Leptospira* spp. AND *Brucella* spp. IN CAPTIVE *Podocnemis expansa*

ABSTRACT

In order to detect anti-*Leptospira* and anti-*Brucella* antibodies in captive bred *Podocnemis expansa* blood serum samples and to investigate the presence of the bacterial DNA in these reptiles and in the samples of the environment where they live, blood samples, stomach wash, kidneys, urine and gonads were collected from 60 specimens and water and sediment samples from the breeding dam. For the identification of the anti-*Leptospira* antibodies was used the microscopic agglutination test (MAT) and antibodies anti-*Brucella* detection used the rose bengal plate test (RBPT). The DNA detection of the agents was performed by polymerase chain reaction (PCR). At MAT, five reagents animals for the Sentot serovar was found with titles between 50 and 200. There weren't reagents in the RBPT. The PCR revealed that three *P. expansa* contained the agent DNA in the kidneys samples and only in the gonads samples of a reptile found the bacterial. Of individuals with *Leptospira* spp. DNA present only one of them had anti-*Leptospira* antibodies, being the highest title, 200. The results demonstrate that *P. expansa* can be a maintenance host of the serovar Sentot found in the environment where they live, and also be a natural host of *Brucella* spp. allowing a spread of the agent.

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

1. INTRODUÇÃO

Estados brasileiros como Mato Grosso e Goiás possuem a bovinocultura de corte extensiva como forte potencial de renda na economia (BATHKE, 1999). Tais estados apresentam o bioma Cerrado como vegetação natural, o qual apresenta regiões alagadiças, permitindo que animais domésticos e selvagens compartilhem o mesmo ambiente, peculiaridade que pode favorecer a transmissão cruzada de doenças infectocontagiosas entre animais selvagens, domésticos e humanos (BATHKE, 1999; ALVES JÚNIOR, 2013).

O bioma supracitado abriga grande diversidade de répteis, incluindo elevado número de espécies endêmicas. Entretanto, devido à acelerada transformação das paisagens naturais no Brasil central, o conhecimento desta diversidade ainda é escasso (FELFILIL e SILVA JUNIOR, 1988 e RECODER et al., 2011). Segundo Recoder et al. (2011), há a necessidade urgente de estudos intensivos sobre a fauna de répteis do Cerrado para contribuir com ações de conservação dessa classe.

Dentre esses répteis encontra-se a espécie *Podocnemis expansa*, caracterizada como o maior Testudine de água doce da América do Sul (ALHO et al., 1979; MOLINA; ROCHA, 1996). Sua massa corporal pode medir 75 a 107 cm de comprimento por 50 a 75 cm de largura (RODRIGUES, 1992) e pesar até 60 Kg (SMITH, 1979). São animais de vida longa, com demorada maturação sexual e, por isso, com baixa taxa de substituição de indivíduos na população (ALFINITO, 1973; PRITCHARD, 1979).

Apesar dos quelônios representarem componentes importantes desses ameaçados ecossistemas (CROUSE et al., 1987), no Brasil, os conhecimentos relacionados a essa Ordem, especialmente para as espécies que vivem no bioma Cerrado, são precários (MYERS et al., 2005). Atualmente os cágados de água doce estão submissos a crise global de sobrevivência e é de fundamental importância desenvolver estudos que subsidiem estratégias de manejo e conservação (FRAXE NETO, 2009).

Vários fatores influenciam diretamente a vidas dos répteis e os deixam vulneráveis, como por exemplo, os impactos como poluição hídrica, alterações na vazão e degradação da vegetação às margens dos lagos e rios (FRAXE NETO, 2009). Isso contribui para a queda acelerada da biodiversidade (DAVID et al., 2006). Além dos impactos ambientais que colocam a vida das tartarugas em risco, existem outros aspectos que merecem atenção como as doenças causadas por microorganismos que fazem parte do ambiente natural desses animais (ALVES JÚNIOR, 2013).

De acordo com Duarte et al. (2007), quando os processos ecológicos desses testudines são rompidos, devido à diminuição de habitats, normalmente ocorre o surgimento de problemas sanitários. Outro fator que também pode influenciar a vida dessas tartarugas está descrito no trabalho

de Silva (2007), pois o autor relata que animais próximos às áreas urbanas e aos animais domésticos estão predispostos aos agentes infecciosos causadores de doenças.

Duas doenças que pode ser destacada por afetar diversas espécies de animais domésticos e selvagens é a leptospirose e a brucelose. Essas enfermidades possuem ampla distribuição geográfica e podem ser transmitida de um animal ao outro e dos animais aos humanos (ALVES JÚNIOR, 2013). Em ambientes antrópicos, onde há o convívio entre animais, as doenças podem ser transmitidas de domésticos para selvagens, de selvagens para domésticos e/ou de selvagens para selvagens (BATHKE, 1999).

A leptospirose é causada por bactérias do gênero *Leptospira* (RODRIGUES et al. 2015). Segundo Alt e Bolin (1996), animais infectados com leptospirosas são as principais fontes de infecção para outros animais e para humanos. O agente pode ser transmitido por contato direto (urina, sangue, tecidos, monta natural e inseminação artificial com sêmen infectados) ou indireto (água, alimentos e fômites contaminados), afirmam Figueiredo et al.(2008). De acordo com Rodrigues et al. (2015), ainda são escassos trabalhos realizados sobre a leptospirose nos répteis e há incerteza quanto à participação dessa Classe na cadeia epidemiológica dessa doença.

