



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PÂMELA TALITA DE AGUIAR E SILVA

**DETECÇÃO DE *Salmonella enterica enterica* EM *Kinosternon scorpioides scorpioides*
(LINNAEUS, 1766) DE VIDA LIVRE**

Belém

2019

PÂMELA TALITA DE AGUIAR E SILVA

**DETECÇÃO DE *Salmonella enterica enterica* EM *Kinosternon scorpioides scorpioides*
(LINNAEUS, 1766) DE VIDA LIVRE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

Coorientadora:

Prof. Dr^a. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro

Belém

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d Silva, Pâmela Talita de Aguiar e
Detecção de Salmonella enterica enterica em Kinosternon scorpioides scorpioides (Linnaeus, 1766) de
vida livre / Pâmela Talita de Aguiar e Silva. - 2019.
35 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Campus
Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb
Coorientador: Profa. Dra. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro.

1. Ilha de Marajó. 2. muçã. 3. salmonelose. I. Casseb, Alexandre do Rosário, *orient.* II. Título

CDD 614.098115

TERMO DE APROVAÇÃO

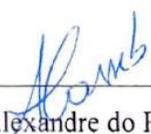
PÂMELA TALITA DE AGUIAR E SILVA

DETECÇÃO DE *Salmonella enterica enterica* EM *Kinosternon scorpioides scorpioides* (LINNAEUS, 1766) DE VIDA LIVRE

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

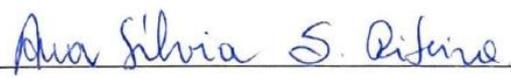
Aprovado em: 18 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

Orientador- Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)



Prof. Dr^a. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro

Coorientadora – Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)



Prof. Dr^a. Conceição de Maria Vieira

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)



Dr^a. Livia Medeiros Neves Casseb

Instituto Evandro Chagas

Dedico este trabalho à minha família.

Muito obrigada por todo apoio.

RESUMO

A bactéria do gênero *Salmonella* é responsável por causar a salmonelose, doença zoonótica relacionada ao consumo de alimentos mal cozidos, principalmente ovos, carne de aves, carne bovina, além de leite e derivados. Ademais da alimentação comercial, os seres humanos alimentam-se de outros animais, dentre eles, os répteis. A carne do muçuã é considerada uma iguaria que frequentemente é servida em sua própria carapaça em alguns restaurantes brasileiros, embora a caça seja proibida, o animal é servido de forma clandestina como prato na culinária local. Esse prato é conhecido regionalmente como “casquinho de muçuã”. Visando o potencial zoonótico da *Salmonella* e o consumo de carne de muçuã, o objetivo do estudo foi realizar a detecção molecular de *Salmonella* em fezes de muçuãs provenientes da Ilha de Marajó. As amostras analisadas foram provenientes de vinte muçuãs capturados no município de Cachoeira do Arari, na Ilha de Marajó. Das amostras de fezes retiradas do intestino, 10% (2/20) apresentaram positividade para a detecção de *Salmonella enterica enterica*, sendo elas provenientes do intestino grosso. Os quelônios possuem esse agente presente na sua microbiota natural e podem liberá-lo de forma intermitente. Esses animais podem apresentar positividade para *Salmonella* sem que necessariamente esteja com um quadro infeccioso de Salmonelose apresentando risco para a saúde humana. A detecção de *Salmonella* em muçuã de vida livre indica a ocorrência do patógeno em animais dessa espécie na região da Ilha de Marajó, sugerindo o risco de infecção em humanos, seja a partir do hábito de consumo do animal ou pela criação como animal de estimação ou até mesmo de forma indireta por meio de fômites.

Palavras-chave: Ilha de Marajó, muçuã, salmonelose

ABSTRACT

The bacterium of the genus *Salmonella* is responsible for causing salmonellosis, a zoonotic disease related to the consumption of undercooked foods, especially eggs, poultry meat, beef, as well as milk and dairy products. In addition to commercial food, humans feed on other animals, including reptiles. Scorpion mud turtle meat is considered a delicacy, that is often served in its own carapace in some Brazilian restaurants, although hunting is prohibited, the animal is clandestinely served as a dish in local cuisine. This dish is known regionally as “casquinho de muçuã”. Aiming at the zoonotic potential of *Salmonella* and the consumption of scorpion mud turtle meat, the aim of this study was to perform the molecular detection of *Salmonella* in scorpion mud turtle feces from Marajó Island. The samples analyzed came from twenty scorpion mud turtles captured in Cachoeira do Arari, Marajó Island. Of the fecal samples taken from the intestine, 10% (2/20) were positive for the detection of *Salmonella enterica enterica* from the large intestine. Chelonians have this agent present in their natural microbiota and can release it intermittently. These animals may be positive for *Salmonella* without necessarily having an infectious picture of salmonellosis presenting a risk to human health. The detection of *Salmonella* in wild life scorpion mud turtle indicates the occurrence of the pathogen in animals of this species in the region of Marajó Island, suggesting the risk of infection in humans, either from the consumption of the animal or by raising as a pet or even indirectly by means of fomites.

Keywords: Marajó Island, scorpion mud turtle, salmonellosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Kinosternon scorpioides scorpioides* apresentando estrutura cornificada na ponta da cauda, semelhante a um espinho. Nota-se que o macho apresenta a cauda mais longa que a fêmea..... 12
- Figura 2.** Quilhas longitudinais (ponta da seta) na carapaça de *Kinosternon scorpioides scorpioides*..... 13
- Figura 3.** Macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Kinosternon scorpioides scorpioides*, apresentando dimorfismo sexual a partir da diferença da coloração da cabeça. 14
- Figura 4.** “Casquinho de muçuã”..... 19
- Figura 5.** Mapa dos pontos de coleta dos muçuãs (*Kinosternon scorpioides scorpioides*) no município de Cachoeira do Arari..... 23
- Figura 6.** Intestino de *Kinosternon scorpioides scorpioides*, após a realização do abate. À esquerda (estrela) porção do intestino grosso apresentando parasita intestinal e à direita (seta) porção do intestino delgado apresentando conteúdo fecal. 24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1. <i>Kinosternon scorpioides scorpioides</i>	12
3.2. <i>Salmonella</i>	15
3.3. Consumo de quelônios e o risco de infecção por <i>Salmonella</i>	18
4. METODOLOGIA	22
4.1. Local e período de realização do projeto	22
4.2. Amostras utilizadas	22
4.3. Isolamento em meio de cultura.....	24
4.4. Extração de DNA	24
4.5. Execução da técnica de PCR	25
4.6. Purificação, quantificação e sequenciamento de DNA	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO

A bactéria do gênero *Salmonella* é responsável por causar a salmonelose, doença zoonótica relacionada ao consumo de alimentos mal cozidos, principalmente ovos, carne de aves, carne bovina, além de leite e derivados (BRITO, 2010).

