



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO  
AMAZONAS  
CAMPUS MANAUS ZONA LESTE  
CURSO SUPERIOR DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIANCA CRISTINA ROCHA DE OLIVEIRA**

***Salmonella* spp. EM PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*)  
MANTIDOS EM CATIVEIRO**

**MANAUS-AM  
2021**

**BIANCA CRISTINA ROCHA DE OLIVEIRA**

***Salmonella* spp. EM PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*)  
MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Faccini dos Santos.  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo de Souza Amaral.

**MANAUS-AM  
2021**



### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

O48s Oliveira, Bianca Cristina Rocha de.  
*Salmonella* spp. em peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro. / Bianca Cristina Rocha de Oliveira. -- Manaus, 2021.  
33 f.; il : color, 30 cm  
Inclui CD-ROM.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas –  
Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2021.

Orientador: Prof. Felipe Faccini dos Santos.  
Co-Orientador: Prof. Rodrigo de Souza Amaral.

1. Cativeiro. 2. Isolamento. 3. *Salmonella* spp. 4. Sirênios. I.  
Santos, Felipe Faccini dos. II. Amaral, Rodrigo de Souza. II. Título.

CDD – 597.6409811

Elaborada por Diego Leonardo de S. Fonseca – CRB 11/828

BIANCA CRISTINA ROCHA DE OLIVEIRA

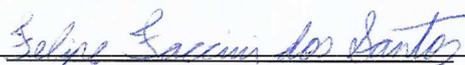
***Salmonella* spp. EM PEIXES-BOIS DA AMAZÔNIA (*Trichechus inunguis*)  
MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Faccini dos Santos  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo de Souza Amaral

Aprovado em 22 de abril de 2021.

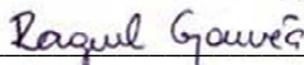
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felipe Faccini dos Santos  
IFAM-CMZL



Prof. Dr. Alexandre Alberto Tonin  
UFSM



Dra. Raquel Gouvêa  
UERJ

MANAUS-AM  
2021

*A Deus, minha fortaleza.  
A minha mãe Janaina Mirelli Rocha.  
A minha avó Maria Iraide Arruda da Rocha.  
Aos meus irmãos Raissa Mirelli,  
Paulo Júnior e Paulo Vitor*

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas *Campus* Manaus Zona Leste (Ifam-CMZL), pela oportunidade de cursar Medicina Veterinária e por todo apoio fornecido durante a graduação.

Aos meus orientadores Dr. Felipe Faccini e Dr. Rodrigo Amaral, pela oportunidade de realizar esse projeto, pela excelente orientação e pela confiança em mim depositada.

Ao Programa de Iniciação Científica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (Ifam) pelo apoio financeiro recebido.

A Associação Amigos do Peixe-boi (Ampa) e Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LMA/Inpa), em especial a pesquisadora Dra. Vera da Silva, e aos médicos veterinários Antony Rodrigues e José Anselmo da PREVET por colaborarem com o projeto.

Aos mestres Rodiney Medeiros e Erika Pimentel, pelo auxílio durante o período de realização das análises e pela cumplicidade.

A Dra. Monique Casas, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na identificação dos sorotipos de *Salmonella* spp. e por contribuir mediante seu conhecimento e experiência na área.

Aos amigos que fiz ao longo desses anos, que torceram por mim e estiveram comigo nessa longa caminhada.

Aos meus pais, Janaina Mirelli e Graciomar Oliveira, a minha avó e aos meus irmãos por todo carinho, amor e apoio. A toda minha família!

Àqueles que direta ou indiretamente me ajudaram e me influenciaram chegar até aqui, muito obrigada!

A Deus, sempre!

## **RESUMO:**

Objetivou-se investigar a frequência de *Salmonella* spp. em peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro no Parque Aquático Robin C. Best localizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LMA/Inpa). Para isso, foram realizadas análises em amostras de fezes e *swab* retal de 34 animais de diferentes classes etárias, sendo nove adultos, 12 filhotes e 13 juvenis; no total de 14 fêmeas e 20 machos. O processo metodológico foi realizado para caracterização ampla das cepas, mediante o isolamento de colônias características de *Salmonella* spp.; identificação das características morfotintoriais pela coloração de Gram; identificação dos isolados conforme o comportamento bioquímico típico de *Salmonella* spp. em Ágar Ferro Triplo Açúcar (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA), Ágar Sulfeto de hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM) e Ágar Citrato de Simmons (CIT); confirmação dos isolados com o uso da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); caracterização do perfil de sensibilidade frente aos agentes antimicrobianos tetraciclinas (30µg), ampicilina (10µg), gentamicina (10µg), cefoxitina (30µg), amoxicilina (30µg), ciprofloxacina (5µg), penicilina (10µg) e azitromicina (15µg); sorotipificação prévia, realizada por testes de aglutinação em lâmina, com anti-soros específicos para *Salmonella* spp. e isolamento genético para confirmação dos sorotipos. Os resultados da comparação entre os dois métodos de coletas foram analisados pelo teste exato de Fisher empregando-se o programa *GraphPad InStat* versão 3.10. Das onze cepas isoladas por meio do cultivo microbiológico e caracterização bioquímica, nove apresentaram resultados positivos na PCR, confirmando a positividade de três animais. Os isolados eram provenientes de amostras coletadas em duas fêmeas filhotes e uma fêmea juvenil. Correspondendo a frequência de 16,6% em filhotes e 7,7% em juvenis. O maior número de isolados foi obtido a partir de amostras de fezes, no entanto, devido ao baixo número de amostras positivas, não houve diferença significativa entre os dois métodos de coleta conforme o teste exato de Fisher. Conforme o antibiograma as cepas isoladas apresentaram maiores índices de eficácia ao uso de tetraciclina, gentamicina e ciprofloxacina. As cepas foram identificadas como *Salmonella enterica* subsp. *salamae* sorotipo II 42:r:- e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Javiana. Sendo este o primeiro relato de ocorrência desses sorotipos em peixes-bois da Amazônia e o primeiro relato de *Salmonella* spp. em sirênios vivos.

**Palavras-chave:** Cativeiro. Isolamento. *Salmonella* spp. Sirênios.

**ABSTRACT:**

The objective was to investigate the frequency of *Salmonella* spp. in Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*) kept in captivity at the Robin C. Best Aquatic Park located at the National Research Institute of the Amazon (LMA / Inpa). For this, analyzes were performed on fecal samples and rectal swab from 34 animals of different age groups, being nine adults, 12 puppies and 13 juveniles; in total 14 females and 20 males. The methodological process was carried out to fully characterize the strains, by isolating colonies characteristic of *Salmonella* spp. ; identification of morphotintorial characteristics by Gram stain; identification of isolates according to the typical biochemical behavior of *Salmonella* spp. Triple Iron Sugar Agar (TSI), Iron Lysine Agar (LIA), Hydrogen Sulfide, Indole and Motility Agar (SIM) and Simmons Citrate Agar (CIT); confirmation of the isolates using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique; characterization of the sensitivity profile against the antimicrobial agents tetracyclines (30µg), ampicillin (10µg), gentamicin (10µg), cefoxitin (30µg), amoxicillin (30µg), ciprofloxacin (5µg), penicillin (10µg) and azithromycin (15µg); previous serotyping, carried out by slide agglutination tests, with specific antisera for *Salmonella* spp. and genetic isolation to confirm serotypes. The results of the comparison between the two collection methods were analyzed by Fisher's exact test using the GraphPad InStat program version 3.10. Of the eleven strains isolated through microbiological cultivation and biochemical characterization, nine showed positive results in PCR, confirming the positivity of three animals. The isolates came from samples collected from two young females and one juvenile female. Corresponding to a frequency of 16.6% in puppies and 7.7% in juveniles. The largest number of isolates was obtained from stool samples, however, due to the low number of positive samples, there was no significant difference between the two collection methods according to Fisher's exact test. According to the antibiogram, the isolated strains showed higher rates of efficacy for the use of tetracycline, gentamicin and ciprofloxacin. The strains were identified as *Salmonella enterica* subsp. *salamae* serotype II 42: r: - and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Javiana. This being the first report of the occurrence of these serotypes in Amazonian manatees and the first report of *Salmonella* spp. in live sirenians.