A brucelose é uma importante doença bacteriana causada por bactérias do gênero *Brucella*. Segundo Batheke (1999), ela pode afetar todas as espécies de animais domésticos, diversas espécies de animais selvagens e, ainda, humanos. Davis (1990) relata que os animais selvagens, considerados reservatórios da *Brucella* spp., assumem importante papel na epidemiologia da doença por transmitirem para outros animais. De acordo com Metcalf et al. (1994), em ambientes naturais os animais selvagens são responsáveis pela manutenção da bactéria.

Alves Júnior (2013) ao estudar a leptospirose e brucelose em *Podocnemis expansa* de vida livre e cativeiro propôs que a proximidade de rebanhos bovinos às margens de lagos e rios pode facilitar a transmissão da bactéria entre os rebanhos bovinos e os quelônios de populações selvagens e vice-versa, ou ainda, a transmissão entre bovinos e tartarugas de cativeiro pode estar vinculada a água de açudes ou represas que servem como fonte de abastecimento para ambas espécies.

Devido as particularidades anatômicas dos répteis, eles podem abrigar microorganismos patogênicos de forma assintomática. Isso faz das técnicas de diagnóstico, peças chave para o manejo e avaliações clínicas necessárias para a sobrevivência dos animais selvagens. Assim, torna-se essencial à utilização de exames complementares como a sorologia e a PCR, a fim de verificar a saúde do indivíduo e do plantel.

A leptospirose e a brucelose nas populações de *P. expansa* são pouco estudadas e não se sabe ainda as cadeias epidemiológicas dessas bactérias. Alves-Júnior (2013) relata a importância de dar continuidade em pesquisas, considerando as doenças zoonoses e as *P. expansa* possíveis

hospedeiros do agente.

Com isso, os objetivos do estudo foram detectar anticorpos contra *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em soros sanguíneos de *P. expansa* criadas em cativeiro e pesquisar a presença do DNA das bactérias nesses animais e nas amostras do meio onde vivem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Após a emissão da licença SISBIO número 66473-1 do dia 30 de outubro de 2018 (anexo 1), os animais foram capturados do Criadouro Comercial Fazenda Moenda da Serra (Registro IBAMA 28.771), localizado no município de Araguaia – GO, na região do Vale do rio Araguaia ($15^{\circ}04'18''S$ $50^{\circ}25'2.4''W$) (figura 1).