Ademais da alimentação comercial, os seres humanos alimentam-se de outros animais, dentre eles, os répteis, em que várias espécies são consumidas. Nesse consumo estão incluídos os quelônios como, as tartarugas de água doce e ribeirinhas, além de tartarugas marinhas e terrestres, sendo dessas últimas consumidos carnes e ovos e somente carne, respectivamente (KLEMENS; THORBJARNASON, 1994).

Os casos de salmonelose associada a répteis são um problema de saúde pública que não foi solucionado, sendo esta a zoonose mais comumente relacionada a este tipo de animal (BRAUN *et al.*, 2015). Os casos ocorrentes nos Estados Unidos, descritos por Cohen *et al* (1980), atingiram em sua maior parte crianças, que por meio do contato direto com o animal infectado por *Salmonella* ou com a água que esses animais tinham contato adquiriram a infecção.

As possíveis vias de transmissão são as mãos contaminadas com excretas dos animais ou a partir da preparação dos alimentos em pias ou cozinhas contaminadas com resíduos dos aquários dos animais (BRAUN *et al.*, 2015).

O diagnóstico padrão é baseado em métodos de cultivo, bioquímicos e sorológicos, porém estes não são tão efetivos quanto a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), método de possui alta especificidade e sensibilidade, além de ser realizada em menor tempo, em comparação as técnicas padrões (AMINI *et al.*, 2010; ROCHA-e-SILVA *et al.*, 2014).

A bactéria do gênero *Salmonella* possui genes cromossômicos de virulência como o *invA*, *iroB*, *invE* e *slyA*, além de genes fimbriais e plasmidiais. O método de amplificação do gene *invA* (gene de invasão do gênero *Salmonella*) é preconizado internacionalmente como o procedimento padrão para a detecção da bactéria do gênero *Salmonella*, mostrando a importância da rápida identificação dos sorovares de *Salmonella* (AMINI *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a detecção de *Salmonella* em fezes de muçuã (*Kinosternon scorpioides scorpioides*) provenientes da Ilha de Marajó, visando o potencial zoonótico da bactéria em questão.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Detectar a presença de *Salmonella* em fezes de muçuã;
- 2) Demonstrar a importância da detecção de *Salmonella* em fezes de muçuã para a saúde pública.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. *Kinosternon scorpioides scorpioides*

O *Kinosternon scorpioides* é pertencente a ordem Testudines, subordem Cryptodira e a família Kinosternidae. Possui comportamento semiaquático, com a presença de membranas interdigitais em suas patas e seu porte varia de pequeno à médio (ARAGÃO *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2019). Os indivíduos desta família são reconhecidos como tartarugas da lama ou almiscarada, sendo caracterizados por secretarem mal odor e serem discretos (IVERSON *et al.*, 2013).

O nome *scorpioides* é derivado do latim *escorpio*, Linnaeus deu o nome ao animal devido a presença de um espinho presente na ponta de sua cauda, semelhantemente ao escorpião (figura 1) (BERRY; IVERSON, 2001). A combinação do uso do nome *Kinosternon scorpioides scorpioides* foi realizado pela primeira vez por Gorzula e Señaris (1999) (UETZ; HOŠEK, 2019).

Figura 1. Macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Kinosternon scorpioides scorpioides* apresentando estrutura cornificada na ponta da cauda, semelhante a um espinho. Nota-se que o macho apresenta a cauda mais longa que a fêmea.



Fonte: Andréa Bezerra

O *K. scorpioides* é considerado o maior animal dentro do gênero, podendo medir até 27 cm, embora seja raro encontrar animais que cheguem a esse tamanho. A coloração de sua carapaça varia de café-amarelado a café escuro e o plastrão quase sempre possui cor amarelo-laranja (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007).

A espécie se caracteriza por três apresentar três quilhas longitudinais na carapaça (figura 2) que é composta por 36 escudos. Seu plastrão é largo e ligado a carapaça através de pontes que também são largas, estas são formadas pelos escudos axilar, nas porções anterior, inguinal e posterior (BEZERRA, 2019).

Figura 2. Quilhas longitudinais (ponta da seta) na carapaça de *Kinosternon scorpioides scorpioides*



Fonte: Andréa Bezerra

O dimorfismo sexual do *K. scorpioides* é classificado, a partir de características físicas. Os machos da espécie possuem a cabeça maior, assim como a cauda, além de apresentarem uma concavidade no plastrão para a proteção (MESÉN; MÁRQUEZ, 1993; MONTES-CORREA *et al.*, 2017). Embora haja várias tonalidades na cor da cabeça desses animais, os machos a apresentam bastante pigmentada, podendo chegar a ser preta, enquanto as fêmeas apresentam coloração clara (figura 3). Porém há diferença no peso desses animais, sendo as fêmeas mais pesadas que os machos (CASTRO, 2006).

Figura 3. Macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Kinosternon scorpioides scorpioides*, apresentando dimorfismo sexual a partir da diferença da coloração da cabeça.



Fonte: Andréa Bezerra

Sua aptidão alimentar é onívora, se alimentando de peixes, anfíbios, insetos, algas, restos vegetais, crustáceos e gastrópodes (ARAGÃO *et al.*, 2018). A dieta desses animais pode variar de acordo com o sexo e a idade, sendo os adultos classificados como herbívoros e carnívoros oportunistas e os jovens como carnívoros, principalmente durante o primeiro ano de vida do animal (ARAÚJO, 2009).

O muçã também apresenta hábito de cleptoparasitismo, caracterizado por se alimentar de toda matéria morta encontrada em decomposição no ambiente em que vive, evitando desse modo a impurificação de lagos e charcos, esse comportamento é observado tanto na ocorrência de escassez de alimento quanto na fartura dos mesmos (ARAÚJO, 2009).

Estes animais possuem ampla tolerância ecológica, sendo capazes de habitar ambientes de água corrente ou parada com baixa taxa de oxigênio. Em períodos de seca, procuram ambientes úmidos para habitar, podendo se enterrar no barro até a chegada do período das chuvas, somente após o início desse período saem em busca de terra firme (VOGT *et al.*, 2015).

O *K. s. scorpioides* (Linnaeus, 1766) habita regiões que vão desde o Panamá até o norte da América do Sul e da bacia Amazônica ao Norte da Argentina, sendo a única espécie com distribuição sul-americana (BERRY; IVERSON, 2011; VIANA *et al.*, 2015). No Brasil, esse animal habita locais alagados e não possui hábito migratório, sendo a maior ocorrência na Ilha de Marajó (VANZOLINI *et al.*, 1980 apud SILVA *et al.*, 2011). É conhecido em algumas partes do Brasil como muçã ou jurará (VOGT *et al.*, 2015).

