

MICROBIOTA BACTERIANA E FÚNGICA PRESENTES NA CLOACA DE JABUTIS-PIRANGA (*Geochelone carbonaria*) CRIADOS EM DOMICÍLIO

Nilson Roberti Benites¹
Carlos Pessoa²
Luciana Bandini²
André Saidenberg³
Andrea Moreno⁴
Sonia Sakata⁵
Cleise Gomes³
Priscilla Melville⁶

RESUMO

A popularidade de jabutis criados como animais de estimação vem crescendo e tem causado preocupação quanto ao seu impacto na saúde pública e animal. Há uma escassez quanto aos estudos envolvendo o isolamento de bactérias e fungos presentes na cloaca de répteis. Este trabalho teve como objetivos o estudo das microbiotas bacteriana (bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas) e fúngica presentes na cloaca de cem jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio bem como a pesquisa de genes de virulência em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. utilizando a PCR. Uma grande diversidade de gêneros de bactérias (18) e fungos (9) foi isolada. Os micro-organismos mais frequentemente isolados foram: *Escherichia coli* (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Aeromonas* spp. (15%) e *Salmonella* spp. (7%). Todos os isolados de *Salmonella* spp. foram positivos para o gene *invA*. Nenhum dos isolados de *E.coli* foi positivo para presença de genes de virulência associados com *E. coli* enterotoxigênica, enteropatogênica e extraintestinal. Deve-se atentar para os cuidados com jabutis criados como *pets*, particularmente quanto aos aspectos de higiene, visando assim a prevenção da transmissão de diferentes micro-organismos, alguns dos quais que albergam genes de virulência.

Palavras-chave: *Geochelone carbonaria*, bactérias, fungos, microbiota, genes de virulência

BACTERIAL AND FUNGAL MICROFLORA PRESENT IN THE CLOACAE OF DOMESTICALLY KEPT RED-FOOTED TORTOISES (*Geochelone carbonaria*)

ABSTRACT

The popularity of tortoises kept as pets is increasing and has caused concern regarding its impact on public and animal health. There is a lack of studies involving the isolation of bacteria and fungi from cloacae of reptiles. This study aimed to investigate bacterial and fungal agents in the cloacae of a hundred Red-footed tortoises (*Geochelone carbonaria*) domestically kept, as well as to survey for virulence genes in *Escherichia coli* and *Salmonella*

¹ Prof. Associado da FMVZ USP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

² Mestrado no Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo - SP

³ Doutorando no Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo - SP

⁴ Professora Associada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo - SP

⁵ Graduanda de Medicina Veterinária da FMVZ-USP

⁶ Médica Veterinária – Doutorado em Microbiologia pelo ICB-USP - Laboratório de Bacteriologia e Micologia da FMVZ-USP, São Paulo - SP

spp. using PCR. A great diversity of bacterial genera (18) and fungi (9) were recovered. The microorganisms most frequently isolated were: *Escherichia coli* (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Aeromonas* spp. (15%) and *Salmonella* spp. (7%). All *Salmonella* spp. isolates were positive for the invasion gene *invA*. None of the *E. coli* isolates was positive for virulence genes associated with enterotoxigenic, enteropathogenic and extraintestinal *E. coli*. Proper husbandry measures when owning a tortoise, especially regarding hygiene aspects, are necessary since they aim at the prevention of different microorganisms some, of which harboring virulence genes.

Keywords: *Geochelone carbonaria*, bacteria, fungi, microflora, virulence genes

MICROBIOTA BACTERIANA Y FÚNGICA PRESENTES EN LA CLOACA DE TORTUGAS (*Geochelone carbonaria*) CRIADAS COMO ANIMALES DOMÉSTICOS