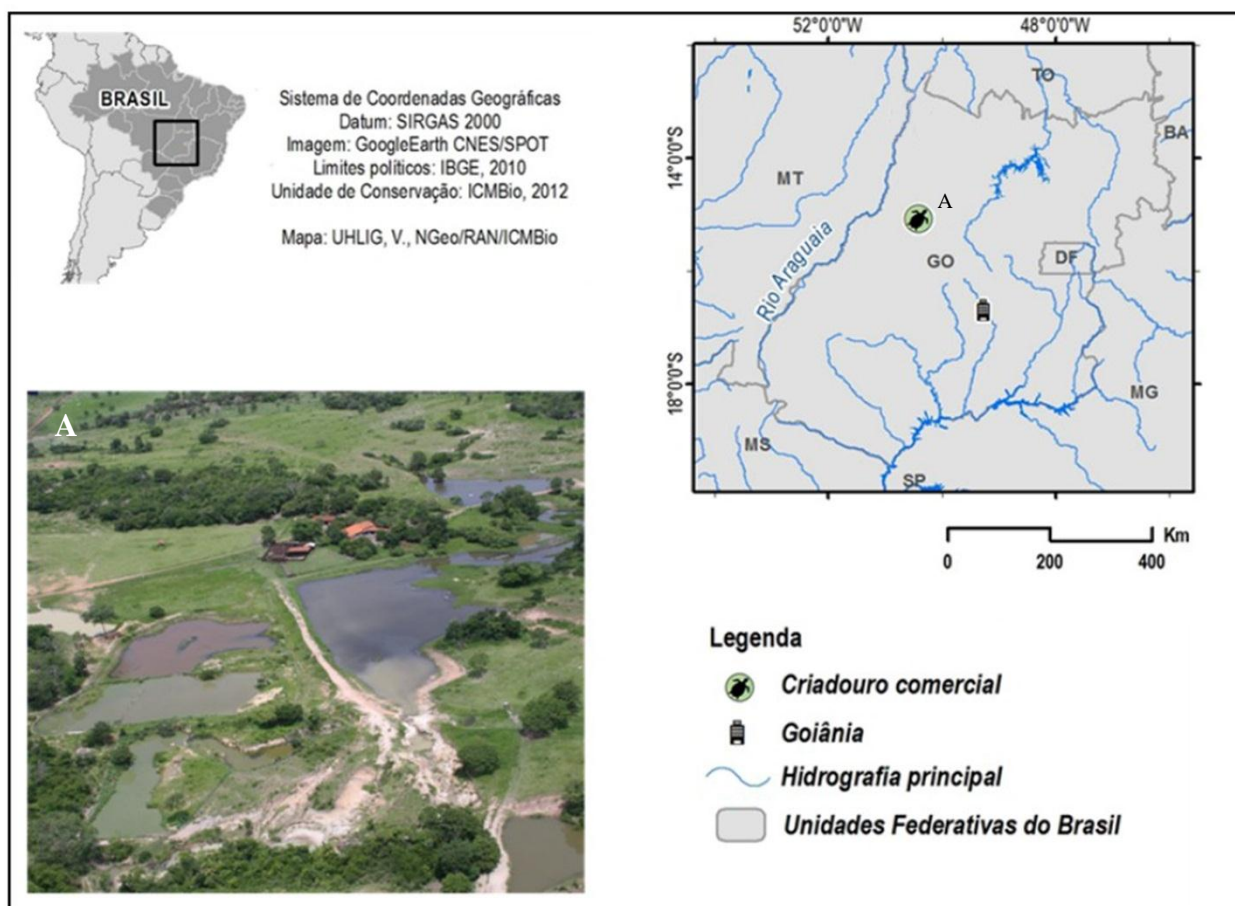


Figura 1: Localização da área de estudo. (A) criadouro comercial de *P. expansa*.

Para a pesquisa utilizaram-se 60 indivíduos de *P. expansa*, com massa corporal média de 1.340 Kg e idade estimada de 6 anos, as quais foram capturadas da represa de criação com o auxílio

de redes de arrasto (figura 2). Não foi calculada estatisticamente a quantidade de animais desta pesquisa por não se saber o tamanho exato da população existente no criadouro.



Figura 2: Captura das *P. expansa* de cativeiro com rede de pesca.

2.2. Colheita das amostras

Após a captura dos espécimes, mediante prévia antissepsia do local, foram colhidas as amostras de sangue por venopunção do seio venoso caudal, utilizando seringas de 3mL e agulhas (20 x 0,55mm), esterilizadas e descartáveis (figura 3). O volume total colhido por animal foi 3mL e, após a coagulação do sangue, o soro extraído foi colocado em microtubos identificados.



Figura 3: Colheita de sangue das *P. expansa* de cativeiro por venopunção do seio venoso caudal.

O conteúdo estomacal dos cágados foi colhido por sonda (sonda uretral nº14), conforme a técnica descrita por Alves-Júnior et al. (2011) (figura 4). De cada exemplar foram retirados aproximadamente 10mL, dos quais apenas 1,5mL foi transferido para um microtubo de 2mL.



Figura 4: Colheita do conteúdo estomacal das *P. expansa* criadas em cativeiro.

Em seguida, as *P. expansa* foram insensibilizados e eutanasiadas, conforme a técnica preconizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), para posterior colheita da urina, dos rins e das gônadas. A amostra de urina foi retirada por perfuração da bexiga utilizando agulha 25x07mm e seringa de 20mL esterilizadas e descartáveis; colheu-se aproximadamente 5mL de cada indivíduo. Transferiu-se 1,5mL de cada amostra da urina colhida para o microtubo, identificado individualmente. Os rins e as gônadas foram localizados, retirados da carcaça e colocados separadamente em potes plásticos esterilizados e identificados com a respectiva numeração do animal. Após colhidos, esses órgãos foram macerados, com adição de solução fisiológica esterilizada nos respectivos potes, e do resultado da maceração de cada órgão foi colhido 1,5mL, o qual foi transferido para um microtubo de 2,0mL, também identificado.

Colheu-se também, amostras da água e sedimentos de alguns pontos da represa de criação: tablado de alimentação, extravasor (ladrão), nascente e lateral. Essas amostras foram colocadas em frascos coletores esterilizados e identificados individualmente.

Todo material colhido para o experimento foi identificado e armazenado à temperatura de – 20°C até o momento do exame.

2.3. Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) para diagnóstico da leptospirose

O teste para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* no soro sanguíneo extraído das *P. expansa* foi realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Jaboticabal no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (DMVPRA), Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose (LDBL).

Foi utilizado uma coleção de antígenos vivos que inclui 22 sorovarietades (sv) de leptospiros patogênicas (Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Batavie, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippytyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panamá, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Sentot) e duas de leptospiros saprófitas (Andamana e Patoc).

Para a triagem colocaram-se o soro sanguíneo em placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços. As amostras de soro foram diluídas em solução de Sorensen, de acordo com Santa Rosa et al. (1970), sendo a diluição inicial 1:50. A mistura dos soros sanguíneos com os antígenos foi homogeneizada levemente e deixada em repouso na estufa 28°C por 40 minutos. Em seguida as amostras foram examinadas no microscópio de condensador de campo escuro a seco na objetiva de

10x e ocular 10 a 16x. Consideraram-se como reagentes as amostras que tiveram 50% de aglutinação no aumento de 100 vezes.

As amostras reagentes foram tituladas em uma série geométrica de diluições de razão dois com diluição inicial 1:100. O título foi dado como a recíproca da maior diluição em que houvesse aglutinação.