Sua caça ocorre a partir do uso do fogo que é colocado na palha e em seguida próximo aos ninhos, fazendo com que os animais fujam, facilitando a captura desses animais (CASTRO, 2006). Segundo Pereira e Sousa (2004 apud ARAÚJO, 2009) essa captura ocorre principalmente no período de estiagem e a maioria dos animais capturados são utilizados para consumo próprio, demonstrando a importância do animal no cardápio das pessoas que realizam essa prática.

3.2. *Salmonella*

A bactéria do gênero *Salmonella* é um bastonete gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, as bactérias desse gênero geralmente são móveis. Bioquimicamente apresenta resultado da oxidase negativa, utiliza o citrato como sua única fonte de carbono, reduz nitrato a nitrito, é fermentadora de glicose, além de ser produtora de ácido sulfídrico e gás (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006; MARQUES, 2011).

O gênero é subdividido em duas espécies, *Salmonella bongori* e *S. enterica*. Esta última é subdividida em seis subespécies, são elas: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica* (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006; RAMOS; NEGRÃO, 2017). Há também a classificação de acordo com sua estrutura antigênica, sendo determinadas pelos antígenos somáticos (O), o antígeno capsular de virulência (Vi) e as estruturas flagelares (H) (LOUREIRO *et al.*, 2010).

Molecularmente a bactéria apresenta diversos genes de virulência, estes auxiliam na expressão da virulência dos organismos que entram em contato com o hospedeiro, dentre eles estão: *invA*, *sitC*, *spvA*, *spvB* e *spvC* que são utilizados para detectar genótipos de virulência em amostras ambientais e de alimentos. O gene *invA* é responsável por proporcionar que a *Salmonella* invada o tecido epitelial do intestino. Há também outros genes associados a adesão e invasão celular (*viz.*, *sef*, *pef* e *inv*) e outros que são responsáveis por manter o patógeno sobrevivendo no hospedeiro (*mgtC*) ou manifestando a real patogenicidade do microrganismo (*viz.*, *sop*) (SMITH *et al.*, 2015; DAS *et al.*, 2019).

O gênero *Salmonella* possui mais de 2600 sorovares, porém apenas alguns estão associados a surtos ou infecções esporádicas de salmonelose (FARIAS *et al.*, 2015). Alguns sorovares de *Salmonella* são espécie específicos, como a *Salmonella* Typhi e *S. Paratyphi* que acomete exclusivamente humanos, causando as doenças conhecidas como febre tifoide e paratifoide, já os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Abortusovis* acometem somente os animais e as

S. Typhimurium e *S. Enteritidis* são responsáveis por provocar gastroenterites em humanos e animais (MARQUES, 2011).

A *S. enterica enterica* habita o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, enquanto *S. bongori* é comensal dos intestinos de animais de sangue frio e raramente está associada a infecções em seres humanos (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006).

O quadro infeccioso provocado pela *Salmonella* é chamado salmonelose. Esta é uma doença de caráter infectocontagioso que tem distribuição mundial e possui como principais formas de transmissão a inalação do material fecal e a ingestão de alimentos contaminados (RAMOS; NEGRÃO, 2017). A bactéria pode estar presente na microbiota de animais domésticos e silvestres, com a presença ou não de sintomatologia. A eliminação do patógeno pode ocorrer de forma intermitente (RIBEIRO *et al.*, 2010).

A maioria das infecções por *Salmonella* estão restritas ao aparecimento de gastroenterites. A bactéria pode se propagar por meio de água, bem como por alimentos contaminados que ricos em nutrientes que favorecem o crescimento do patógeno. A infecção de animais e a contaminação de alimentos que pode ocorrer a partir do contato com fezes contaminadas (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006).

A ocorrência de salmonelose em humanos pode se dar, pelo contato com as fezes dos répteis, mas essa bactéria pode ser transmitida a partir do contato manual com animais e utensílios contaminados, outra forma de transmissão ocorre pelo contato com vestimentas contaminadas que estiverem em contato com animais contaminados ou por meio de mordidas e arranhões (LUKAC, PEDERSEN e PRUKNER-RADOVICIC, 2015).

Na transmissão fecal-oral, a bactéria invade o epitélio intestinal e os macrófagos, dessa forma ele irá se replicar nessas células e se disseminar no corpo do indivíduo acometido. O patógeno que se replica no fígado, atravessa a vesícula biliar até chegar ao intestino e assim nas fezes (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006).

Alguns dos sinais clínicos apresentados por pessoas infectadas pela bactéria do gênero *Salmonella* são: sonolência, fraqueza, anorexia, desidratação, flacidez da pele, gastroenterite, e em casos mais graves pode ocasionar doença septicêmica severa e até mesmo a morte (RAMOS; NEGRÃO, 2017). Quanto aos répteis, a bactéria pode não provocar a doença, porém nos casos em que isso ocorre o animal pode apresentar septicemia, pneumonia, abscessos, granulomas, choque hipovolêmicos, osteomielite e morte (EBANI *et al.*, 2017).

Os sintomas da doença em répteis podem aparecer após fatores como, o transporte, privação de alimento, lotação excessiva do recinto, exposição ao frio ocorrência de doenças virais ou parasitárias, mudança brusca na alimentação ou se ocorrer de forma exagerada e

rapidamente. Em tartarugas de vida livre, podem aparecer sinais de emaciação, lesões no plastrão, descoloração da carapaça, além de lesões intestinais, respiratórias e hepáticas (CFSPH, 2013).

A excreção da bactéria, seja por répteis de cativeiro ou de vida livre, possui determinada importância para a saúde pública, visto que geralmente as cepas são resistentes a antibióticos, principalmente àqueles utilizados no tratamento habitual ao combate à doença, como, as cefalosporinas, penicilinas e sulfa-trimetoprim (EBANI *et al.*, 2017).

O diagnóstico de *Salmonella* é realizado a partir do isolamento da bactéria das fezes e em casos da disseminação do patógeno na corrente sanguínea, realiza-se a solicitação da hemocultura. Para a execução do processo podem ser utilizados meios de cultura como: ágar MacConkey, ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), ágar Bismuto Sulfito, ágar Salmonella-Shigella e o ágar verde brilhante. Outro método que também pode promover o maior isolamento do microrganismo é o uso de caldos de enriquecimento. Alguns testes sorológicos podem realizar a detecção de um limitado número de sorovares. Testes como a PCR, e outros testes moleculares são avaliáveis para o diagnóstico da doença (CFSPH, 2013).