**Keywords:** Captivity. Isolation. *Salmonella* spp. Sirenians.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Alojamento dos peixes-bois da Amazônia adultos e juvenis no Parque Aquático Robin C. Best.....	13
Figura 2 - Coleta de <i>swab</i> retal em peixe-boi da Amazônia.....	14
Figura 3 - Crescimento de colônias características em Ágar Hektoen (A): as colônias são verde-azuladas com centro preto devido a produção de H <sub>2</sub> S; crescimento de colônias características em Ágar Verde-brilhante (B): as colônias são vermelhas, indicando alcalinidade e translúcidas.....	15
Figura 4 - Isolados com comportamento bioquímico típico de <i>Salmonella</i> spp. A – Ágar Ferro Triplo Açúcar (TSI); B - Ágar Lisina Ferro (LIA); C – Ágar Sulfeto de hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM) e D – Ágar Citrato de Simmons (CIT).....	16
Figura 5 - Esquema representativo do protocolo utilizado para isolamento bacteriológico para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	17
Figura 6 - Agentes antimicrobianos escolhidos para avaliar o perfil de sensibilidade das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de amostras de fezes e <i>swabs</i> retais provenientes de peixes-bois da Amazônia.....	19
Figura 7 - Gel de agarose após eletroforese com os produtos amplificados com primers para <i>Salmonella</i> spp. Coluna M- marcador ladder 100 pb; coluna 1- animal 14 (cepa 1); coluna 2- animal 20 (cepa 2); coluna 3- animal 20 (cepa 3); coluna 4- animal 20 (cepa 4); coluna 5- animal 21 (cepa 5); coluna 6- animal 22 (cepa 6); coluna 7- animal 22 (cepa 7); coluna 8- animal 22 (cepa 8); coluna 9- animal 22 (cepa 9); coluna 10- animal 22 (cepa 10) e coluna 11- animal 23 (cepa 11).....	20
Figura 8 - Perfil de sensibilidade (%) antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de fezes e <i>swabs</i> retais de peixes-bois da Amazônia ( <i>Trichechus inunguis</i> ).....	27

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultado após a confirmação pela Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos peixes-bois (*Trichechus inunguis*) para isolamento de colônias de *Salmonella* spp. conforme a classe etária e sexo.....21
- Tabela 2 - Resultado dos diferentes métodos de coleta de amostra para detecção de *Salmonella* spp. em peixes-bois da Amazônia.....22
- Tabela 3 - Diâmetro do halo de inibição em milímetros\* dos antimicrobianos frente as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras obtidas de fezes e *swabs* retais de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro.....26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	12
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> spp.....	14
3.2 TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	17
3.3 ANTIBIOGRAMA DAS CEPAS ISOLADAS.....	17
3.4 SOROTIPAGEM.....	19
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A ordem Sirenia é composta por quatro espécies distribuídas em duas famílias, o dugongo (*Dugong dugon*) que pertence à família Dugongidae, e as seguintes espécies: peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus*), peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) e o peixe-boi africano (*Trichechus senegalensis*) que pertencem à família Trichechidae. No Brasil são encontradas duas espécies de peixes-bois, *T. manatus* e *T. inunguis* (ICMBIO, 2011).

O peixe-boi da Amazônia apresenta o menor tamanho quando comparado aos demais membros da família Trichechidae, podendo medir até 2,75 metros de comprimento e atingir o peso máximo de 420 kg (AMARAL; DA SILVA; ROSAS, 2010).

Possui distribuição ao longo da Bacia Amazônica e pode ser encontrado na Colômbia, Peru e Equador. Sendo que no estuário do rio Amazonas, em torno da Ilha do Marajó e costa do Amapá, podem viver em simpatria com o peixe-boi marinho (BEST, 1984; DA SILVA et al. 2019; DOMNING, 1981).

Está atualmente classificado como vulnerável pela IUCN *Red List of Threatened Species* (MARMONTEL, 2016) e consta no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como vulnerável à extinção (ICMBIO, 2018). Essa espécie foi utilizada como alimento por povos indígenas da região antes da chegada dos colonizadores. Porém, entre os anos de 1935 a 1954, com o advento da indústria do couro, começou a ser intensivamente caçada. Durante esse período cerca de 4000 peixes-bois foram mortos por ano (DOMNING, 1982).

Em decorrência da importância de ações voltadas para conservação dessa espécie, que se encontra vulnerável à extinção. As atividades de resgate dos peixes-bois são realizadas mediante a ocorrência dos casos, com uma intensidade maior de filhotes órfãos. Em razão de suas mães serem caçadas, esses filhotes precisam de cuidados especiais e devem ser amamentados por pelo menos dois anos (ICMBIO, 2011). Após o processo de resgate, os filhotes passam pelo processo de reabilitação em cativeiro e quando estão totalmente restabelecidos, podem ser devolvidos para natureza.

A reintrodução desses animais que passaram por um processo de reabilitação em cativeiro é importante para restabelecer a sua distribuição geográfica e com isso ajudar na preservação da espécie. No entanto, antes de realizar a soltura, é importante garantir que o animal esteja saudável, possibilitando um maior sucesso na sua adaptação ao novo ambiente e evitando que agentes patogênicos sejam disseminados na população de vida livre.

Conforme Silva et al. (2017), as doenças bacterianas contribuem significativamente para a morbidade e mortalidade de peixes-bois marinho em seu habitat natural e também quando mantidos em cativeiro. Entretanto, para peixes-bois da Amazônia existem poucos relatos descritos de doenças bacterianas.

*Salmonella* spp. é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae com característica morfotintorial de bacilo Gram-negativo, geralmente móvel, não formador de esporos, capaz de formar ácido e na maioria das vezes gás a partir de glicose. Subdividem-se em 2 espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* sendo que a última se divide em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. É eliminada em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água. Sua sobrevivência no meio ambiente pode ser muito longa principalmente em matéria orgânica (BRASIL, 2011).

Apesar de bastante frequente no ambiente e isolada de diversos animais, existem poucos relatos na literatura de casos de salmonelose em sirênios, tendo sido pesquisado apenas em casos fatais, em sua maioria em filhotes resgatados que passaram pelo processo de reabilitação em cativeiro, no entanto, com identificação da bactéria após o óbito do animal (CORREA NETO et al. 2021; ELLIOT, et al. 1981; VERGARA-PARENTE et al. 2003; VORBACH et al. 2017). Relatos sobre isolamento de *Salmonella* spp. em peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) vivos com identificação do sorotipo são inexistentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