2.4. Prova do antígeno acidificado tamponado (AAT) para diagnóstico da brucelose

O teste sorológico para o diagnóstico da brucelose foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí de acordo com a técnica recomendada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (BRASIL, 2006).

A técnica conhecida como teste rosa Bengala e *cardtest*, foi realizada utilizando 30µL de soro sanguíneo de cada cágado e igual quantidade de antígeno. Colocou-se a mistura em uma placa de vidro e homogeneizou-se durante quatro minutos com a placa em constantes movimentos rotatórios. Logo em sequência fez-se a leitura por meio de uma caixa de luz indireta. A formação de grumos de aglutinação foi o critério utilizado para diagnosticar a amostra como reagente. O antígeno utilizado na realização dos testes foi preparado com *Brucella abortus* de 8% de volume celular.

2.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

2.5.1. Extração de DNA

O DNA das amostras de urina, rins, gônadas, lavado estomacal, água e sedimento da represa foi extraído utilizando o protocolo de Biase et al. (2002) modificado.

As amostras resultantes da maceração dos órgãos foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida descartou-se 1,8mL do sobrenadante de cada eppendorf e o restante foi ressuspendido com 800µL de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 25mM pH8, NaOH 400mM e SDS 0,5%).

Após, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas em banho-maria por 60 minutos a 65°C, sendo suavemente agitadas a cada 10 minutos. Terminado o processo de desestruturação das moléculas de lipídeo das membranas biológicas, foi adicionado 400µL de acetato de potássio 5M em cada amostra, sendo misturada suavemente por inversão e permanecendo 30 minutos no

gelo, também invertidas a cada 10 minutos.

Decorrida a etapa anterior, ocorreu novamente a etapa de centrifugação, sendo as soluções centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs e ressuspendido com 700µL de clorofórmio:álcoolisoamílico (24:1). Misturou-se por inversão durante três minutos, centrifugou-se a 12.000 x g durante 10 minutos a 10°C e com o auxílio de um micropipetador e ponteiros descartáveis, a fase superior das amostras foi transferida cuidadosamente para novos tubos, para não pegar a interface inferior. Então, adicionou-se 1.000µL de etanol absoluto gelado, misturou-se suavemente por inversão e foi deixado em 'over night' no freezer a -20°C.

No dia seguinte realizou-se a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 10°C para precipitação do DNA. Sequencialmente, a parte líquida foi descartada cuidadosamente e no *pellet* foi adicionado 1.000µL de etanol 70% e repetiram-se novamente as etapas anteriores de centrifugação e descarte da parte líquida. A etapa de secagem do *pellet* foi realizada em temperatura ambiente aproximada de 25°C por 60 minutos e, em seguida, o *pellet* final foi ressuspendido em 40µL de água Milli-Q. O material foi estocado a -20°C até a realização da PCR.

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

Para identificar a presença de *Leptospira* spp. nas amostras foi utilizado o par de *primer* Lep1 (5' - GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG - 3') e o Lep2 (5' - TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT- 3'), com capacidade de amplificar um fragmento de 331 pb (MERIEN et al., 1992). Já o processo de amplificação da *Brucella* spp. foi realizado com o 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 possui capacidade de amplificar um fragmento de 223 pb (BAILY et al., 1992).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo da PCR multiplex. Utilizou-se tampão de reação 1X, composto por 100mM Tris-HCl pH 8,8; 500mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40. Utilizaram-se também, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 10 mM, *Taq DNA polimerase*, 5,0 pmol de cada primer (IDT®), DNA e 25µL água esterilizada q.s.p..

Os parâmetros de amplificação utilizados foram 94°C por 4 minutos para a desnaturação inicial, seguido de 38 ciclos de 94°C por um minuto para desnaturação, anelamento a 60°C por 45 segundos, extensão a 72°C por um minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos, realizada em termociclador T100TM ThermalCycler (BIO-RAD).

A análise do produto amplificado foi realizada em gel de agarose a 1,5% em cuba

horizontal com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) concentrado a 1X, corado com brometo de etídeo e contendo padrão de concentração de 100 pb DNA Ladder (ThermoScientific). O gel foi visualizado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC™ EQ (BioRad).

Como controle positivo da *Leptospira* spp. utilizou-se o DNA de leptospiras da sorovariedade Pomona. Para essa extração foi utilizado o reagente comercial DNazol (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante. Já o controle positivo da *Brucella* spp. utilizou-se o DNA da bactéria *Brucella abortus* oriundo da vacina B19.

3. RESULTADOS

3.1. *Leptospira* spp.

3.1.1. Sorologia

Na sorologia das *P. expansa* de cativeiro (n=60) realizada através da técnica de Soroaglutinação microscópica (MAT), encontrou-se cinco (8,34%) reagentes na triagem para a sorovariedade Sentot. O título mais alto encontrado na etapa de titulação foi 200, referente ao soro sanguíneo do espécime identificado como 13, seguido dos títulos 100 das amostras dos exemplares 11 e 19, e título 50 das amostras dos indivíduos 24 e 56, como podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Resultado da titulação realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) nas amostras de soro das *P. expansa* criadas em cativeiro para a sorovariedade Sentot.