Algumas medidas preventivas são indicadas para que seja evitada a ocorrência de salmonelose em seres humanos, dentre elas estão: lavar as mãos após o contato com répteis ou os objetos pertencentes a eles, trocar as roupas após o manejo do animal, principalmente se haverá contato com crianças após isso; não comer, beber ou fumar no mesmo ambiente que o animal; pessoas com sistema imunológico comprometido devem evitar contato com répteis (CFSPH, 2013).

Nos anos de 2015 e 2016, nos Estados Unidos, mais de 202 pessoas foram infectadas por *Salmonella* devido ao contato com pequenas tartarugas de estimação e cerca de 41% dos pacientes atendidos foram crianças menores de 5 anos (CDC, 2019). Muitos casos de salmonelose estão associados ao contato com répteis criados em ambiente doméstico. Na Europa, para que haja o controle da doença os animais são monitorados e é verificado qual sorovar pode estar presente na microbiota fecal dos indivíduos (LUKAC, PEDERSEN e PRUKNER-RADOVICIC, 2015).

3.3. Consumo de quelônios e o risco de infecção por *Salmonella*

A carne de répteis é servida como uma importante fonte de proteínas para os seres humanos ao redor do mundo, tanto para populações rurais como para urbanas. Todos os répteis são bastante explorados quando se trata de consumo humano, sendo esse consumo associado principalmente a cultura e a crenças medicinais (KLEMENS; THORBJARNARSON, 1994; RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007).

Desde a antiguidade os quelônios vêm sendo explorados, sendo utilizada tanto a sua carne, quanto seus ovos, gordura e vísceras (ARAÚJO *et al.*, 2012). Dentre as tartarugas mais consumidas do ambiente marinho, estão: a tartaruga-marinha-australiana (*Natator depressa*), a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*), a tartaruga-comum (*Caretta caretta*) e a tartaruga-oliva (*Lepidochelys olivacea*), destas tanto a sua carne quanto seus ovos são utilizados para consumo. Quanto aos quelônios terrestres, os mais consumidos nas florestas e savanas da América do Sul são o jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) e jabuti-tinga (*C. denticulata*) (KLEMENS; THORBJARNARSON, 1994).

Na região Amazônica, o consumo de quelônios é uma maneira de obtenção de carne e proteína pelas comunidades tradicionais como forma de subsistência. As tartarugas marinhas são animais que possuem essa finalidade em muitas tribos indígenas (BEZERRA, 2019). Em regiões da América do Norte, países da África e continente Asiático, esse consumo também é realizado, dentre os espécimes que servem como fonte de alimento está a tartaruga-de-casco-mole (*Pelodiscus sinensis japonicus*) (KLEMENS; THORBJARNARSON, 1994).

Além dos perigos naturais, também há o fator humano que implica na caça desses animais, muitos filhotes de tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) que escapavam dos ninhos, anos mais tarde eram capturados para serem consumidos. Na década de 1960, as espécies *P. expansa* e *P. unifilis*, foram exploradas também para a entrada no mercado pet nos Estados Unidos (MITTERMEIER, 1978).

As tartarugas adultas são importantes fontes de recursos alimentares, uma fêmea de *P. expansa* provê cerca de quatro a sete quilos de carne, o suficiente para alimentar uma família por alguns dias (MITTERMEIER, 1978). Klemens e Thorbjarnarson (1994) relatam que as tartarugas de rio, *P. expansa* e *P. unifilis*, foram exploradas em larga escala na América do Sul, sendo necessária maior atenção nessas espécies devido ao risco de extinção dessas tartarugas.

Nos estados do Pará e Maranhão, uma espécie que serve como forma de alimento nas comunidades ribeirinhas é o muçã. A busca por esse tipo de alimento se dá quando a aquisição de proteínas provenientes do peixe, carne bovina ou de aves é escassa ou quando há necessidade

de diversificar a alimentação (ALMEIDA, 2015; VOGT *et al.*, 2015; BRITO, LIMA e ROSA, 2016; CRISTO *et al.*, 2017).

A carne do muçã é considerada uma iguaria, e frequentemente é servida em sua própria carapaça em alguns restaurantes brasileiros, embora a caça seja proibida, o animal é servido de forma clandestina como prato na culinária local. Esse prato é conhecido regionalmente como “casquinho de muçã” (figura 4) (ROCHA; MOLINA, 1990; CASTRO, 2006; ARAGÃO *et al.*, 2018). Na costa Atlântica do Brasil é uma carne bastante apreciada e procurada para consumo, é vendida nos restaurantes como caranguejo recheado (RUEDA-ALMONACID *et al.*, 2007).

Figura 4. “Casquinho de muçã”



Fonte: Andréa Bezerra

A procedência da carne de quelônios geralmente é desconhecida, em um estudo realizado por Rebêlo e Pezzuti (2000) em Manaus, a população que consumia essa carne não conhecia a origem do produto e a aquisição era realizada em mercados de pescado por meio de parentes ou intemerdiários.

O isolamento de *Salmonella* em répteis já havia sido descrito em 1939, porém somente na década de 50, os primeiros casos de salmonelose humana começaram a ser descritas (SÁ; SOLARI, 2001). Os principais reservatórios de *Salmonella* são assintomáticos, sendo pertencentes a esse grupo os répteis que geralmente são subestimados, principalmente os de estimação. A espécie mais associada a esses casos é a tartaruga de orelha vermelha (*Trachemys scripta elegans*) (BRAUN *et al.*, 2015).

Alguns sorovares de *Salmonella* como o Abony, Newport, Paratyphi var. Java, Litchfield, Urbana, Stanley, Pomona e Poona foram descritos em casos de salmonelose humana a partir do contato com a tartaruga de orelha vermelha, porém os isolados variam desde a espécie de *S. bongori* as várias subespécies de *S. enterica* (BRAUN *et al.*, 2015; CORRENTE *et al.*, 2017).

A maioria dos tipos de *Salmonella* são adaptadas aos répteis, e podem causar infecção assintomática nesses animais e ocasionalmente doença e morte (CORRENTE *et al.*, 2017). Os répteis possuem a bactéria como parte de sua microbiota intestinal, eliminando o microrganismo de forma intermitente através das fezes (BRAUN *et al.*, 2015). Os répteis que convivem com outros animais da mesma espécie no mesmo recinto são mais suscetíveis a adquirirem a infecção por *Salmonella* diferentemente daqueles que vivem sozinhos no ambiente (CORRENTE *et al.*, 2017).

