



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO
POR *Leptospira* spp. EM ANIMAIS SILVESTRES E EM
ROEDORES PROCEDENTES DO CENTRO DE
CONSERVAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE DE ILHA
SOLTEIRA-SP**

MIRIAN DOS SANTOS PAIXÃO

Botucatu-SP

2013

MIRIAN DOS SANTOS PAIXÃO

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO
POR *Leptospira* spp. EM ANIMAIS SILVESTRES E EM
ROEDORES PROCEDENTES DO CENTRO DE
CONSERVAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE DE ILHA
SOLTEIRA-SP**

**Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade de
Medicina de Botucatu/UNESP para
obtenção de título de mestre.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Simone Baldini Lucheis

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti

Botucatu-SP

2013

Dedicatória

A meus pais José Augusto e Marisa, por sempre me ensinarem que entregando os nossos sonhos nas mãos de Deus e indo a luta, independente das circunstâncias, eles sempre se realizarão. Palavras não seriam suficientes para descrever tudo o que representam para mim e o quanto amo vocês.

Agradecimentos

A Deus, a razão da minha existência, pela força e sabedoria que me fizeram perseverar em busca dos meus objetivos.

Aos minha irmã Josiane, pelo carinho, palavras de incentivo e pelas orações.

Ao meu irmão Jessé Augusto, pela ajuda e paciência na formatação da dissertação.

As minhas avós Bia e Josefa, pelo exemplo de fé e por sempre se lembrarem de mim em suas orações, sei que esse é o motivo da realização de mais essa etapa.

Aos meus tios,tias, primos e primas, pelo exemplo de família e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu namorado André Vicente da Silva, um presente de Deus na minha vida, muito obrigada pelo amor, carinho e paciência.

Aos amigos da graduação: Keila, Sirlene, Cintia, Cristiane e André, apesar da distância nunca me esquecerei das risadas e bons momento que vivemos juntos.

A minha orientadora Simone Baldini Lucheis, pela confiança em me orientar, pela paciência e dedicação durante cada etapa desse trabalho.

A minha co-orientadora Wilma Aparecida Starke Buzetti, pelo exemplo de pessoa e profissional, que me incentivou seguir o caminho da pesquisa.

Aos amigos do laboratório de doenças tropicais: Francilene, Mariana Gatto, Mariana Miziara, Eliana, Karen, Andréia, Gustavo, Tatiane, Priscila, Adriele, Vanessa e Leonardo, pela ajuda, conversas e boas risadas .

A prof^a Sueli Calvi, responsável pelo laboratório de doenças tropicais, por sempre estar disposta a ajudar .

Ao Rodrigo Mattos dos Santos, pela grande ajuda e paciência na finalização do trabalho.

Aos funcionários do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira: Mário, Adão, Ezequiel, Marcelo, Roberto, Bruno, Antonio, Maria, Antonia, Neusa, Carlos, ao biólogo Rodrigo e ao veterinário Lúcio, pela receptividade e imensa ajuda, sem a colaboração de vocês seria impossível a realização deste trabalho....muito obrigada.

Aos alunos, orientados da prof^a Wilma do laboratório de Imunoparasitologia de Ilha Solteira: Diogo, Maria Luana, Andréia, Marina e Aline, pela ajuda durante as coletas.

Aos funcionários e pós-graduandos do hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, por permitirem o uso do laboratório.

Aos professores: Hélio Langoni e Antoni Carlos Paes, pelas valiosas correções e sugestões no exame de qualificação.

Aos amigos e irmãos de coração: Nair, Jaime, Val e Sandro, por cuidarem com carinho dos meus pais nos momentos que estive ausente, agradecem a Deus pelas vossas vidas.

A minha amiga-irmã Maria Fernanda Alves Martins, pela coragem de enfrentar juntamente comigo os desafios do sonho de realizar o mestrado, pela grande ajuda no início do mestrado, sei que poucas pessoas fariam o que você fez por mim, serei sempre grata, pelos momentos de descontração e conversas, esses anos jamais serão esquecidos.

A grande amiga-irmã Tamiris Desidério, ter conhecido essa pessoa é um dos motivos que posso dizer que o mestrado realmente valeu a pena, muito obrigada por sempre estar disposta a ajudar no que fosse preciso.

A “dona” Maria por me acolher com tanto carinho em sua casa.