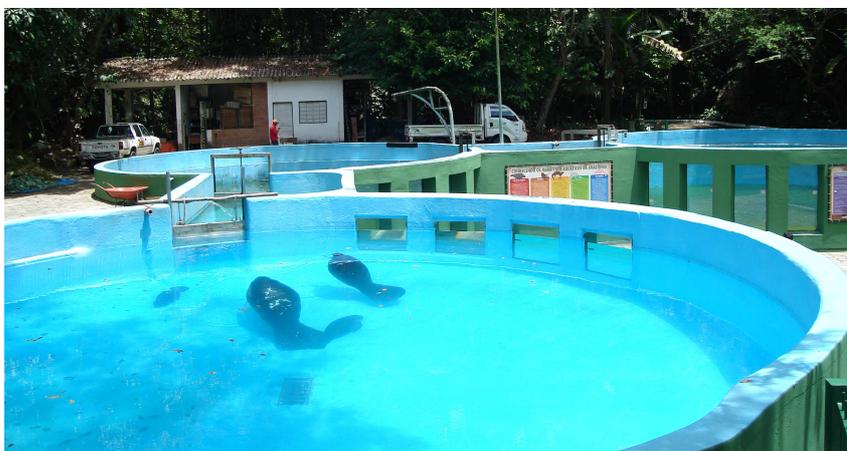
Investigar a frequência de *Salmonella* spp. em peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *Salmonella* spp. em amostras de fezes e *swab* retal de peixes-bois da Amazônia;
- Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas;
- Identificar os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de fezes e *swab* retal de 34 peixes-bois da Amazônia de diferentes classes etárias, sendo nove animais adultos, 12 filhotes e 13 juvenis. Com um total de 14 fêmeas e 20 machos. Os animais eram mantidos em cativeiro no Parque Aquático Robin C. Beste, localizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LMA/Inpa). Sendo alojados conforme a sua classe etária e sexo. Os filhotes eram mantidos em piscinas de fibra de vidro em grupos de dois a quatro animais, os juvenis e adultos eram mantidos juntos em tanques separados por sexo (Figura 1).



**Figura 1.** Alojamento dos peixes-bois da Amazônia adultos e juvenis no Parque Aquático Robin C. Best. Fonte: Ampa (Associação Amigos do Peixe-boi).

As coletas foram realizadas durante os procedimentos de limpeza dos tanques e manejos dos animais. As fezes foram obtidas imediatamente após a defecação, acondicionadas em recipientes de polietileno, de boca larga, esterilizados e devidamente identificados. Os *swabs* eram introduzidos na região retal, por meio de movimentos rotatórios suaves e acondicionados em meio de conservação e transporte *Cary-Blair* em recipientes estéreis e devidamente identificados (Figura 2). A autorização de coleta de material biológico foi sob registro SISBIO 59992-1.

Os ensaios para isolamento, caracterização bioquímica e antibiograma foram realizadas no Laboratório de Ciências Biológicas e da Saúde do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas *Campus* Manaus Zona Leste (Ifam-CMZL). A confirmação das cepas isoladas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi realizada no Laboratório

de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Universidade Federal do Amazonas (LPBOM-Ufam).



**Figura 2.** Coleta de *swab* retal em peixe-boi da Amazônia. Fonte: Felipe Faccini dos Santos.

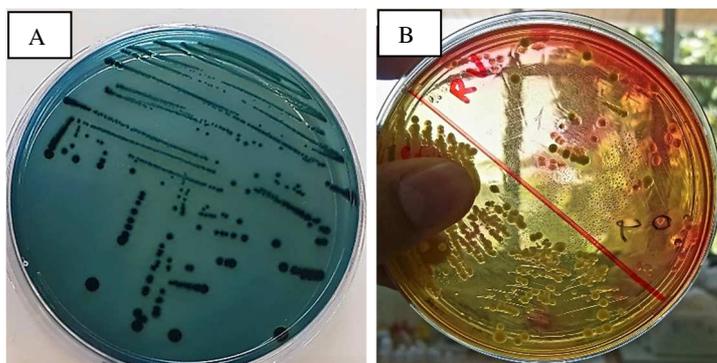
Os ensaios para sorotipificação foram realizados pelo Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais (NDEI) do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

### 3.1 ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.

Após a realização das coletas, as amostras foram incubadas para o pré-enriquecimento por 18 horas a 36°C, em frascos contendo nove partes de Solução Salina Peptonada a 1% Tamponada (SSPT) para cada parte de amostra. Em seguida, foram inoculados 0,1mL e 1mL em tubos contendo 10 mL dos meios de enriquecimento seletivo Rappaport Vassiliadis (RV) e Selenito Cistina (SC), respectivamente, ambos incubados a 41 °C em banho-Maria por 24 horas.

Após esse procedimento, os crescimentos dos caldos foram estriados em placas de Ágar Verde-brilhante (VB) e Ágar Hektoen (HE), utilizando-se a técnica de esgotamento por estrias para facilitar o crescimento de colônias isoladas, e incubados por 24 horas a 36°C, conforme metodologia estabelecida por Brasil (2011).

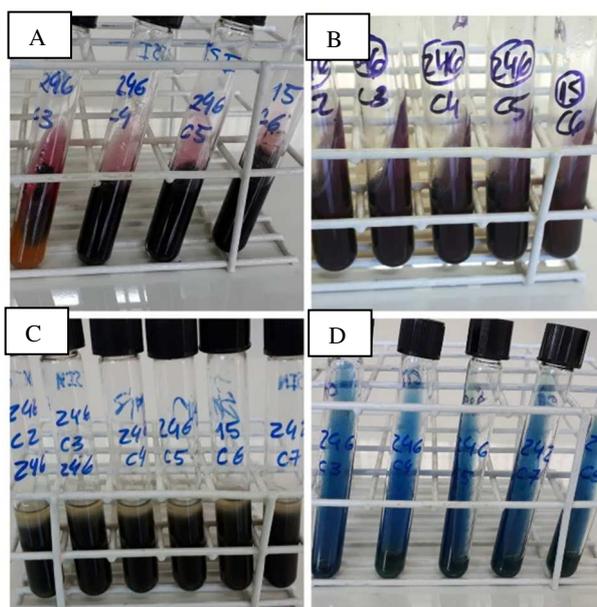
Após o crescimento das colônias, dependendo do ágar utilizado, foram identificadas as colônias características de *Salmonella* spp., sendo selecionadas de três a cinco colônias para confirmação bioquímica (Figura 3).



**Figura 3.** Crescimento de colônias características em Ágar Hektoen (A): as colônias são verde-azuladas com centro preto devido a produção de H<sub>2</sub>S; crescimento de colônias características em Ágar Verde-brilhante (B): as colônias são vermelhas, indicando alcalinidade e translúcidas. Fonte: Arquivo Pessoal.

O processo de seleção foi baseado nas características de colônias totalmente isoladas, que no Ágar Hektoen a região onde a bactéria cresce se torna verde-azulada, indicando a não fermentação da lactose, e a colônia apresenta um ponto negro no centro devido à produção de H<sub>2</sub>S. No Ágar Verde-brilhante a região onde a bactéria cresce se torna rosa, indicando a não fermentação da lactose e sacarose, a colônia é lisa, convexa, circular, translúcida e com coloração vermelha (BRASIL, 2011).