A infecção por salmonelose em humanos a partir do contato com tartarugas domesticadas existiu durante muito tempo, porém nos anos 60 os casos de salmonelose associada a esses animais tiveram impacto na saúde pública, pois ainda não havia sido bem esclarecida (COHEN *et al.*, 1980). A exposição a répteis provocou cerca de 70.000 casos de salmonelose em humanos nos Estados Unidos (MERMIN *et al.*, 2004).

Em um estudo clínico realizado na China, foi detectado *Salmonella* Pomona em tartarugas de orelhas vermelhas exóticas, mostrando que a cepa da bactéria apresenta risco para a saúde pública, pois apresenta alta patogenicidade e capacidade de transmissão para outros animais e humanos (GONG *et al.*, 2014). Nos Estados Unidos, o sorovar Kentucky tem sido emergente e apresentou significado para a saúde pública, pois foi descrito em diversas espécies de répteis (cobras, camaleões, lagartos), além da sua associação com o meio ambiente (FARIAS *et al.*, 2015).

O consumo de répteis é um meio que oferece risco a saúde de quem o faz, como a possibilidade de infecção por *Salmonella*, bem como outros agentes patogênicos. Cerca de 50% dos répteis possuem essa bactéria e seu trato gastrointestinal e são assintomáticos para salmonelose. Casos de salmonelose humana foram descritos no Japão a partir do consumo de vísceras e carne de tartaruga-de-casco-mole (KLEIN *et al.*, 2007; MAGNINO *et al.*, 2009).

Um surto de salmonelose, causado pela *Salmonella* Muenchen, foi descrito em pessoas da comunidade do Território Norte da Austrália em 2017. O caso ocorreu quando um grupo de pessoas ingeriu carne de uma tartaruga verde. O animal foi preparado em sua própria carapaça, durante o preparo foi observado que sua gordura e o fígado possuíam coloração escurecida antes do cozimento. Os órgãos e a carne foram ingeridos ainda não totalmente cozidas, dezesseis

peças se alimentaram desse conteúdo e o restante foi guardado e recozido para alimentar os outros familiares, todas as pessoas adoeceram (DRAPER *et al.*, 2017).

A tartaruga foi capturada enquanto realizava a desova, o que já era um fator de estresse que possivelmente proporcionou a liberação de *Salmonella* pelo animal, outro fator que colaborou para que o caso ocorresse foi o mal cozimento da carne e vísceras do animal, além da coloração alterada dos órgãos, o que evidenciava a doença no animal, e a má refrigeração da carne antes e após o consumo, afetando as pessoas que consumiram o animal (DRAPER *et al.*, 2017).

4. METODOLOGIA

4.1. Local e período de realização do projeto

As atividades foram realizadas nas dependências do Laboratório de Microbiologia e do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia do Instituto da Saúde e Produção Animal, na Universidade Federal da Amazônia, durante os anos de 2017 a 2019.

4.2. Amostras utilizadas

Todos os procedimentos atenderam as exigências éticas e científicas fundamentais contidas nas Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRA), sob protocolo número 012/2017 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob número 57885-2 pertencentes ao projeto “Morfologia digestória, composição química, rendimento de carcaça e sanidade de muçuãs (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766) de vida livre” (Anexo A).

As amostras analisadas foram provenientes de vinte muçuãs de vida livre capturados no município de Cachoeira do Arari, na Ilha de Marajó (figura 5), no mês de outubro de 2017, durante o período de seca. Para a captura foi utilizado o puçá, o transporte dos animais foi realizado na densidade de 1 animal por caixa de transporte (25x20x15 cm).

Figura 5. Mapa dos pontos de coleta dos muçuãs (*Kinosternon scorpioides scorpioides*) no município de Cachoeira do Arari.



Legenda: pino amarelo - Fazenda Arari; pino vermelho – Fazenda Guajarás

Fonte: Arquivo pessoal

Para a obtenção das fezes, os animais foram submetidos à insensibilização que consistiu em colocar os indivíduos em um recipiente com água e pedaços de gelo a uma temperatura de 5°C e deixá-los nesse ambiente durante 45 minutos e posteriormente submetidos ao abate de acordo com os procedimentos adotados por Silva Neto (1998) para a Tartaruga da Amazônia, do qual foi realizada a secção da cabeça. Em sequência o plastrão foi separado da carapaça nas pontas com auxílio de uma serra giratória elétrica. Após a abertura, o sistema digestório do animal foi completamente retirado e foram coletadas 20 amostras de fezes, do intestino grosso e delgado (figura 6).

Figura 6. Intestino de *Kinosternon scorpioides scorpioides*, após a realização do abate. À esquerda (estrela) porção do intestino grosso apresentando parasita intestinal e à direita (seta) porção do intestino delgado apresentando conteúdo fecal.



Fonte: Andréa Bezerra

4.3. Isolamento em meio de cultura

As fezes retiradas diretamente do intestino delgado e grosso foram inoculadas separadamente em placas com ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C, para observação do crescimento bacteriano.

Após o crescimento e a leitura das placas, um *pool* de colônias de cada amostra foi inoculado em 1 mL de caldo Mueller-Hinton em duplicata e incubados durante 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica, após o período de incubação as amostras foram acondicionadas em *ultrafreezer* a -80°C.

4.4. Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada por meio da técnica de digestão por proteinase K seguida por fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), a partir de um *pool* de colônias bacterianas, obtidas a partir da inoculação em meio de cultura. O DNA extraído foi acondicionado a -20°C até a realização da PCR.

4.5. Execução da técnica de PCR

Os oligonucleotídeos utilizados, assim como o processo de amplificação, tiveram como base o estudo realizado por Rahn *et al* (1992) (quadro 1). A amplificação foi realizada no aparelho BioRad CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®) e seguiu o protocolo de temperaturas de 94°C durante 5 minutos, 94°C durante 1 minuto, 59°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, totalizando 35 ciclos e extensão final a 72°C durante 7 minutos. A visualização das bandas foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com SYBR® Safe Gel Stain (Invitrogen®).

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para detecção de *Salmonella* spp.

Patógeno	Gene Alvo	Sequência (5'-3')	Produto Amplificado	Referência
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	SalF: GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA SalR: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284 pb	Rahn <i>et al</i> (1992)

4.6. Purificação, quantificação e sequenciamento de DNA

As amostras positivas para a bactéria do gênero *Salmonella* foram encaminhadas para o laboratório Myleus Facility (Myleus Facility, Minas Gerais, Brasil), onde foram purificadas (enzima de purificação ExoSAP-IT™), quantificadas (equipamento Qubit e kit dsDNA BR) e sequenciadas pelo método de Sanger (equipamento ABI3730, kit de sequenciamento BigDye V3.1).