Animal	Título
11	100
13	200
19	100
24	50
56	50

3.1.2 PCR

Ao analisar os resultados da PCR das amostras de urina, lavado estomacal e gônadas, observou-se que todas foram negativas para a *Leptospira* spp., assim como as amostras de água e sedimentos dos diferentes pontos da represa. Entretanto, das 60 amostras de rins analisadas, duas

(3,34%), amostras do animal 8 e 13, apresentaram fragmento de DNA da bactéria analisada (Figura 5). Associando o resultado da PCR ao da sorologia, detectou-se que apenas um indivíduo (13) foi reagente a ambos os testes.

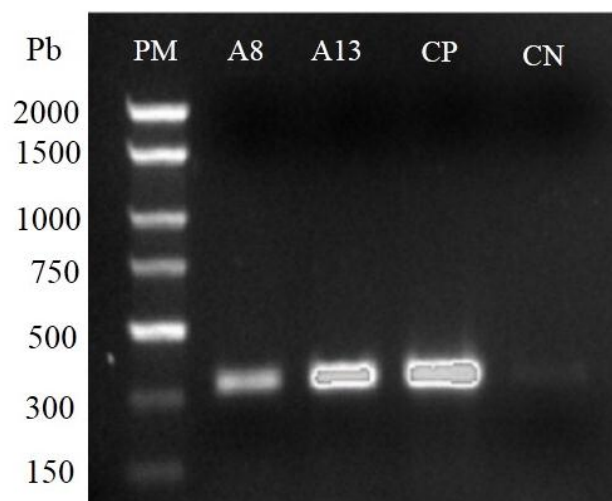


Figura 5: Resultado da PCR com os primers Lep1/Lep2 (331 pb). (PM) padrão de tamanho molecular 100 pb; (A8) animal 8; (A13) animal 13; (CP) controle positivo; (CN) controle negativo.

3.2. *Brucella* spp.

3.2.1. Sorologia

Todas as amostras de soro sanguíneo utilizadas no teste do antígeno acidificado tamponado (AAT), não foram reagentes.

3.2.2. PCR

Avaliando as 60 amostras de urina, de rins e de lavado estomacal, submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR), observou-se que todas foram negativas para *Brucella* spp.. Em uma (1,66%), das 60 amostras de gônadas avaliadas, detectou-se a presença do DNA da bactéria (Figura 6). Todas as amostras de água e sedimentos da represa foram negativas.

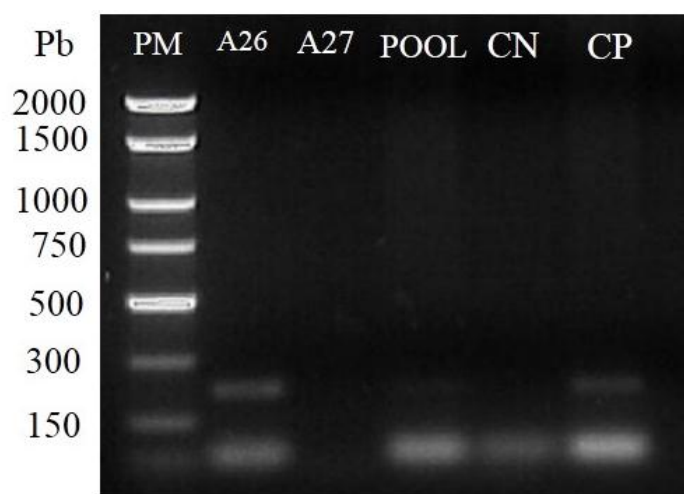


Figura 6: Resultado da PCR com os primers B4/B5 (223pb). (PM) padrão de peso molecular 100 pb; (A26) animal 26; (A27) animal 27; (POOL) pool dos animais 26 e 27; (CN) controle negativo; (CP) controle positivo.

4. DISCUSSÃO

O estudo pioneiro sobre leptospirose em animais selvagens foi realizado em 1961 por Pestana et al. (1961), sendo analisado o soro sanguíneo de 51 preás (*Cavia aperae azarae*) de vida livre. Os autores encontraram 26 (51,9%) animais sororreagentes para a sorovariedade *Icterohaemorrhagiae*. Em relação à propriedade onde foram colhidas as amostras biológicas das tartarugas foi possível observar a presença de preás próximos à represa de criação, possibilitando assim a transmissão da bactéria para os quelônios cativos.

No ano de 2005, Esteves et al. (2005) realizaram investigações sorológicas em 166 animais do zoológico de Uberaba – MG, entre os selvagens havia mamíferos (22), aves (48), répteis (54) e peixes (7). Dos 48 quelônios avaliados, dois (4,2%) foram positivos, sendo um (2,1%) dos *Chelonoidis spp.* (jabuti) reagente a sorovariedade Andamana com título 100 e uma (2,1%) *Trachemys spp.* (trigre-d'água) reagente a sorovariedade Patoc, também com o mesmo título. No presente estudo, apesar dos títulos serem próximos ao de Esteves et al. (2005), título máximo 200, observaram-se reações apenas para a sorovariedade Sentot.