RESUMEN

La popularidad de las tortugas criadas como animales de compañía está creciendo junto con la preocupación por el impacto de estos animales en la salud pública y animal. Existen pocos estudios que incluyen el aislamiento de bacterias y hongos presentes en la cloaca de estos reptiles. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la microbiota bacteriana (aeróbica y anaeróbica facultativa) y fúngica presentes en la cloaca de cien tortugas (*Geochelone carbonaria*) domésticas e investigar genes de virulencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una amplia variedad de géneros de bacterias (18) y hongos (9) fueron aislados siendo *Escherichia coli*. (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Aeromonas* spp. (15%) y *Salmonella* spp. (7%) aislados con mayor frecuencia. Todas las cepas de *Salmonella* spp. fueron positivas para el gen *invA*. Ninguna de las cepas de *E. coli* fue positiva para la presencia de genes de virulencia asociados con *E. coli* enterotoxigénicas, enteropatógenicas y extraintestinales. Se debe prestar atención en el cuidado con tortugas criadas como animales domésticos sobre todo en aspectos de higiene, con objetivo en prevención de la transmisión de diferentes microorganismos, algunos de los cuales son portadores de genes de virulencia.

Palabras clave: *Geochelone carbonaria*, bacterias, hongos, microbiota, genes de virulencia

INTRODUÇÃO

A popularidade de diferentes répteis criados como animais de estimação vem crescendo e tem causado preocupação quanto ao seu impacto na saúde pública, tendo em vista que estes animais podem representar uma fonte potencial de infecção para humanos, na medida em que, por exemplo, eliminam no ambiente micro-organismos oportunistas e patogênicos pelas suas fezes (1, 2).

Veterinários que trabalham com répteis frequentemente são indagados pelos proprietários sobre os tipos de doenças que estes animais podem transmitir, bem como sobre as medidas profiláticas que devem ser tomadas para prevenir a ocorrência e transmissão destas doenças (2). Desta forma, o conhecimento dos micro-organismos que estes animais albergam passa a ser importante para auxiliar na orientação dos proprietários quanto aos cuidados com estes animais e implementação de medidas profiláticas adequadas.

Considerando-se que os répteis participam de forma crescente do mercado de animais criados como *pets* (1, 3), suas características microbiológicas devem ser melhor estudadas e

compreendidas, visando evitar que adoeçam ou venham a óbito devido à ocorrência de doenças infecciosas e não atuem como fontes de infecção para pessoas com as quais convivem. Assim sendo, e considerando a escassa literatura existente acerca do assunto, fica evidente a importância do conhecimento da microbiota dos répteis, para auxiliar na preservação da saúde humana e animal.

O presente trabalho teve como objetivos verificar a ocorrência e frequência das microbiotas bacteriana (bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas) e fúngica presentes na cloaca de jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio. Procurou-se também pesquisar genes codificadores de fatores de virulência de linhagens de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e exame microbiológico

A coleta das amostras foi realizada em domicílios onde são criados jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*) como *pets* na cidade de São Paulo, Brasil. Foram coletados suabes cloacais de 100 animais hígidos os quais foram então acondicionados em meio de Stuart (Oxoid) e encaminhados sob refrigeração ao laboratório. Estes suabes foram inicialmente inoculados em caldo BHI (Oxoid) com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras também foram semeadas em ágar sangue de carneiro (5%) e ágar MacConkey, com incubação em aerobiose a 37°C com leituras em 24-48 horas. As amostras cultivadas em caldo BHI foram posteriormente semeadas em ágar sangue e MacConkey e incubadas de forma similar.

Visando a pesquisa de *Salmonella* spp., os suabes também foram inoculados em caldo tetracionato e incubados a 37°C por 24 horas. Paralelamente as amostras foram semeadas em ágar xilose-lisina-tergitol 4 (XLT4) (Difco), com incubação em aerobiose a 37°C com leituras a 24-96 horas. Após a incubação as amostras inoculadas em caldo tetracionato também foram semeadas em ágar XLT4 e incubadas de forma similar.

Para a pesquisa de fungos filamentosos e leveduras, procedeu-se ao cultivo da amostra em caldo Sabouraud-dextrose e ágar Sabouraud-dextrose (Oxoid) com cloranfenicol (100 mg/l) com incubação a 25°C por um período de 3 dias para o caldo e de 7 dias para o ágar que foi submetido a avaliações diárias. As amostras cultivadas em caldo foram posteriormente semeadas em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol e incubadas de forma similar.

As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com características macro e microscópicas bem como por provas bioquímicas conforme descrito por Murray et al. (4). Os fungos filamentosos e leveduras isolados foram identificados de acordo com características macro e microscópicas, bem como por provas fisiológicas, de acordo com Barnett, Payne e Yarrow (5) e Hunter e Hunter (6). Em casos de dúvida, foram utilizados os sistema de identificação RapID® (Oxoid).

Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. utilizando a reação em cadeia da polimerase

A pesquisa de fatores de virulência das estirpes de *E.coli* isoladas de suabes cloacais foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a obtenção do material genético foi utilizado o método de extração por choque térmico (7). O sobrenadante foi removido para a realização da PCR. A cada extração realizada foram utilizadas como controles positivos, estirpes de *Escherichia coli* contendo genes codificadores dos fatores de virulência em estudo provenientes da coleção de cepas do Laboratório de Bacteriologia e Micologia da FMVZ-USP.

Foram utilizados os *primers* comercialmente disponíveis para detectar os genes que codificam para pili associados com pielonefrite (*pap*), hemolisina (*hly*), aerobactina (*iuc*), fator necrotizante citotóxico 1 (*cnfI*), fímbria S (*sfa*), adesina afimbrial I (*afa*), intimina (*eae*), enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (STa e STb) e gene de invasão *invA*. Para a detecção dos fatores de virulência comuns a *E.coli* patogênicas foram utilizados os *primers* e protocolos de reação descritos por Schultz et al. (8) (LT), Olsvik et al. (9) (STa), Blanco et al. (10) (STb), Yamamoto et al. (11) (UPEC), Blanco et al. (12) (*eae*). Para *Salmonella* spp. foi utilizado o *primer* para detecção do gene *invA* de acordo com o protocolo descrito por Rahn et al. (13). Para cada reação foram utilizadas as mesmas estirpes usadas como controles positivos nas reações de extração.

Os produtos de PCR (10µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio (10µg/ml) e fotografados sob luz ultravioleta. O marcador de pares de bases utilizado foi o 100 bp DNA ladder (Invitrogen).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste de Fischer, empregando-se o “software” Graphpad Instat 1992-98 (14) para realização dos mesmos.

RESULTADOS

Isolamento e identificação de micro-organismos presentes em suabes cloacais de jabutis-piranga.

Foram isoladas bactérias em todas as amostras analisadas ao passo que, fungos foram isolados em 62% delas. A associação entre dois ou mais gêneros e/ou espécies de micro-organismos ocorreu em todas as amostras avaliadas. Foram isoladas bactérias Gram positivas e Gram negativas em, respectivamente, 68 (68%) e 99 (99%) amostras analisadas. Leveduras e fungos filamentosos foram isolados em, respectivamente, 57% e 8% das amostras (Tabela 1).

Foram isolados 18 gêneros de bactérias, 06 gêneros de leveduras e 03 gêneros de fungos filamentosos. Os gêneros de micro-organismos isolados com maior frequência foram os seguintes (Tabela 1): *Escherichia coli* (67%), *Klebsiella* spp. (54%), *Bacillus* spp. (42%), *Candida* spp. (42%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Corynebacterium* spp. (15%) e *Aeromonas* spp. (15%), dentre outros. A frequência de isolamentos de *Escherichia coli* foi semelhante à de *Klebsiella* spp. e maior ($P<0,05$) do que as frequências de isolamentos de cada um dos outros gêneros ou espécies de micro-organismos.

Verificou-se que as frequências de isolamentos de bactérias Gram negativas foram maiores ($P<0,05$) do que as de Gram positivas e também maiores ($P<0,05$) que de fungos. Por sua vez, as frequências de isolamentos de bactérias Gram positivas foram semelhantes às de fungos.

Pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Nenhuma das 67 estirpes de *E.coli* isoladas foi positiva para presença de genes codificadores dos fatores de virulência *sfa*, *iuc*, *pap*, *cnf*, *hly*, *afa*, *eae*, LT, STa e STb. Por sua vez, todos os 07 isolados de *Salmonella* spp. foram positivos para a presença do gene *invA*.

Tabela 1. Frequências de isolamentos dos micro-organismos isolados a partir dos suabes cloacais de jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*).