A qualidade das sequências geradas foi analisada em software (Sequence Analysis v6), assim como a montagem dos *contigs* (SeqScape™ v3.0). A identificação dos *contigs* foi realizada por meio de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) em seus parâmetros padrões.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de fezes retiradas do intestino, 10% (2/20) apresentaram positividade para a detecção de *Salmonella enterica enterica*, sendo elas provenientes do intestino grosso. Não houve positividade nas amostras de fezes do intestino delgado, mas sabe-se que répteis são portadores naturais desse microrganismo, e que a liberação de bactérias do gênero *Salmonella* pode ocorrer de forma intermitente, sendo o estresse um fator que influencia na maior liberação da bactéria (MERMIN *et al.*, 2004; EBANI; FRATINI, 2005; LOPES, 2008).

A baixa prevalência de *Salmonella* em répteis, também foi encontrada por Lukac, Pedersen e Prukner-Radovic (2015), que realizaram um estudo em animais de cativeiro. Os autores afirmam que isso pode ocorrer devido à alta variabilidade nas formas de liberação desse patógeno, considerando que a liberação pode ocorrer de forma intermitente, ou seja, resultados negativos não implicam na ausência da bactéria no animal.

Oliveira (2013) realizou o diagnóstico de *Salmonella* utilizando a técnica de isolamento bacteriano em cágados-de-barbicha (*Phrynops geoffroanus*) e também encontrou baixa prevalência do patógeno nos animais, com somente 16,6% (5/30), dos quais foram isolados os sorotipos *S. Tennessee*, *S. Mbandaka* e *S. Oranienburg*. Almeida (2015) utilizou a mesma técnica obtendo o isolamento de *Salmonella* a partir de suabes cloacais de muçãs e teve como resultado 9,8% (5/66) de positividade para a bactéria.

Back *et al* (2016) analisaram amostras de diversas espécies de quelônios (*Ocadia sinensis*, *Trachemys scripta scripta*, *Pseudemys concinna concinna*, *Pelodiscus maackii*, *Chrysemys picta belli* e *Sternotherus odoratus*) criadas em cativeiro para a pesquisa de *Salmonella* spp. pelo método microbiológico e molecular. Nos *Sternotherus odoratus*, que são pertencentes a família Kinosternidae, não foi detectada a presença do patógeno por nenhum dos métodos, porém os outros quelônios que apresentaram positividade para a bactéria, estavam infectados por *Salmonella enterica*, tendo diagnóstico confirmado por sequenciamento a partir de 16S RNA.

Outros autores também realizaram estudos em animais da família Kinosternidae, dentre eles Lopes (2008) realizou a análise de suabes cloacais de 200 répteis de cativeiro e encontrou positividade em 35,5% (71/200) das amostras, porém para os animais que faziam parte da família Kinosternidae (*Kinosternon scorpioides*) somente um apresentou positividade para *Salmonella enterica houtenae*.

Já no estudo de Duque e Giraldo (2008), foram utilizadas amostras de fezes de 110 quelônios semiaquáticos na Colômbia, os autores obtiveram 34,5% (38/100) de positividade

para *Salmonella enterica* das amostras que foram analisadas. Das 38 amostras positivas, 20 delas eram pertencentes a espécie *Kinosternon dunni*, correspondendo a 52,6% (20/38) das amostras.

Quanto aos quelônios de vida livre, a infecção por *Salmonella* tem sido pouco descrita. Morais *et al* (2011) encontraram somente um caso da detecção de *Salmonella* em *P. expansa* e *P. unifilis* de vida livre, esse fato pode ocorrer, pois em vida livre os animais sofrem menos estresse quando comparados aos animais de cativeiro, podendo proporcionar a menor liberação do agente animal (SAELINGER *et al.*, 2006). Fator que pode justificar a baixa prevalência da detecção do patógeno neste estudo.

Marin *et al* (2013) em um estudo realizado na Espanha identificaram prevalência de 11% de *Salmonella* spp. em tartarugas de vida livre, entre espécies exóticas e nativas. Já Gaviria *et al* (2018) realizou um estudo em Urubá, Colômbia, em espécies de cágados de cativeiro (55 animais) e vida livre (50 animais), dentre elas: *Trachemys venusta*, *Rhinoclemmys melanosterna* e *Kinosternon leucostomum*. A partir da análise das amostras e constatou baixa prevalência em animais de cativeiro [1,9% (2/105)] da espécie (*Rhinoclemmys melanosterna*) e a ausência de detecção de *Salmonella* nos animais de vida livre.

O contato com quelônios pode ocorrer por meio do consumo ou da utilização desse animal como pet exótico, mesmo que esses indivíduos eliminem pequenas quantidades da bactéria, ainda há um risco de infecção para os humanos por serem potenciais reservatórios, já que há possibilidade da liberação de sorotipos patogênicos (DUQUE; GIRALDO, 2008; GAVIRIA *et al.*, 2018).

Esse risco de infecção para o homem foi demonstrado por Cohen *et al* (1980) quando realizaram um estudo nos Estados Unidos e comprovaram que a maioria dos casos de salmonelose nas crianças sujeitadas a pesquisa, ocorreram devido a sua proximidade com os animais que também eram acometidos pela enfermidade, circunstância corroborada também por Harris *et al* (2010), que afirmaram que cerca de 6% das infecções por *Salmonella* em humanos, ocorrem em virtude do contato direto ou indireto com répteis.

O consumo de quelônios ocorre em diversas partes do mundo, como nos Estados Unidos, na Índia, em países do continente Asiático e regiões da Amazônia. As comunidades Aborígenes também costumam se alimentar de quelônios, pois a legislação permite que a caça seja realizada (DRAPER *et al.*, 2017; SHERWOOD, 2017). Na China, um quelônio bastante consumido é a tartaruga-de-casco-mole, cerca de 91 milhões de tartarugas dessa espécie são produzidas para o consumo humano por ano (ZHANG *et al.*, 2016).

O contato com o muçã é bastante realizado pelas comunidades ribeirinhas e urbanas, pois este possui uma boa qualidade de carne, além disso outros subprodutos desse animal pode ser obtidos (CASTRO, 2006), porém já que os quelônios de forma geral possuem esses agentes na sua microbiota natural e pode liberá-lo de forma intermitente, esses animais podem apresentar positividade para *Salmonella* sem que necessariamente esteja com um quadro infeccioso de salmonelose, apresentando risco para a saúde humana, em virtude da possibilidade de liberação de cepas patogênicas (GAVIRIA *et al.*, 2018).

Dessa forma, mesmo que neste estudo tenha-se encontrado baixa prevalência, deve-se ficar atento tanto ao contato direto quanto ao contato indireto com esses animais, visto que em algumas regiões, os quelônios são consumidos, como por exemplo, pelos ribeirinhos localizados na Ilha de Marajó e também em outras regiões do Estado do Pará, além da escassez na pesquisa de *Salmonella* em muçãs da região.