A Priscila pela boa convivência, durante o tempo que moramos juntas.

Ao Rodrigo Costa da Silva pela grande ajuda, paciência e por compartilhar valiosos conhecimentos.

A todos funcionários dos laboratórios experimentais da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela ajuda e amizade

A CAPES pela bolsa concedida para realização do mestrado

Aos residentes e pós-graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública: Diego, Carla, Dani e Guido, pela ajuda com as minhas “filhas” letospiras.

Aos funcionários da APTA, pela ajuda durante parte da realização do trabalho.

Agradeço a todos que com palavras, gestos e orações contribuíram para realização desse sonho.

“São tantas bênçãos, tantos motivos que o meu coração não consegue guardar. Tantos milagres e livramentos que Tu Grande Deus realizaste em mim. Precisaria de mais de uma noite, mais que uma madrugada até, para Te dizer: Rendo graças a Ti. Meu coração agradece por tudo o que fizeste. Eu louvo o Teu nome e sempre dou graças a Ti.”

Raquel Mello

RESUMO

A leptospirose é uma enfermidade infecto-contagiosa causada por diversas cepas da bactéria *Leptospira interrogans*, as quais infectam animais domésticos, silvestres e o homem. Os animais silvestres podem exercer papel fundamental na epidemiologia da doença, devido a grande disseminação de leptospirosas para o meio ambiente e a possibilidade de infecção entre os animais e o homem, constituindo-se, portanto, em uma importante zoonose. Quando esses animais vivem em cativeiro, como em zoológicos, a infecção e a disseminação de patógenos podem ocorrer entre os animais silvestres do próprio zoológico, animais sinantrópicos, funcionários e o público visitante. Com o intuito de conhecer melhor a ocorrência e epidemiologia da leptospirose em animais silvestres e também em roedores sinantrópicos comensais, que co-habitam o local, foi realizado um estudo com animais em cativeiro e de vida livre, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira- SP (CCFS). Foram colhidas amostras sanguíneas de 41 animais em cativeiro e de 59 animais de vida livre, assim como 13 amostras de rim e fígado de ratos. As técnicas diagnósticas utilizadas foram a Soroaglutinação Microscópica (SAM), Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. e cultivo de rim e fígado de ratos em meio de Fletcher. Pela SAM obteve-se 89 (89%) amostras positivas para um ou mais sorovares de *Leptospira* spp.; com prevalência do sorovar Andamana. Para a pesquisa do agente em fragmentos de fígado e rim dos ratos, 13 amostras de cada tecido foram cultivadas em meio de Fletcher, apresentando sete (53,8%) amostras positivas, sendo três amostras de rim e quatro de fígado e todos os animais com sorologia positiva. Pela técnica de PCR a partir do sangue dos animais de vida livre e em cativeiro 38 animais (38%) foram positivos para *Leptospira* spp., a partir de órgãos (rim e fígado) dos roedores sinantrópicos nove (69,2%) animais foram positivos e a partir da cultura de órgãos dos roedores obteve-se uma positividade de 30,8%. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se observar a ocorrência da infecção leptospírica entre os animais, sendo necessária a adoção de medidas profiláticas para o controle desta zoonose no local.