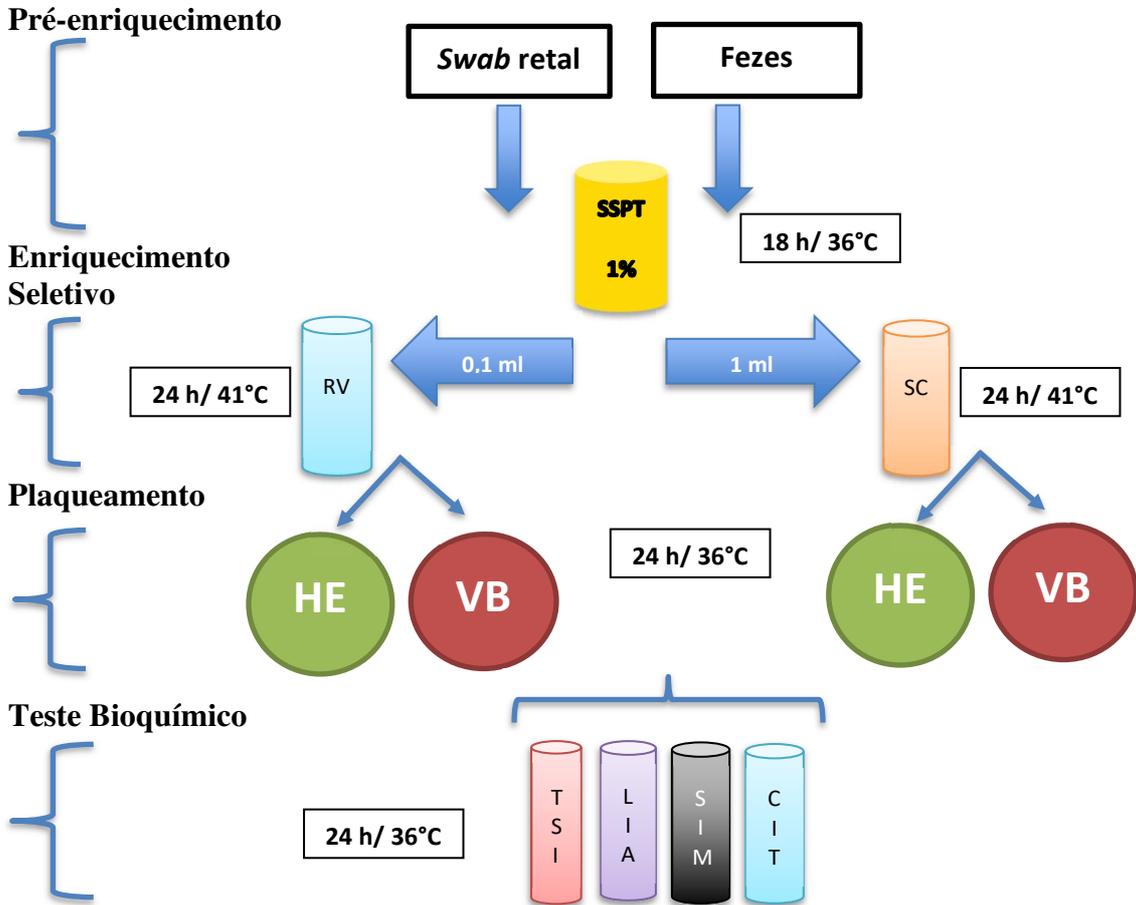
A identificação das características morfotintoriais foi realizada pela coloração de Gram. Todas aquelas com características de *Salmonella* spp., bacilos Gram negativos, foram transferidas para os meios de estocagem para posterior caracterização bioquímica em Ágar Ferro Triplo Açúcar (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA), Ágar Sulfeto de hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM) e Ágar Citrato de Simmons (CIT) (Figura 4).



**Figura 4.** Isolados com comportamento bioquímico típico de *Salmonella* spp. A – Ágar Ferro Triplo Açúcar (TSI); B - Ágar Lisina Ferro (LIA); C – Ágar Sulfeto de hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM) e D – Ágar Citrato de Simmons (CIT). Fonte: Arquivo Pessoal.

Em TSI a *Salmonella* spp. fermenta a glicose e produz sulfeto de hidrogênio. A fermentação da glicose é verificada por meio da coloração amarela na base, a superfície permanece alcalina (vermelha) indicando a não fermentação da lactose e sacarose. No meio de cultura LIA é observado a descarboxilação da lisina tornando o meio púrpura (alcalina) na base e no ápice. Podendo ocorrer também a produção de  $H_2S$ , usualmente da base até o final do tubo. No SIM a *Salmonella* spp. pode produzir sulfeto de hidrogênio, indicando a presença de pigmento negro de qualquer intensidade e a motilidade é observada pela turvação do meio. Também apresenta resultado negativo para o teste do Indol, ocorrendo a presença de um anel cuja coloração não se altera após a adição do reagente Kovacs. O CIT se torna azul indicando uma reação alcalina, após a sua utilização como única fonte carbono pela bactéria. Pois a *Salmonella* spp. pode obter energia por via diferente da fermentação de carboidratos (BRASIL, 2011). O protocolo de isolamento utilizado é representado no seguinte esquema (Figura 5).

**Figura 5.** Esquema representativo do protocolo utilizado para isolamento bacteriológico para detecção de *Salmonella* spp.



### 3.2 TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a extração do DNA das amostras foi realizado o tratamento térmico, para isso foi realizada a centrifugação de 1,0 ml de cada amostra a 5.000 rpm por quatro minutos, em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante desprezado e 0,1 ml de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) acrescido ao *pellet*. O produto foi agitado em vórtex, com posterior aquecimento a 95 °C por dez minutos, transferido para banho de gelo por mais 10 minutos e centrifugado a 5.000 rpm por um minuto. O sobrenadante foi transferido para novo tubo cônico e mantido à temperatura de congelamento para posterior utilização na PCR (SANTOS et al., 2001). Sua amplificação foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para amplificar um fragmento de 284 pb do gene *invA* de *Salmonella* spp. (RAHN et al., 1992).

A PCR foi realizada em tubos cônicos de polipropileno no volume total de 50 µl, sendo 5 µl de DNA da amostra e 45 µl de mix contendo: tampão para PCR 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl); 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de dNTP; 0,2µM de primer forward; 0,2µM primer reverse e 1U de Taq polimerase.

As reações ocorreram da seguinte forma: 94°C/3min para desnaturação inicial; seguida de 30 ciclos de 94°C/45s, 56°C/30s, 72°C/1min e extensão final 72°C/3min. A visualização dos fragmentos amplificados foi em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio (0,4 µg/ml).

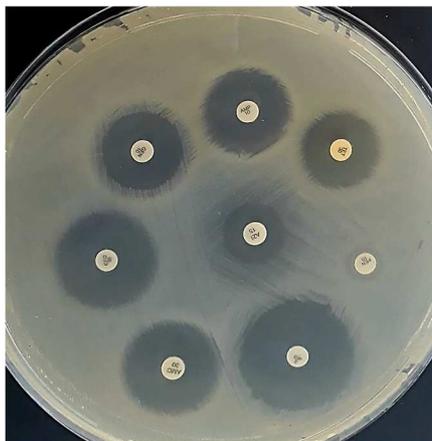
### 3.3 ANTIBIOGRAMA DAS CEPAS ISOLADAS

Após a confirmação molecular dos isolados, foi realizado o antibiograma utilizando a técnica de difusão em ágar, segundo Bauer et al. (1966). A partir da cultura congelada, o isolado foi reativado em Caldo BHI por 36 °C por 24 horas e, após o período, uma alçada de cada isolado foi transferida para tubos de Ágar Triptona de Soja (TSA), que foram incubadas a 36 °C durante 24 horas.

As culturas foram ressuspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) em quantidade suficiente para serem padronizadas na concentração 0,5 da escala de McFarland (1 x 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), sendo posteriormente semeadas com suabe estéril em placas de 140 mm de diâmetro com Ágar Muller-Hinton.

Após a secagem do ágar, discos contendo quantidades padronizadas de antibióticos (Laborclin®) foram aderidos ao ágar e as placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas (Figura 6). Os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com as normas do CLSI (2011) e os isolados de *Salmonella* spp. foram classificados como sensível, intermediário e resistente.

Foram escolhidos os antimicrobianos tetraciclina (30µg), ampicilina (10µg), gentamicina (10µg), cefoxitina (30µg), amoxicilina (30µg), ciprofloxacina (5µg), penicilina (10µg) e azitromicina (15µg) em virtude de terem ação em bactérias Gram negativas e por estarem disponíveis no mercado.