Micro-organismos			
Bactérias	%	Bactérias	%
<i>Escherichia coli</i>	67	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	03
<i>Klebsiella</i> spp.	54	<i>Staphylococcus kloosii</i>	03
<i>Bacillus</i> spp.	42	<i>Alcaligenes faecalis</i>	02
<i>Citrobacter</i> spp.	33	<i>Corynebacterium durum</i>	02
<i>Staphylococcus</i> spp.	29	<i>Enterobacter aerogenes</i>	02
<i>Klebsiella oxytoca</i>	27	<i>Enterococcus faecium</i>	02
<i>Citrobacter freundii</i>	20	<i>Proteus mirabilis</i>	02
<i>Aeromonas</i> spp.	15	<i>Proteus vulgaris</i>	02
<i>Corynebacterium</i> spp.	15	<i>Staphylococcus simulans</i>	02
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	<i>Edwardsiella hoshinae</i>	01
<i>Klebsiella ozaenae</i>	12	<i>Enterobacter cloacae</i>	01
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	11	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	01
<i>Corynebacterium striatum</i>	10	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	01
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	09	<i>Staphylococcus lentus</i>	01
<i>Micrococcus</i> spp.	09		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08		
<i>Acinetobacter</i> spp.	08	Leveduras	
<i>Enterococcus</i> spp.	07	<i>Candida</i> spp.	42
<i>Salmonella</i> spp.	07	<i>Candida tropicalis</i>	22
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	07	<i>Candida krusei</i>	10
<i>Streptococcus</i> sp.	07	<i>Rhodotorula</i> spp.	09
<i>Aeromonas caviae</i>	06	<i>Trichosporon</i> spp.	09
<i>Aeromonas sobria</i>	06	<i>Candida lusitaniae</i>	07
<i>Serratia marcescens</i>	06	<i>Candida guilliermondi</i>	03
<i>Edwardsiella</i> spp.	05	<i>Torulopsis</i> spp.	02
<i>Enterococcus faecalis</i>	05	<i>Aureobasidium</i> sp.	01
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	04	<i>Geotrichum candidum</i>	01
<i>Acinetobacter Iwofii</i>	04		
<i>Citrobacter koseri</i>	04	Fungos filamentosos	
<i>Edwardsiella tarda</i>	04	<i>Rhizopus</i> spp.	04
<i>Proteus</i> spp.	04	<i>Mucor</i> spp.	03
<i>Aeromonas hydrophila</i>	03	<i>Penicillium</i> sp.	01
<i>Corynebacterium xerosis</i>	03		
<i>Enterobacter</i> spp.	03		

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A quantidade de répteis criados como *pets* em domicílios apresentou um aumento significativo nos últimos anos sendo que o risco de desenvolver infecções causadas por micro-organismos transmitidos por estes animais também aumentou em igual proporção (15). Segundo diferentes autores, répteis criados em domicílios podem apresentar risco potencial de transmissão de diferentes micro-organismos (2, 16).

Há uma escassez de estudos envolvendo o isolamento de bactérias e fungos de cloaca de répteis, particularmente de jabutis-piranga. No presente estudo, uma grande diversidade de gêneros de bactérias (n=18) e fungos (n=9) foi isolada, todos também comumente encontrados no trato intestinal de humanos e outros animais. Todas as espécies bacterianas isoladas já foram descritas como agentes de infecções em répteis havendo poucos relatos em jabutis (15, 16). Existem também relatos de isolamentos de alguns destes micro-organismos a partir de microbiota de diferentes répteis, sendo escassas as informações em jabutis (17-19).

Répteis criados como *pets* são menos suscetíveis às doenças infecciosas quando o proprietário adota medidas adequadas quanto ao manejo dos animais. Entretanto, os micro-

organismos que compõem a microbiota podem se tornar patogênicos para seus hospedeiros quando os mesmos encontram-se debilitados (20). No presente estudo, *Pseudomonas* spp. (8%) e *Aeromonas* spp. (15%) foram os principais patógenos bacterianos isolados que apresentam potencial risco para jabutis (2). *Klebsiella* spp. (54%), *Citrobacter* spp. (33%), *Staphylococcus* spp. (29%), *Corynebacterium* spp. (15%), *Streptococcus* spp. (7%), *Edwardsiella* spp. (5%), *Proteus* spp. (4%), *Enterobacter* spp. (3%) podem, sob determinadas circunstâncias, ser patogênicos para estes animais (2). Todos os micro-organismos isolados também apresentam importância para a saúde humana, podendo estar associados a diferentes síndromes clínicas (4), ressaltando-se assim a importância da implementação de medidas preventivas relacionadas ao contato com estes animais.