Já Silva et al. (2010), ao realizarem a MAT em quatro (100%) *P. expansa* do Zoológico Municipal de Ribeirão Preto - SP, detectaram três (75%) amostras reagentes a sorovariedade Panama e Pomona, com títulos 2560 e 1280, respectivamente. Tais sorovariedades diferentes e com títulos muito superiores aos encontrados no estudo em questão.

Alves Júnior (2013) ao analisar 120 *P. expansa* do mesmo criatório encontrou 117 (97,50%) indivíduos reagentes pela técnica MAT, com maior ocorrência das sorovariedades Panama, Castellonis, a Autumnalis e a Hebdomadis. Isso demonstra que há uma variação das sorovariedades de acordo com o passar dos anos, podendo ocorrer por interferências climáticas ou ambientais, ou até talvez, pela presença ou ausência de diferentes espécies de hospedeiros de manutenção na região, que poderiam eliminar as bactérias no ambiente e contaminar a água, infectando populações selvagens, terrestres, aquáticas, domésticas e humanos.

A sorovariedade resultante desta pesquisa coincide com a encontrada por Moraes et al. (2010), que ao pesquisarem 37 equídeos da Ilha de Algodal - PA encontraram 70% (n=7) das fêmeas reagentes a sorovariedade Sentot, com título máximo 100. Estes autores sugerem que tal achado pode implicar em provável reflexo das sorovariedades mantidas por outros animais domésticos ou selvagens que vivem na mesma região geográfica. Como a principal atividade da fazenda, onde há o criatório de *P. expansa*, é a bovinocultura de corte e equídeos são utilizados para o manejo do gado e têm acesso à represa de criação dos quelônios, existe a possibilidade de transmissão de tal sorovariedade a estes répteis pelos cavalos e burros da propriedade como por outros animais selvagens da região.

Rodrigues et al. (2016) ao realizarem a MAT em 64 cascáveis (*Crotalus durissus collilineatus*) do Criadouro Conservacionista da Universidade Federal de Uberlândia encontraram 87,5% dos animais reagentes a pelo menos uma sorovariedade, sendo os mais frequentes Javanica, Andamana e Patoc e maior frequência de títulos 25, 50 e 100. Esses autores afirmaram que por não existir estudos sobre o ponto de corte a ser utilizado na sorologia de répteis, títulos baixos são considerados importantes pois pode representar doença mesmo sem apresentação de sinais clínicos.

Calle et al. (2001) relataram que títulos baixos demonstram que o animal já entrou em contato com o agente, podendo indicar infecções recentes ou anticorpos remanescentes de infecções antigas, e Rodrigues et al. (2016) descreveram que títulos altos podem indicar doença aguda. Em relação ao animal 13, o aparecimento de reação em ambos os testes, MAT e PCR, leva-se a pensar na hipótese que apenas indivíduos com títulos superiores a 100 na sorologia podem ter a possibilidade do aparecimento fragmentos de DNA em amostras de órgãos, urina e outros fluídos, talvez por estarem na fase aguda da doença e apresentarem a bactéria no órgão, já que a PCR detectou o DNA da *Leptospira* spp. na amostra de rim.

Já o resultado positivo do animal 8, apenas na PCR, pode estar relacionado com as sugestões de Glosser et al. (1974) e Charon et al. (1975), que ao estudarem répteis afirmaram que a infecção pode permanecer incubada por até seis meses e meio, evitando assim a produção de anticorpos pelo organismo. Dessa forma, pode-se pensar que a *P. expansa* citada acima já estava com a bactéria no organismo, mas não tinha produzido anticorpos contra o agente.

A escassez de informações a respeito do comportamento da leptospirose nesses animais reforça a grande importância do estudo da leptospirose em répteis e de acordo com Silva et al., (2010), mesmo títulos baixos encontrados na sorologia são informações relevante por não saber o tipo de resposta imunológica que esses animais desenvolvem na presença do agente. Desvars et al. (2010) afirmaram a importância de se estudar os répteis, uma vez que podem desempenhar papéis de destaque como reservatórios e mantenedores de Leptospiras no meio ambiente.

De acordo com Salman et al. (1984), a ocorrência da brucelose pode ser significativamente superior entre animais de propriedades rurais vizinhas quando há contato por meio das pastagens ou da água de consumo, no caso de rios, lagos e represas. As águas da represa do trabalho em questão não vinham de propriedades vizinhas, mas sim de nascentes ativas apenas durante o período das chuvas, ou das águas de enxurradas que lavavam morros e pastagens trazendo matéria orgânica e microorganismos para dentro da represa, a qual seria utilizada para o fornecimento de água de consumo tanto por rebanhos bovino e equino, bem como pela população de *P. expansa* do criadouro e outras espécies selvagens presentes naquela região.

A presença de DNA de *Brucella* spp. na amostra de gônadas de uma *P. expansa* evidencia que a bactéria está presente nas populações cativas, entretanto o agente em questão é bem controlado no rebanho bovino da propriedade, pois as matrizes foram adquiridas mediante o atestado negativo para a presença de anticorpos contra a bactéria e todas as bezerras com idade entre 3 a 8 meses são vacinadas. Uma possibilidade seria a infecção desse réptil por alguma *Brucella* eliminada na água ou nas pastagens por outras espécies selvagens da região e transportadas até a represa por meio das chuvas.