6. CONCLUSÃO

A detecção de *Salmonella* em muçã de vida livre indica a ocorrência do patógeno em animais dessa espécie na região da Ilha de Marajó, sugerindo o risco de infecção em humanos, seja a partir do hábito de consumo do animal ou pela criação como animal de estimação ou até mesmo de forma indireta por meio de fômites.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. S. **Determinação de microrganismos presentes em muçã (*Kinosternon scorpioides*) mantidos em cativeiro.** 2015. 8f. Relatório. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica. Universidade Federal do Pará, Belém.
- AMINI, K. *et al.* Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research.** v. 4, n. 21, p. 2202-2210, 2010.
- ARAGÃO *et al.* Práticas de educação ambiental de jovens e adultos para a conservação de jurará (*Kinosternon scorpioides*) no município de Anatajuba – Baixada Maranhense. **Revista Práticas de Extensão.** São Luís, v. 02, nº 01, p. 08-23, 2018.
- ARAÚJO, J. C. *et al.* Effect of three feeding management systems on some reproductive parameters of scorpion mud turtles (*Kinosternon scorpioides*) in Brazil. **Tropical Animal Health Production,** v. 45, p. 729-735. 2012. DOI: 10.1007/s11250-012-0281-3.
- ARAÚJO, J. C. **Parâmetros produtivos e qualidade de ovos de muçãs (*Kinosternon scorpioides*) submetidos a manejo alimentar diferenciado.** 2009. 111 f. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Área de Concentração: nutrição de monogástricos. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.
- BACK, D. *et al.* Prevalence of *Salmonella* spp. in pet turtles and their environment. **Laboratory Animal Research,** v. 32, n. 3, p. 166-170, 2016.
- BERRY, J. F. e IVERSON J. B. Catalogue of American Amphibians and Reptiles: *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus) – Scorpion Mud Turtle. **Society for the Study of Amphibians and Reptiles.** 2001.
- BERRY, J. F. e IVERSON, J. B. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) – scorpion mud turtle. In: RHODIN, A. G. J., PRITCHARD, P. C. H., Van DIJK, P.P., SAUMURE, R.A., BERRY, J.F., IVERSON, J.B. *Kinosternon scorpioides*. **Chelonian Research Foundation,** 5: 063.1-063.15. 2011.
- BEZERRA, A. M. **Morfologia da Cavidade Orofaríngea e Glândula de Cheiro do Muçã (*Kinosternon scorpioides scorpioides* Linnaeus, 1766) de vida livre.** 2019. 112 f. Tese de Doutorado em Saúde e Produção Animal. Área de Concentração: Saúde Animal – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
- BRAUN, S. *et al.* Gastroenteritis por *Salmonella* spp. en tres lactantes asociada a contacto con tortugas acuáticas. **Revista chilena de infectología,** v. 32, n. 3, p. 334-338, 2015.
- BRITO, N. P. M. **Caracterização genética de *Salmonella enterica* sorovar Panama de origem ambiental, humana, animal e alimento, no Estado do Pará.** 2010. 112 f. Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Área de concentração: Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
- BRITO, T. P.; LIMA, E. B. S.; ROSA, J. C. G. S. Avaliação do Consumo de Quelônios no Município de Castanhal – Pará – Brasil. **Revista Ouricuri,** v. 06, n.1, p. 71-103, 2016.

CASTRO, A. B. **Biologia reprodutiva e crescimento do muçã *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1776) em cativeiro.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Pará, Brasil. doi: repositório.ufpa.br/jspui/handle/2011/5547 2006.

CENTER FOR FOOD SECURITY e PUBLIC HEALTH. **Reptile-Associated Salmonellosis.** Ficha Técnica. Janeiro, 2013. Disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/reptile_associated_salmonellosis.pdf. Acesso em: 03 nov. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Take Care with Pet Reptiles and Amphibians.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/salmonellafrogturtle/index.html>. Acesso em: 10 nov. 2019

COHEN, M. L. *et al.* Turtle-associated salmonellosis in the United States: effect of public health action, 1970 to 1976. **Jama**, v. 243, n. 12, p. 1247-1249, 1980.

CORRENTE, M. *et al.* Risk for zoonotic *Salmonella* transmission from pet reptiles: A survey on knowledge, attitudes and practices of reptile-owners related to reptile husbandry. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 73-78, 2017.

CRISTO, S. S. *et al.* A. The trade of *Kinosternon scorpioides* on Marajó island, Brazilian Amazon: from hunting to consumption. **Herpetological Journal**. v. 27, p. 361-367. 2017.

DAS, M. *et al.* Molecular Detection of Virulence Genes in *Salmonella* Serovars Isolated from Raw Pork of Aizawl and Imphal. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**. v. 8, n. 7, p. 23-31, 2019.

DRAPER, A. D. K. *et al.* An outbreak of *Salmonella* Muenchen after consuming sea turtle, Northern Territory, Australia, 2017. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 41, n. 4, p. E290-E294, 2017.

DUQUE, S. e GIRALDO, M. A. **Búsqueda de *Salmonella enterica* en tortugas semiacuáticas del Centro de Atención de Fauna Silvestre del Área Metropolitana.** Trabajo de investigación para optar al título de Médico veterinario – Zootecnista. Universidad CES, Medellín, 2008.

EBANI, V. V. e FRATINI, F. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. **Annali della Facoltà di Medicina veterinaria**, v. 58, p. 85-91, 2005.

EBANI, V. V. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: a mini review. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 8, p. 723-728, 2017.

ELLERMEIER, C. D. e SLAUCH, J. M. The genus *Salmonella*. In: **The prokaryotes**. Springer New York, p. 123-158. 2006.

FARIAS, L. F. P. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enterica* in captive wildlife and exotic animal species in Ohio, USA. **Zoonoses and public health**, v. 62, n. 6, p. 438-444, 2015.

GAVIRIA, M. P *et al.* Presence of *Salmonella* spp in captivity and wild river turtles in Urabá, Colombia. **Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v.13, n. 2, p. 111–120. 2018.

GONG, S. *et al.* Highly pathogenic *Salmonella* Pomona was first isolated from the exotic red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in the wild in China: Implications for public health. **Science of the Total Environment**, v. 468, p. 28-30, 2014.

HARRIS, J. R. *et al.* Recent multistate outbreaks of human *Salmonella* infections acquired from turtles: a continuing public health challenge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 4, p. 554-559, 2010.

IVERSON, J. B.; LE, M.; INGRAM, C. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 3, p. 929-939, 2013.

KLEIN, G. *et al.* Public health risks involved in the human consumption of reptile meat: Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. **EFSA Journal**, v. 5, n. 11, p. 578, 2007.