**Figura 6.** Agentes antimicrobianos escolhidos para avaliar o perfil de sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de fezes e *swabs* retais provenientes de peixes-bois da Amazônia. Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.4 SOROTIPAGEM

A identificação do sorotipo foi previamente realizada por testes de aglutinação em lâmina, com anti-soros específicos para *Salmonella* spp. produzidos no próprio laboratório de Enteropatógenos, do Instituto Adolfo Lutz, de acordo com metodologia padronizada de Popoff (2001). O crescimento de uma colônia em ágar nutriente foi testado, inicialmente, com solução fisiológica a 2,0% e, então, com anti-soros somáticos polivalentes e monovalentes, específicos para *Salmonella* spp.

Para a determinação dos antígenos flagelares, foi utilizado o crescimento bacteriano em meio semi-sólido *Svengard* testado com anti-soros flagelares polivalentes e monovalentes. O sorotipo foi definido pela associação dos resultados dos testes de aglutinação com os antígenos somáticos e flagelares de acordo com o esquema de White-Kauffmann-LeMinor (GRIMONT; WEIL, 2007). Este esquema contém informações quanto as espécies, subespécies e apresenta listadas as fórmulas antigênicas de todos os sorovares (BRASIL, 2011).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos ao teste exato de Fisher com o intuito de comparar dois métodos de coleta utilizados para a detecção de *Salmonella* spp, ao nível de significância de 5%. Os resultados foram submetidos à análise com a utilização do *software GraphPad InStat* versão 3.10. Ao final das análises os resultados foram tabelados e interpretados.

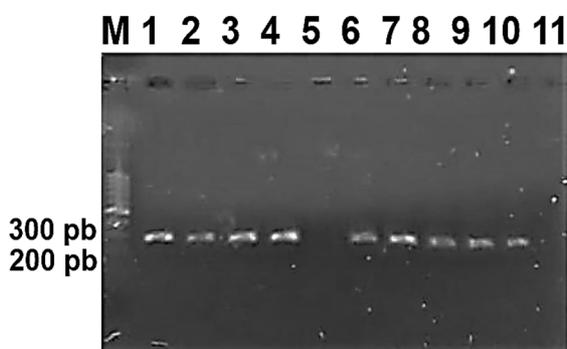
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 34 peixes-bois da Amazônia em que foram coletadas amostras de fezes e *swabs* retais, cinco apresentaram resultados positivos pelo isolamento bacteriológico e confirmação bioquímica, os animais A14, A20, A21, A22 e A23 (Tabela 1). Sendo identificados onze isolados do total de cinco animais, pois em algumas amostras foram observados um número maior de colônias com perfil característico de *Salmonella* spp.

Em relação à divisão dos animais nos criatórios, sabemos que a fêmea A20 estava dividindo a mesma piscina que a fêmea A21, sendo ambos filhotes; o macho A22 estava com a fêmea A23, sendo ambos filhotes; e a fêmea A14, que é juvenil, estava com mais três animais filhotes A15, A16 e A17, que não apresentaram resultados positivos para *Salmonella* spp.

Com isso, a identificação dos isolados foi realizado somente nas piscinas que alojavam filhotes. Sendo em sua maioria provenientes de peixes-bois dessa classe etária, exceto um que foi proveniente de uma fêmea juvenil que estava junto aos filhotes em razão de não ter se adaptado ao semi-cativeiro e encontrava-se em observação. Portanto, nos tanques exclusivos de animais juvenis e adultos não foram identificados isolados de *Salmonella* spp.

A confirmação das cepas isoladas foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Das onze cepas isoladas, nove apresentaram resultados positivos na PCR (Figura 7), confirmando a positividade de três animais A14, A20 e A22, e duas amostras não confirmadas foram de isolados únicos provenientes de dois animais A21 e A23. Com isso, a frequência de *Salmonella* spp. em filhotes foi de (16,6%; n=12); em juvenis (7,7%; n=13) e na classe etária de adultos não houve isolamento (0%; n=9).



**Figura 7.** Gel de agarose após eletroforese com os produtos amplificados com primers para *Salmonella* spp. Coluna M- marcador ladder 100 pb; coluna 1- animal 14 (cepa 1); coluna 2- animal 20 (cepa 2); coluna 3- animal 20 (cepa 3); coluna 4- animal 20 (cepa 4); coluna 5- animal 21 (cepa 5); coluna 6- animal 22 (cepa 6); coluna 7- animal 22 (cepa 7); coluna 8- animal 22 (cepa 8); coluna 9- animal 22 (cepa 9); coluna 10- animal 22 (cepa 10) e coluna 11- animal 23 (cepa 11). Fonte: Arquivo Pessoal.

**Tabela 1.** Resultado após a confirmação pela Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos peixes-bois (*Trichechus inunguis*) para isolamento de colônias de *Salmonella* spp. conforme a classe etária e sexo.

ANIMAIS	CLASSE		AMOSTRAS	ISOLADOS	
	ETÁRIA	SEXO		(N)	RESULTADO
A1	ADULTO	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A2	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A3	JUVENIL	M	SR	-	NEGATIVO
A4	ADULTO	M	SR	-	NEGATIVO
A5	ADULTO	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A6	ADULTO	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A7	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A8	JUVENIL	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A9	JUVENIL	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A10	ADULTO	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A11	ADULTO	F	SR	-	NEGATIVO
A12	JUVENIL	F	SR	-	NEGATIVO
A13	FILHOTE	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A14	JUVENIL	F	FZ	1	POSITIVO
A15	FILHOTE	M	FZ	-	NEGATIVO
A16	FILHOTE	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A17	FILHOTE	M	FZ	-	NEGATIVO
A18	FILHOTE	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A19	FILHOTE	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A20	FILHOTE	F	SR/FZ	3	POSITIVO
A21	FILHOTE	F	SR/FZ	1	NEGATIVO
A22	FILHOTE	F	SR/FZ	5	POSITIVO
A23	FILHOTE	M	SR/FZ	1	NEGATIVO
A24	FILHOTE	F	SR/FZ	-	NEGATIVO
A25	ADULTO	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A26	ADULTO	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A27	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A28	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A29	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A30	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A31	JUVENIL	F	FZ	-	NEGATIVO
A32	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A33	JUVENIL	M	SR/FZ	-	NEGATIVO
A34	ADULTO	M	SR/FZ	-	NEGATIVO

M= macho; F= fêmea; SR= *swab* retal; FZ= fezes.

Observou-se que os resultados não foram positivos em ambos os animais (A20 e A21) assim como (A22 e A23) que dividiam a mesma piscina, indicando que a presença de *Salmonella* spp. em um dos animais não contribuiu para a positividade dos outros animais. Em virtude dessa informação, supõem-se que os animais possivelmente adquiriram essa bactéria durante a vivência em ambiente natural, pois, os animais em cativeiro recebem a mesma alimentação, mesmo manejo e em alguns casos compartilham o mesmo ambiente. Uma outra ideia seria que a presença de *Salmonella* spp. poderia estar relacionada a uma característica individual da espécie, sendo assim, acredita-se que os animais foram expostos a infecção em algum momento, porém, em razão de estarem na condição de portares assintomáticos, não eliminaram a bactéria no momento exato das análises.

Apesar da metodologia convencional utilizar diversos meios seletivos e de caracterização bioquímica, estes resultados demonstram a importância da confirmação das cepas isoladas por métodos com maior especificidade.

Com relação ao resultado dos diferentes métodos de amostra para detecção de *Salmonella* spp. em peixes-bois, verificou-se que o A14 e A20 foram positivos apenas em amostras de fezes e o A22 foi positivo em amostra de fezes e *swab* retal. Apesar dos resultados apresentarem o maior isolamento de *Salmonella* spp. em fezes, ao comparar os dois métodos de coleta utilizados, conforme a (Tabela 2), em virtude do baixo número de amostras positivas não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,61$ ).

**Tabela 2.** Resultado dos diferentes métodos de coleta de amostra para detecção de *Salmonella* spp. em peixes-bois da Amazônia.