Em mamíferos, os principais sinais da brucelose é o abortamento, natimortalidade e nascimento de crias fracas Bathke (1999). Em quelônios essa doença não apresenta sinal clínico, porém Alves-Júnior (2013) relatou que há a possibilidade da ocorrência do aparecimento dos defeito de casco e escutelação em neonatos, eclosão de filhotes fracos e mortalidade embrionária em animais com a presença de da *Brucella* spp. no organismo. No presente trabalho houve a presença dessa bactéria nas gônadas de um animal, tal preferência leva-se a pensar que a brucelose pode influenciar a diminuição gradativa do número de exemplares da espécie.

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). Todas essas espécies fazem parte da fauna do Cerrado da região do Vale do rio Araguaia, região onde foi realizado o estudo.

Conforme Bathke (1999) ambiente onde há o convívio ou proximidade de animais domésticos e selvagens pode haver contaminações cruzadas entre eles, de: domésticos para selvagens, selvagens para domésticos e selvagem para selvagem. Com afirmação do autor, não se pode confirmar que os bovinos contaminaram os animais selvagens, pois existe a possibilidade de a *P. expansa* ter sido contaminada por outros animais selvagens ou ser a fonte de infecção para os bovinos.

Eisenberg et al. (2012), ao estudarem amostras de sapos africanos selvagens, mortos ou moribundos, da espécie (*Pyxicephalus edulis*), observaram que os isolados 27 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.

No presente trabalho não houve a presença de *P. expansa* positiva para a prova do AAT, todavia, a detecção do fragmento de DNA da bactéria em um exemplar pode ser justificada pela possibilidade de se tratar de uma espécie diferente de *Brucella*, já que o AAT é específico para *Brucella* lisas, dentre elas a *B. abortus*. Outra hipótese seria a *P. expansa* ser hospedeiro natural da bactéria, eliminando o agente sem que haja a produção de anticorpos detectáveis na sorologia.

Em relação ao bioma Cerrado existem muitas perguntas a serem respondidas em relação à epidemiologia da leptospirose e brucelose. Os agentes fazem parte da diversidade microbológica da região, tornando possível a transmissão das bactérias entre animais domésticos e selvagens, ou talvez, no caso da brucelose, só entre selvagens, o que pode possibilitar a seleção de indivíduos de uma determinada espécie de vida livre, resistentes a doença. Tal fato, talvez seja importante meio que a vida encontrou para o controle das populações e conservação de espécies.

5. CONCLUSÃO

A *P. expansa* pode ser hospedeiro natural da *Leptospira* e da *Brucella*.

Ambas bactérias fazem parte da microbiologia do cerrado, aumentando a possibilidade do contato entre esses agentes e animais selvagens endêmicos da região.

A diversidade da fauna existente no Cerrado, compartilhando habitat com espécies domésticas, torna possível a transmissão das bactérias entre animais domésticos e selvagens, ou talvez, no caso da *Brucella*, só entre selvagens.

Há a possibilidade de existir uma nova espécie de *Brucella* capaz de acometer quelônios.

6. REFERÊNCIAS

- 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.
- ALHO, C. J. R.; CARVALHO, A. G.; PADUA, 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.
- 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.
- ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; SOUSA, E.; LUSTOSA, A. P. G.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, 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 JÚNIOR, J. R. F. ***Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM TARTARUGAS-DAAMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*) DO VALE DO RIOARAGUAIA – GO.** Tese de doutorado pela Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, 2013.
- 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.
- BATHKE, W. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** Parte 2, cap.42, p.163-188, 1999.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT).** Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual Técnico. Brasília, 2006. 188p.
- Calle, P. P.; Rivas, J.; Muñoz, M.; Thorbjarnarson, J.; Holmstrom, W.; Karesh, W. B.; 2001. Infectious disease serologic survey in free-ranging Venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 32, 320-323.
- CHARON, N. W.; JOHNSON, R. C.; MUSCHEL, L. H. Antileptospiral activity in lowervertebrate sera. **Infection and Immunity**, v.12, n.6, p.1386-91, 1975.
- CROUSE, D. T., L. B. CROWDER, and H. CASWELL. **A Stage-Based Population-Model for Loggerhead Sea-Turtles and Implications for Conservation.** Ecology 68:1412-1423, 1987.
- DAVID, D., H. A. ANGELA, O. G. MARK, K. ZEN-ICHIEO, J. K. DUNCAN, L. CHISTIAN, J. N. ROBERT, P.-R. ANNE-HÉLÉNE, S. DORIS, L. J. S. MELANIE, and A. CAROLINE. **Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges.** Biological Reviews 81:163-182, 2006.

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

DESVARS, A.; CARDINALE, E.; MICHAULT, A. Animal leptospirosis in small tropical areas. **Epidemiology and Infection**, v.139, p.167-188, 2010.

DUARTE, J. A. M.; COSTA, F. S.; ANDRADE, P. C. M. **Criação e Manejo de Quelônios no Amazônia**. Laboratório de Animais Silvestres da Universidade Federal do Amazônia. Cap. 2, 2 ed., 2007.