O micro-organismo mais frequentemente isolado foi *Escherichia coli* (67% das amostras). Quando consideradas outras espécies de répteis, pode-se mencionar o estudo de Meyer-Junior, Dias e Araujo (18) que isolaram *Escherichia coli* (66%) a partir de 15 suabes de cloaca de tartarugas gigantes sul-americanas (*Podocnemis expansa*); também isolaram *E. coli* (26%) a partir de 15 suabes de cloaca de muçuãs (*Kinosternon scorpioides*) mantidas em cativeiro. No presente estudo, embora tenha sido elevada a ocorrência de *E. coli*, deve-se ressaltar que nenhuma das estirpes apresentou genes codificadores dos fatores de virulência pesquisados (*pap*, *iuc*, *cnf1*, *sfa*, *afa*, *hly*, *eae*, LT, STa e STb) os quais estão comumente associados a doenças em humanos. Estes resultados apresentam importância sob o ponto de vista de saúde pública, tendo em vista que, particularmente no que se refere a este micro-organismo, pode-se concluir que são baixos os riscos relacionados ao convívio entre humanos e estes *pets* que albergam *E. coli*. Na literatura pesquisada não foram encontradas referências acerca de estudos de fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de jabutis ou répteis em geral.

Um total de 7% de *Salmonella* spp. foram isoladas no presente estudo. Saelinger et al. (21) examinaram suabes de cloaca de 94 tartarugas não tendo isolado *Salmonella* spp. de nenhuma das amostras. Strohl et al. (22), por sua vez, avaliaram fezes de 52 quelônios, dentre os quais 03 *Geochelone carbonaria*, tendo verificado presença de *Salmonella* spp. em 23% das amostras, sendo que nas amostras oriundas de *Geochelone carbonaria* este micro-organismo não foi isolado. Existe uma grande variabilidade de resultados quando se trata do isolamento de *Salmonella* spp. a partir de diferentes espécies de répteis (21, 23, 24). *Salmonella* spp. geralmente não causam infecções em répteis (20), mas constituem causa importante de doenças no ser humano (25). No presente estudo, todos os isolados de *Salmonella* apresentavam o gene *invA*, essencial para expressão da virulência (26). Trata-se de um achado relevante no tocante à saúde animal e humana considerando-se as propriedades de virulência e importância clínica do gene *invA*.

Relatos de fungos isolados da cloaca de répteis mantidos como *pets* são escassos. As informações disponíveis são limitadas a leveduras em animais doentes ou necropsiados ou àquilo que possa ser extrapolado de animais selvagens (15). No presente estudo, fungos (leveduriformes e/ou filamentosos) foram isolados a partir de 62% das amostras, sendo que em nove (9%) delas havia mais de um gênero e/ou espécie de fungo. A ocorrência do mesmo gênero e/ou espécie de fungo em hospedeiros diferentes, como foi o caso de *Candida tropicalis* isolada a partir de 22 jabutis, assim como a presença de diferentes fungos em um mesmo hospedeiro, sugere que os répteis possam atuar como animais carreadores de fungos filamentosos e leveduras em suas cloacas.

Medidas simples são consideradas orientações básicas para a manutenção de répteis como *pets*. Os proprietários destes animais devem atentar para as boas práticas de criação e manejo para assim evitar ou reduzir o estresse que representa a principal condição predisponente para a ocorrência de doenças. A maior parte das infecções em répteis é causada por patógenos oportunistas que infectam animais imunossuprimidos. Por sua vez, os jabutis criados como *pets* podem se transformar em fontes de infecção para humanos e vice-versa. O

risco de transmissão de micro-organismos entre animais ou entre o animal e o homem pode ser minimizado quando implementadas as precauções necessárias relativas a aspectos de higiene. Deve-se considerar ainda que, a ausência da aplicação de medidas de manejo adequadas pode estar relacionada à oportunidade de transmissão de micro-organismos que apresentam genes codificadores de fatores de virulência.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à colaboração de Clarice Yukari Minagawa e Marina Caravatto Baras pelos seus valiosos auxílios na realização dos exames laboratoriais. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 07/55784-5) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Bolsa de Mestrado de Carlos Alexandre Pessoa).

REFERÊNCIAS

1. Ebani V, Fratini F, Ampola M, Rizzo E, Cerri D, Andreani E. Pseudomonas and Aeromonas isolates from domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro sensitivity. *Vet Res Commun.* 2008;32(Suppl 1):195-8.
2. Johnson-Delaney CA. Reptile zoonoses and threats to public health. In: Mader DR, editor. *Reptile medicine and surgery.* 2a ed. Londres: W.B. Saunders; 2006. p.1017-30.
3. Pessoa CA. Avaliação da microbiota bacteriana e fúngica em fezes de jabutis (*Geochelone carbonaria*) criados em domicílio e análise do potencial risco à saúde humana [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.
4. Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology.* 8a ed. Washington: American Society for Microbiology; 2003.
5. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: characteristics and identification.* Cambridge: University Press; 2000.
6. Hunter B, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi.* Minneapolis: Burgess Publishing; 1998.
7. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol.* 2007;123:145-52.
8. Schultsz C, Pool GJ, Van Ketel R, Wever D, Speelman P, Dankert J. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non-radioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2393-7.
9. Olsvik OJ, Wahlberg B, Petterson M, Uhlen T, Popovic IK, Wachsmuth K, et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:22-5.
10. Blanco M, Blanco JE, Gonzalez EA, Mora A, Janse W, Gomes TAT, et al. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different

- O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2958-63.
11. Yamamoto S, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995;2:85-90.
 12. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-). *J Clin Microbiol.* 2004;42:645-51.
 13. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss III R, et al. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes.* 1992;6:271-9.
 14. Graphpad InStat Software. Statistical analysis for personal computers. San Diego; 1992-1998.
 15. Nardoni S, Papini R, Marcucci G, Mancianti F. Survey on the fungal flora of the cloaca of healthy pet reptiles. *Rev Med Vet.* 2008;159:159-65.
 16. Frye FL. Reptile care: an atlas of diseases and treatments. v.I. USA: TFH Publications; 1991.
 17. Dickinson V, Duck T, Schwalbe C, Jarchow J, Trueblood M. Nasal and cloacal bacteria in free-ranging desert tortoises from the western United States. *J Wildl Dis.* 2001;37:252-7.
 18. Meyer-Junior JC, Dias H, Araujo J. Determinação qualitativa das enterobactérias presentes no trato digestivo da tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) mantidas em cativeiro. In: Anais do 7º Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina; 2006, Ilhéus. Ilhéus-BA: UESC; 2006.
 19. Santoro M, Gómez G, Caballero M. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero National Park, Costa Rica. *J Zoo Wildl Med.* 2006; 37:549-52.
 20. Mader D. Reptile medicine and surgery. Missouri: Saunders Elsevier; 2006.
 21. Saelinger C, Lewbart G, Christian L, Lemons C. Prevalence of *Salmonella* spp. in cloacal, fecal, and gastrointestinal mucosal samples from wild North American turtle. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;229:266-8.
 22. Strohl P, Tilly B, Freymy S, Brisabois A, Guerin-Faubleee V. Prevalence of *Salmonella* shedding in faeces by captive chelonians. *Vet Rec.* 2004;154:56-8.
 23. Kabeya H, Fujita M, Morita Y, Yokoyama E, Yoda K, Yamauchi A, et al. Prevalence of *Salmonella*, *Pasteurella* and *Staphylococcus* among pet green iguanas in Japan. *J Jpn Vet Med Assoc.* 2008;61:70-4.

24. Richards JM, Brown JD, Kelly TR, Fountain AL, Sleeman JM. Absence of detectable Salmonella cloacal shedding in free-living reptiles on admission to the Wildlife Center of Virginia. J Zoo Wildl Med. 2004;35:562-3.
25. Mead P, Slutsker J, Dietz V, Mccaig L, Bresee J, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999;5:607-25.
26. Galan JE, Curtiss III R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. typhimurium* to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:6383-7.

Recebido em: 27/02/12

Aceito em: 14/11/12