<b>Resultado</b>	<b>Swabs retais</b>	<b>Fezes</b>
Positivo	1 (3,33%)	3 (10%)
Negativo	29 (96,67%)	27 (90%)
Total de amostras	30	30

\*Não significativo pelo teste exato de Fisher ( $p=0,61$ ).

Sendo assim, o uso de apenas um método de coleta pode ser ineficaz para a realização do isolamento nesses animais, visto que as amostras de fezes podem apresentar certas limitações, como a baixa sensibilidade de uma única amostra para detectar a *Salmonella* spp. (VAN WINSEN et al. 2001) e pela excreção fecal intermitente de baixo número dessa bactéria

por portadores assintomáticos (GALLAND et al. 2000), podendo desencadear resultado falso negativo.

São raros os casos relatados de afecções bacterianas em peixes-bois da Amazônia. No Brasil, os agentes relatados em *T. inunguis* foram *Mycobacterium fortuitum*, *M. abscessus*, *Leptospira* spp. e *Salmonella* spp. (CORREA NETO et al. 2021; DELGADO, 2010; REISFELD et al. 2018). Os casos descritos de *Mycobacterium* spp. e *Leptospira* spp. coincidentemente são de animais mantidos em cativeiro. Reisfeld et al. (2018), isolaram *Mycobacterium* spp. em lesões de difícil cicatrização em *T. inunguis*. Delgado (2010) demonstrou que do total de 74 animais, 31,1% foram soropositivos a anticorpos anti-*Leptospira* spp. indicando que em algum momento de suas vidas os animais foram infectados pelo agente.

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. são naturalmente encontradas em diversas espécies de animais e podem se tornar patogênicas mediante a ocorrência de fatores estressantes ao hospedeiro (JOHNSON-DELANEY, 1996). Nesse sentido, sob o ponto de vista epidemiológico, é possível que um surto de salmonelose em peixes-bois cativos comprometa seriamente a saúde dos mesmos, uma vez que dependendo do sorotipo envolvido, dose infectante, idade do animal e resposta imune à infecção, a doença pode ser desencadeada com evolução para o óbito.

De acordo com Elliot et al. (1981), uma fêmea filhote da espécie dugongo (*Dugong dugon*), com aproximadamente 6 meses de idade, morreu vítima de salmonelose causada por *Salmonella* Lohbruegge, quando estava em um aquário marinho na Austrália. Uma das principais suspeitas foi o contato com humanos, visto que quatro crianças haviam nadado na piscina dos animais. Vergara-parente et al. (2003) identificaram um caso de *Salmonella enterica* sorovar Panama que desencadeou a morte de uma fêmea filhote de peixe-boi marinho antilhano (*Trichechus manatus manatus*) mantido em reabilitação, após o seu resgate na praia de Canoa Quebrada, no Ceará. Vorbach et al. (2017) isolaram uma cepa de *Salmonella enterica* sorotipo IV 50:z4,z23:- em um peixe-boi marinho da Flórida (*Trichechus manatus latirostris*) macho juvenil, encontrado morto na costa atlântica da Flórida. O animal veio a óbito após um quadro de salmonelose sistêmica. Correa Neto et al. (2021), realizaram o primeiro isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (rugosa) em uma fêmea filhote de peixe-boi-da Amazônia, que veio a óbito após cinco meses da ocorrência do seu resgate em afluentes do rio Capim, no Pará. No entanto, não há relatos sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em sirênios vivos e aparentemente sadios.

Após os testes de sorotipificação, os isolados foram identificados como *Salmonella enterica* subsp. *salamae* sorotipo II 42:r:- e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Javiana. Sendo este o primeiro relato de ocorrência desses sorotipos em peixes-bois da Amazônia.

*Salmonella enterica* subsp. *salamae* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Javiana foram descritas por Nunes et al. (2010) em jabutis-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) oriundos do tráfico de animais silvestres e mantidos em um Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) situado em Salvador, Bahia. Conforme Brenner et al. (2000), a subespécie *S. salamae* ocorre com frequência em répteis e no ambiente. Marin et al. (2013) realizaram o isolamento de *S. salamae* em tartarugas nativas da Espanha, cágado-de-carapaça-estriada (*Emys orbicularis*), onde as tartarugas foram capturadas em seu ambiente natural para a realização das coletas. De acordo com Hidalgo-Vila et al. (2007), as tartarugas podem ser consideradas um importante reservatório para *Salmonella* spp., podendo carrear diferentes sorotipos. Conforme Polo et al. (1999) em geral, o meio aquático é considerado favorável para a transmissão da *Salmonella* spp.

Portanto, essa subespécie já foi descrita em animais aquáticos e terrestres que vivem em ambiente natural e em cativeiro, sendo principalmente relatada em répteis, que são considerados animais reservatórios de *Salmonella* spp. e que podem carrear diferentes sorotipos de forma assintomática. Conforme esses estudos, podemos supor que os peixes-bois tenham adquirido essa bactéria em seu ambiente natural mediante o contato com répteis antes de serem resgatados e, com isso, devido ao baixo potencial patogênico, se tornaram reservatórios assintomáticos.

Quanto ao sorotipo Javiana, uma pesquisa realizada por Machado (2013) que identificou diferentes cepas de *Salmonella* spp. no Amazonas, demonstrou a presença do sorotipo Javiana em amostras de água, fezes de humanos e animais. Conforme o estudo, a água pode ter sido o fator indicativo da contaminação, devido a identificação de similaridade genética entre as cepas isoladas de *Salmonella* Javiana em afluentes do Igarapé Rio Pardo. Campos et al. (2020), isolaram pela primeira vez o mesmo sorotipo em amostras provenientes de *swabs* cloacais de juvenis de tracajá (*Podocnemis unifilis*), mantidos em dois parques zoológicos no Peru, com uma prevalência baixa 2,9% (2/68). O tracajá possui ampla distribuição em planícies tropicais do norte da América do Sul, nas bacias venezuelanas dos rios Orinoco e Amazonas, leste da Colômbia, leste do Equador, nordeste do Peru, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Bacia do Rio Amazonas, no norte do Brasil e norte da Bolívia (VOGT, 2008). A distribuição geográfica do *P. unifilis* apresenta uma correlação com o habitat natural do peixe-boi da Amazônia, pois

ambos podem ser encontrados na Bacia Amazônica. Cruz (2018), realizou o isolamento de *Salmonella* spp. em swabs cloacais de jacaretinga (*Caiman crocodilus fuscus*) capturados em seu habitat natural, demonstrando uma prevalência de 18,75% nas amostras (15/80). Entre os sorotipos identificados, observou-se a presença da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Javiana.

Conforme esses estudos, os dois sorotipos identificados neste trabalho já foram isolados em animais, ambientes aquáticos, ocasionalmente em humanos e já foram encontrados em animais mantidos em centros de reabilitação como também em vida livre. Desta forma, é provável se tratar de uma bactéria comensal de baixo potencial patogênico, adquirida no ambiente aquático, por contato com outros animais ou durante a sua vida em ambiente natural. O isolamento ocorreu apenas nas piscinas que alojavam os animais filhotes, provavelmente por serem animais recém-chegados, que apresentam uma microbiota entérica diferente dos animais que estão mais tempo em cativeiro.

Apesar do isolamento de cepas de *Salmonella* spp. em amostras de fezes e swabs retais, os animais estiveram saudáveis durante todo o período de execução do experimento, onde foram acompanhados pelos médicos veterinários do Inpa (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Não manifestando os sintomas de infecção característicos de salmonelose em sirênios, descritos por Elliot et al. (1981) e Correa Neto et al. (2021) como diarreia, desidratação, apatia, letargia e anorexia.

Na Tabela 3 constam os resultados do antibiograma das bactérias isoladas de três peixes-bois da Amazônia, sendo possível observar os valores dos diâmetros dos halos de inibição com os respectivos valores de sensibilidade interpretados conforme o Manual para Antibiograma (LABORCLIN, 2011). Os resultados da avaliação do perfil de sensibilidade antimicrobiana demonstraram que a cepa 1 apresentou resistência aos antibióticos amoxicilina (30µg), cefoxitina (30µg) e ampicilina (10 µg). Todas as cepas demonstraram resistência à penicilina (10µg), sendo, portanto, descartado sua utilização para um possível tratamento dos animais. As cepas 2 e 6 apresentaram resistência em comum aos seguintes antibióticos: azitromicina (15µg), amoxicilina (30µg), cefoxitina (30µg) e ampicilina (10 µg). As cepas 3, 4, 7, 8, 9 e 10 não apresentaram resistência intrínseca aos antibióticos β-lactâmicos, o que é uma característica intrínseca de *Salmonella* spp. (LABORCLIN, 2011). No entanto, as cepas 1, 2 e 6 que apresentaram resistência aos antibióticos β-lactâmicos e foram confirmadas como *Salmonella* spp., provavelmente desenvolveram mecanismos de resistência antimicrobiana.

A forma mais comum de resistência em bactérias Gram negativas é a produção de enzimas específicas denominadas  $\beta$ -lactamases que inativam os anéis  $\beta$ -lactâmicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

**Tabela 3.** Diâmetro do halo de inibição em milímetros\* dos antimicrobianos frente as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras obtidas de fezes e *swabs* retais de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro.

Cepas	Antimicrobianos							
	TET	AMP	GEN	CFO	AMC	CIP	PEN	AZI
1 (A14)	23* (S)**	Ø (R)	21 (S)	8 (R)	9 (R)	32 (S)	Ø (R)	15 (I)
2 (A20)	20 (S)	Ø (R)	21 (S)	8 (R)	9 (R)	32 (S)	Ø (R)	13 (R)
3(A20)	19 (S)	23 (S)	21 (S)	25 (S)	26 (S)	31 (S)	Ø (R)	17 (I)
4 (A20)	22 (S)	23 (S)	20 (S)	22 (S)	23 (S)	31 (S)	Ø (R)	15 (I)
6 (A22)	20 (S)	Ø (R)	20 (S)	Ø (R)	Ø (R)	25 (S)	Ø (R)	13 (R)
7 (A22)	20 (S)	23 (S)	22 (S)	21 (S)	21 (S)	31 (S)	Ø (R)	16 (I)
8 (A22)	22 (S)	24 (S)	23 (S)	26 (S)	28 (S)	33 (S)	Ø (R)	16 (I)
9 (A22)	20 (S)	28 (S)	21 (S)	25 (S)	25 (S)	32 (S)	Ø (R)	16 (I)
10 (A22)	23 (S)	25 (S)	23 (S)	25 (S)	26 (S)	33 (S)	Ø (R)	17 (I)

**TET-** tetraciclina (30 $\mu$ g), **AMP-** ampicilina (10 $\mu$ g), **GEN-** gentamicina (10 $\mu$ g), **CFO-** cefoxitina (30 $\mu$ g), **AMC-** amoxicilina (30 $\mu$ g), **CIP-** ciprofloxacina (5 $\mu$ g), **PEN-** penicilina (10 $\mu$ g) e **AZI-** azitromicina (15 $\mu$ g).

\*\*S: sensível; I: intermediário; R: resistente

As cepas isoladas apresentaram maiores índices de sensibilidade ao uso de tetraciclina, gentamicina e ciprofloxacina (Figura 8), sendo esses os antimicrobianos indicados para um possível tratamento, caso fosse necessário. As tetraciclina são antibióticos bacteriostáticos, que atuam na inibição da síntese proteica, bloqueando as atividades ribossômicas e, por serem utilizadas anteriormente como medicamento profilático, é comum o desenvolvimento de resistência. A gentamicina pertence à classe de aminoglicosídeos, que são antibióticos bactericidas, ativos principalmente contra bactérias Gram negativas e atuam inibindo a síntese proteica. A ciprofloxacina pertence à classe de quinolonas, são bactericidas, atuam principalmente em casos de infecções entéricas, inibindo a síntese de ácido nucléico pelo bloqueio da DNA-girase (QUINN et al. 2005).

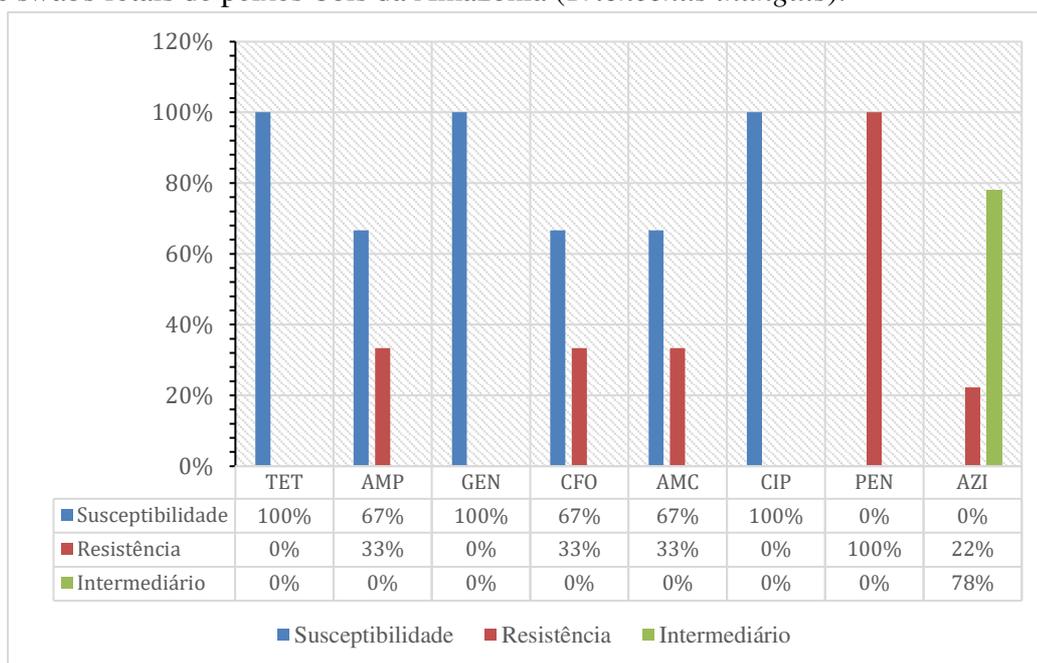
A susceptibilidade de 100% das cepas isoladas frente à tetraciclina diferiu dos resultados apresentados por Campos et al. (2020), que isolaram pela primeira vez o sorotipo Javiana em amostras de *swabs* cloacais provenientes de tracajás (*Podocnemis unifilis*), demonstrando uma resistência de 33% ao agente antimicrobiano tetraciclina. No entanto, a susceptibilidade de

100% frente a gentamicina corroborou com os resultados deste trabalho, que também demonstrou susceptibilidade de 100%.

Em um estudo realizado por Sturm et al. (2011), sobre o isolamento de *Salmonella enterica* em espécies de leão-marinho-do-sul (*Otaria flavescens*), as cepas demonstraram susceptibilidade a diferentes antimicrobianos incluindo a tetraciclina e ciprofloxacina. Os animais não apresentavam sinais clínicos de doença, contudo, foram coletadas amostras de *swabs* retais durante o processo de reabilitação em um parque zoológico no Chile, para posterior soltura dos animais.

A susceptibilidade das cepas de *Salmonella enterica* frente a gentamicina e ciprofloxacina, também corrobora com os resultados de Grattarola et al. (2019), que realizaram o primeiro isolamento de *Salmonella enterica* sorotipo 1,4,[5],12:i:- em espécies de golfinho-riscado (*Stenella coeruleoalba*) encontrados encalhados ao longo do Mar da Ligúria, na Itália.

**Figura 8.** Perfil de sensibilidade (%) antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de fezes e *swabs* retais de peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*).



Portanto, o perfil de sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. frente aos antimicrobianos apresentaram resultados em sua maioria semelhantes aos encontrados na literatura sobre o isolamento de cepas de *Salmonella* spp. em animais aquáticos. O perfil de resistência apresentado em alguns resultados demonstra uma certa preocupação pois, segundo Abdeen et al. (2018), a maioria dessas resistências a medicamentos podem ser atribuída ao

armazenamento de genes de resistência múltipla, em virtude da presença comum de plasmídeos R em *Salmonella* spp., podendo representar um perigo para a saúde quando transmitidos a seres humanos e outros animais.

De acordo com Quinn et al. (2005), o uso de antibióticos em casos de salmonelose deve ser avaliada criteriosamente, pois existe o risco de desencadear distúrbios na microbiota intestinal normal, prolongar a excreção de salmonelas e aumentar a probabilidade de desenvolvimento de resistência.

## 5 CONCLUSÕES

Foram isoladas pela primeira vez cepas de *Salmonella* spp. em amostras de fezes e *swabs* retais provenientes de três peixes-bois da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidos em cativeiro, sendo dois filhotes e um juvenil, ambos do sexo feminino. As cepas foram identificadas como *Salmonella enterica* subsp. *salamae* sorotipo II 42:r:- e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Javiana. O maior número de isolados foi obtido a partir de amostras de fezes, no entanto devido ao baixo número de amostras positivas, não houve diferença significativa entre os dois métodos de coleta. Os isolados apresentaram maior susceptibilidade aos agentes antimicrobianos tetraciclina, gentamicina e ciprofloxacina.

## REFERÊNCIAS

ABDEEN, E.; ELMONIR, W.; SUELAM, I. I. A.; MOUSA, W. S. Antibigram and genetic diversity of *Salmonella* enterica with zoonotic potential isolated from morbid native chickens and pigeons in Egypt. **Journal of Applied Microbiology**. v. 124. p. 1265-1273, 2018.

AMARAL, R. S.; DA SILVA, V. M. F.; ROSAS, F.C.W. Body weight/length relationship and mass estimation using morphometric measurements in Amazonian manatees *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). **Marine Biodiversity Records**, v. 3, p. 1-4, 2010.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, 1966.

BEST, R. C. The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. *In*: SIOLI, H. The Amazon, Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin. 1 ed. **Dr. Junk Publishers**, p. 371-412, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Brasília: **Ministério da Saúde**, 60p, 2011.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38. p. 2465-2467, 2000.

CAMPOS N., A.; MORALES-CAUTI, S.; NAVARRO O., A.; ESLAVA C., C. Detecção de *Salmonella* Javiana em tartarugas (*Podocnemis unifilis*) em dois parques zoológicos do Peru. **Rev Inv Vet**, Peru, 2020.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. m100-s21th. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2011.

CORREA NETO, J. J. et al. Salmonelose em um filhote de peixe-boi-da-Amazônia (*Trichechus inunguis*). **Cienc. Rural**, v. 51, 2021.

CRUZ, M.E.L. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp., de jacaretinga (*Caiman crocodilus fuscus*) em seu habitat natural (Represa hidroprado), departamento de Tolima. 2018.

Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Ibagué, Tolima, 2018.

DA SILVA, V. M. F. et al. Mamíferos Aquáticos da Amazônia. 1º Edição. **Editora INPA**, 63p, 2019.

DELGADO, P M. Detecção sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Leptospira* spp. em peixes-bois (*Trichechus inunguis*) de dois centros de preservação da Amazônia brasileira. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

DOMNING, D. P. Commercial exploitation of manatees *Trichechus* in Brazil. **Biological Conservation**, p. 101-126, 1982.

DOMNING, D. P. Distribution and status of manatees *Trichechus* spp. near the mouth of the Amazon river, Brazil. **Biological Conservation**, p. 85-87, 1981.

ELLIOTT, H.; THOMAS, A.; LADSS, P. W.; HEINSOHN, G. E. A fatal case of salmonellosis in a dugong. **Journal of wildlife Diseases**, v. 17, p. 203-208, 1981.

GALLAND, J. C. et al. Prevalence of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and Elisa serology. **Veterinary Microbiology**. p. 143-151, 2000.

GRATTAROLA, C. et al. Primeiro relato de *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- em golfinhos riscado em liberdade, Itália. **Scientific Reports**, p. 1-14, 2019.

GRIMONT, P.A.D; WEIL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France, 166p, 2007.

HIDALGO-VILA, J; DÍAZ-PANIAGUA, C; DE FRUTOS-ESCOBAR, C; JIMENEZ-MARTINEZ, C; PÉREZ-SANTIGOSA, N. *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. **Vet Microbiol**, p. 311-315, 2007.

ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília, ed. 1, v. 1, 492p, 2018.

ICMBIO. Plano de ação nacional para a conservação dos sirênios: peixe-boi-da- Amazônia: *Trichechus inunguis* e peixe-boi-marinho: *Trichechus manatus*. Brasília. 2011. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2021.

JOHNSON-DELANEY, C. A. Reptile zoonoses and threats to public health. In: MARDER, D.R. (Ed) **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia, 512 p, 1996.

LABORCLIN. Manual para antibiograma: Difusão em disco (Kirby & Bauer). 29p, 2011.

MACHADO, A. S. R. Caracterização fenotípica e genotípica de salmonelas isoladas de área rural e urbana de Manaus, Amazonas. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MARIN C, INGRESA-CAPACCIONI S, GONZÁLEZ-BODI S, MARCO-JIMENÉZ F, VEGA S. Free-living turtles are a reservoir for *Salmonella* but not *Campylobacter*. **Plos One**. ed 8, p. 1-6, 2013.

MARMONTEL, M; DE SOUZA, D; KENDALL, S. *Trichechus inunguis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2016.

NUNES, O. C. et al. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. de jabutis-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) oriundos do tráfico de animais silvestres. **Ci. Anim. Bras.** v. 11, p.168-173, 2010.

POLO, F.; FIGUERAS, M.J.; INZA, I. et al. Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. **Antonie Leeuwenhoek**. v.75, n.4, p.285–292, 1999.

POPOFF, M. Y. Guidelines for the preparation of *Salmonella* antisera. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris France, ed. 6, 2001.

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

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**, London, v.6, p.271–279, 1992.

REISFELD, L. et al. Cutaneous mycobacteriosis in a captive Amazonian manatee *Trichechus inunguis*. *Diseases of aquatic organisms*. v. 127, p.231-236, 2018.

SANTOS, L. R. et al. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. p. 87-92, 2001.

- SILVA, M. et al. Identification of bacteria in blood cultures from clinically ill captive antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 48 (1), p.13- 17. 2017. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1638/2015-0094.1>. Acesso em: 17 mar. 2021.
- STURM, N. et al. *Salmonella enterica* em pinípedes, Chile. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, p. 2377, 2011.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. In:Microbiologia. Porto Alegre:Artmed, ed. 10, 2012.
- VAN WINSEN, R. L. et al. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. **Veterinary Microbiology**. p. 267-274, 2001.
- VERGARA-PARENTE, J. E. et al. Salmonellosis in na Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) calf: a fatal case. **Aquatic Mammals**, v. 29.1, p. 131-136, 2003.
- VOGT, R. C. Tartarugas da Amazônia. Brasília: **INPA**, 1ed, 2008.
- VORBACH, B. S. et al. Fatal systemic salmonellosis in a Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*). **Journal of wildlife Diseases**, v. 53, 2017.