KLEMENS, M. W. e THORBJARNARSON, J. B. Reptiles as a food resource. **Biodiversity e Conservation**, v. 4, n. 3, p. 281-298, 1995.

LOPES, L. F. L. **Salmonella sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as consequências para o manejo em cativeiro e reintrodução.** Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LOUREIRO, E. C. B. *et al.* Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 1, p. 93-100, 2010.

LUKAC, M., PEDERSEN, K., e PRUKNER-RADOVICIC, E. Prevalence of *Salmonella* in Captive Reptiles from Croatia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 46, n. 2, p. 234–240. 2015. doi:10.1638/2014-0098r1.1.

MAGNINO, S. *et al.* Biological risks associated with consumption of reptile products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 134, n. 3, p. 163–175, 2009.

MARIN, C.*et al.* Free-Living turtles are a reservoir for *Salmonella* but not for *Campylobacter*. **PLOS One**, v. 8, n. 8, p. 1-6. 2013.

MARQUES, N. D. B. **Caracterização molecular e fenotípica de *Salmonella* Typhi isolada de casos de febre tifóide no Estado do Pará, no período de 1970 a 2009.** Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

MERMIN, J. *et al.* Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. Supplement_3, p. S253-S261, 2004.

MESÉN, R. A. A. e MÁRQUEZ, C. El dimorfismo sexual de *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) en Palo Verde, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 41, n. 2, p. 261-265, 1993.

MITTERMEIER, R. A. South America's river turtles: saving them by use. **Oryx**, v. 14, n. 3, p. 222-230, 1978.

MONTES-CORREA, A. C. *et al.* *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1776). **Catálogo de Anfíbios y Reptiles de Colombia**. v. 3, n. 1, p. 17-24. 2017.

MORAIS, P. B. *et al.* Enterobacteriaceae in mouth and cloaca of *Podocnemis expansa* and *P. unifilis* (Testudines: Chelonia) populations of National Park of Araguaia Plain, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 422, p. 526-530, 2011.

OLIVEIRA, J. P. **Detecção de *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. em *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha) em ambiente urbano**. Dissertação de Mestrado em Patologia Animal. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

RAHN, K., *et al.* Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and cellular probes**, v. 6, n. 4, p. 271-279. 1992.

RAMOS, B. A. e NEGRÃO, A. M. G. **Salmonelose em Pombos Domésticos do Mercado do Ver-o-Peso (Belém - PA): Uma breve revisão bibliográfica e estudo de caso**. 1º edição. Brasil: Editora Novas Edições Acadêmicas, 2017.

REBÊLO, G e PEZZUTI, J. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia: sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. **Ambiente e Sociedade**, São Paulo, v. 3, n. 6-7, p. 85-104, 2000.

RIBEIRO, M. G. *et al.* Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 155-160, 2010.

ROCHA, M. B. e MOLINA, F. B. Reproductive biology of *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) in captivity. **Tortoises and Turtles**, n. 5, p. 8, 1990.

ROCHA-e-SILVA, R. C. *et al.* O pombo (*Columba livia*) como agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 2, p. 189-194, 2014.

RUEDA-ALMONACID, J. V. *et al.* **Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del Trópico**. Conservación Internacional, Bogotá, Columbia, 538 p. 2007.

SÁ, I. V. A. e SOLARI, C. A. *Salmonella* in Brazilian and Imported Pet Reptiles. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, p. 293-297, 2001.

SAELINGER, C. A. *et al.* Prevalence of *Salmonella* spp in cloacal, fecal, and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 2, p. 266-268, 2006.

SAMBROOK, J. e RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª Edição. 2001. p. 2100. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SHERWOOD, N. R. **Risks associated with harvesting and human consumption two turtle species in New Jersey**. Dissertation of Doctor of Philosophy degree. Montclair State University, New Jersey. 2017.

SILVA NETO, P.B. **Abate de tartarugas-da-amazônia**. Relatório. São Paulo: Pró-Fauna Assessoria e Comércio Ltda., Convênio Empresa Pro-Fauna/Cenaqua-Ibama, 48p. 1998.

SILVA. C. S. *et al.* Variabilidade genética em muçua utilizando marcadores moleculares RAPD. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 54, n. 3, p. 307-313, 2011.

SMITH, S. I. *et al.* Molecular detection of some virulence genes in *Salmonella* spp isolated from food samples in Lagos, Nigeria. **Animal and Veterinary Sciences**. v. 3, n. 1, p. 22-27, 2015.

UETZ P. e HOŠEK J. The Reptile Database (version Dec 2015). In: ROSKOV Y., ORRELL, T., NICOLSON D., BAILLY N., KIRK P. M., BOURGOIN T., DEWALT, R. E., DECOCK W., De WEVER A., NIEUKERKEN E. van, ZARUCCHI J., PENEV L., eds. (2019). **Species 2000 e ITIS Catalogue of Life**, 2019 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405- 884X. 2019.

VIANA, D.C.; SANTOS, A.C; ANTUNES, R.L.S. New record of *Kinosternon scorpioides* in Brazil increases its geo distribution - Case report. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 4, p. 386-388. 2015.

VOGT, R. C. *et al.* 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. **ICMBio**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7407-repteis-kinosternon-scorpioides-mucua.html>. Acesso em 17 jan. 2019.

ZHANG, J.*et al.* Turtles as a possible reservoir of nontyphoidal *Salmonella* in Shanghai, China. **Foodborne Pathogens Disease**, n. 13, v. 8, p. 428-433. 2016.

ANEXOS

**ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DOS ANIMAIS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA (CEUA/UFRA)**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa, intitulado "Morfologia digestória, composição química, rendimento de carcaça e sanidade de muçuãs (*Kinosternon scorpioides* Linnaeus, 1766) de vida livre.", protocolo nº 012/2017 (CEUA) e 23084.006179/2017-88 (UFRA), sob a responsabilidade da professora Andréa Magalhaes Bezerra, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal Rural da Amazônia, em reunião de 30/03/2017.

Vigência da autorização	01 de maio de 2017 a 30 de dezembro de 2021
Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO	57885-1
Atividade(s)	Captura de espécimes e abate
Espécies/Grupos Taxonômicos	<i>Kinosternon scorpioides</i> - muçua.
Local(is) de realização das atividades	Arquipélago do Marajó, nos municípios de São Sebastião Da Boa Vista, Santa Cruz do Arari e Cachoeira do Arari

Belém, 04 de abril de 2017.

Profª Drª Maria Cristina Manno
Coordenadora CEUA UFRA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montese, Belém – PA. CEP: 66.077-901
Contatos: (1)3210-5165 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua