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.; ZSCHOCK, M. **Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs**. Applied and Environmental Microbiology, v.78, n.10, p.3753 – 3755, 2012.

ESTEVES, 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.

FELFILIL, J. M., & SILVA JUNIOR, M. C. **Distribuição dos Diâmetros numa faixa de Cerrado na Fazenda Água Limpa (FAL) em Brasília – DF**. Acta bot. bras. 2 (1-2): 85-104, 1988.

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, 385-398. 450p, 2008.

FRAXE NETO, H. J., **Demografia de *Acanthochelys spixii* (Duméril e Bibron, 1835) (Testudines, Chelidae) no Cerrado do Distrito Federal**. Dissertação de mestrado em Biologia Animal – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – DF. 2009.

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.

ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A.; BERNARDINI, F.; NASCIMENTO, A. A.; LABRUNA, M. A.; ARANTES, I. G. Evidencia 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.

MANGINI, P. R.; JOINEAU, M. E. G.; PATRICIO, M. A. C.; FORTES, M. A. T.; GONCALVES, 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.

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.

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.

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.
MORAIS, C. C. G.; KURODA, R. B. S.; PINHO, A. P. V. B.; YWASAKI, F.; MENESES, A. M. C.; MARTINS, A. V.; AMARAL-JÚNIOR, J. M.; DIAS, H. L. T.; VASCONCELLOS, S. A. **Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogênicas em equídeos criados na ilha de Algodão, Estado do Pará.** Revista de Ciências Agrárias, v.53, n.2, p.188-194, 2010.

MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, C. G. MITTERMEIER, and P. R. GIL. **Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions.** University of Chicago Press, 2005.

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

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

RECODER, R.S.; TEIXEIRA JUNIOR, M.; CAMACHO, A.; NUNES, P.M.S.; MOTT, T.; VALDUJO, P.H.; GHELLERE, J.M.; NOGUEIRA, C.; RODRIGUES, M.T. **Reptiles of Serra Geral do Tocantins Ecological Station, Central Brazil.** Biota Neotrop. 11(1): 2011.

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

RODRIGUES, T. C. S. **Investigação da leptospirose em cascavéis *Crotalus durissus collilineatus* mantidas em cativeiro.** Tese de mestrado pela Universidade Federal de Uberlândia – 2015.

Rodrigues, T. C. S., Santos, A. L. Q., Lima, A. M. C., Gomes, D. O., Brites, V. L. C.. Anti-*Leptospira* spp. antibodies in *Crotalus durissus collilineatus* kept in captivity and its zoonotic relevance. **Acta Tropica**, v. 158, p. 39-42, 2016.

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.

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.

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, 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.

ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66473-1	Data da Emissão: 30/10/2018 11:35:23	Data da Revalidação*: 30/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Elisângela de Sousa Gregório	CPF: 043.340.491-41
------------------------------------	---------------------

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Realização da PCR	11/2018	02/2019
2	Exames sorológicos	11/2018	02/2019
3	Coleta das amostras biológicas	11/2018	02/2019

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES JUNIOR	Orientador	892.530.781-20	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	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 passada, 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.
3	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.
4	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	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. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0664730120181030

Página 1/3

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66473-1	Data da Emissão: 30/10/2018 11:35:23	Data da Revalidação*: 30/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Elisângela de Sousa Gregório	CPF: 043.340.491-41
------------------------------------	---------------------

Outras ressalvas

1	ESTA AUTORIZAÇÃO ICMBio/SISBio NÃO CONTEMPLA A COLETA (REMOÇÃO) DE EXEMPLARES DE TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA (P.expansa) DA NATUREZA, POSTO QUE TODOS OS EXEMPLARES A SEREM UTILIZADOS NA PESQUISA DEVERÃO ORIGINAR-SE DO CRIADOURO COMERCIAL FAZENDA MOENDA DA SERRA (REGISTRO IBAMA 28771), LOCALIZADO NO MUNICÍPIO DE ARAGUAPAZ-GO, NA REGIÃO DO VALE DO ARAGUAIA, DE PROPRIEDADE DO SR. JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES.	RAN Goiânia-GO
---	--	----------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Criadouro Comercial Fazenda Moenda da Serra (Registro IBAMA 28.771) na região do Vale do Araguaia	Araguapaz-GO	Cerrado	Não	Dentro de UC Estadual

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Podocnemis expansa	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Répteis)	Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNESP JABOTICABAL	Laboratório
2	Instituto Federal Goiano - Campus Urutai	Laboratório

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 66473-1	Data da Emissão: 30/10/2018 11:35:23	Data da Revalidação*: 30/10/2019
-----------------	--------------------------------------	----------------------------------

De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

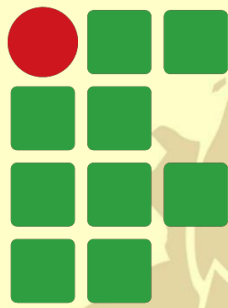
Nome: Elisângela de Sousa Gregório	CPF: 043.340.491-41
------------------------------------	---------------------

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, 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).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Campus
Urutaí