ABSTRACT

Leptospirosis is a disease caused by various strains of the spirochete bacterium *Leptospira interrogans*, which can infect domestic and wildlife animals, as well humans. Wild animals may play a key role in the epidemiology of the disease, due to the large spread of leptospire into the environment and the possibility of infection between animals and man, becoming therefore an important zoonosis. When these animals live in captivity in zoos, the infection and spread of pathogens can occur between the wild animals of the zoo itself, synanthropic animals, employees and visitors. In order to better understand the occurrence and epidemiology of leptospirosis in wild animals and in synanthropic rodents, which co-inhabit the place, a study was conducted with free-living animals and in captivity, found in Wild Fauna Conservation Center from Ilha Solteira-SP. Blood samples were collected from 41 animals in captivity and 59 free-living animals, as well as 13 samples of kidney and liver of rats. The diagnostic techniques used were the Microscopic Agglutination Test (MAT), the Polymerase Chain Reaction (PCR) and cultivation in Fletcher medium. MAT was positive in 89 (89%) samples for one or more serovars of *Leptospira* spp., with prevalence of serovar Andamana. For the research of agent into fragments of liver and kidney of rodents, 13 samples of each fragment were grown in Fletcher medium, with seven (53,8%) positive samples (three kidney samples and four liver samples). All rats were reactive by MAT. Related to PCR from the blood of free-living animals and in captivity, 38 animals (38%) were positive for *Leptospira* spp.; nine rodents (69,2%) presented positive fragments at PCR and four animals (30,8%) presented positive samples of the culture of the fragments at PCR for *Leptospira* spp. According to the results, we observed the occurrence of infection among the animals, needing the adoption of prophylactic measures to control this zoonosis in this place.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Imagem de satélite do município de Ilha Solteira/SP. O Centro de Conservação da Fauna Silvestre, é representado pelo contorno (amarelo). Fonte: <http://earth.google.com.br>. Botucatu, SP, 2013.40
- Figura 2** – Procedimento de contenção para animais em cativeiro. A- Contenção química em um Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*). B-Contenção Física. Botucatu, SP, 2013.42
- Figura 3** – Captura de roedor sinantrópico (*Rattus spp.*), com a utilização de armadilhas. Botucatu, SP, 2013.43
- Figura 4** – Captura de gambá (*Didelphis albiventris*), com a utilização de armadilhas. Botucatu, SP, 2013.43
- Figura 5** - Mapa ilustrativo do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, com a localização dos recintos dos animais estudados. As estrelas marcam a posição onde as armadilhas foram colocadas para captura dos roedores. Botucatu, SP, 2013.44
- Figura 6** - Teiú (*Tupinambis merinae*) capturado com a utilização de puçá. Botucatu, SP, 2013.45
- Figura 7** – Procedimento de colheita de sangue em um Cachorro do Mato (*Cerdocyon thous*). Botucatu, SP, 2013.46

Figura 8 - Colheita de sangue em animais de vida livre. A- roedor sinantrópico (*Rattus* spp.). B- teíu (*Tupinambis merianae*). Botucatu, SP, 2013.....47

Figura 9 - Retirada de fígado e rins de roedor sinantrópico (*Rattus* spp.) capturado no interior do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira (CCFS), para a realização da técnica de isolamento de leptospiras em meio de cultura Fletcher. Botucatu, SP, 2013.....49

Figura 10- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores LEP 1 e LEP 2 de 331 pares de base para *Leptospira* spp. em amostras de sangue positivas de espécies avaliadas do Centro de Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira-SP, pm= marcador de peso molecular, + = controle positivo, 1(bugio), 2 (mão pelada), 3= (cachorro do mato), 4 (macaco prego), 5 (queixada), 6 (cateto), 7 (cotia), 8 (gambá), 9 (tatu), 10 (teiú), 11 (rato), - (controle negativo).61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação de animais em cativeiro e quantidade de animais estudados, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.41

Quadro 2 - Relação de animais de vida livre e quantidade dos animais estudados do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.41

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Número de roedores sinantrópicos positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP,. Botucatu,SP,2013.....66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Espécies de animais em cativeiro avaliados reagentes á técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e respectivos sorovares reagentes para leptospirose, dentre as 41 amostras testadas. Botucatu, SP, 2013.56
- Tabela 2** - Animais de vida livre avaliados á técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e respectivos sorovares reagentes para leptospirose, dentre as 59 amostras testadas. Botucatu, SP, 2012.57
- Tabela 3** - Distribuição em porcentagem, dos 29 sorovares positivos à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose e a variação do título para cada sorovar testado nos animais do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.....58
- Tabela 4** - Distribuição de sete ratos positivos á cultura em meio de Fletcher, segundo o órgão examinado. Botucatu, SP, 2013.59
- Tabela 5** - Roedores que apresentaram zona de Dinger á cultura em meio de Fletcher. Botucatu, SP, 2013.....60
- Tabela 6** - Relação de animais de vida livre positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., a partir de amostras de sangue, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP,, Botucatu, SP, 2013.61
- Tabela 7** - Relação de animais em cativeiro positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., a partir de amostras de sangue, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP,, Botucatu, SP, 2013.62
- Tabela 8** - Relação de roedores positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir da cultura de órgãos, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.....63

Tabela 9 - Relação de roedores positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de órgãos, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, Botucatu, SP, 2013.....	64
Tabela 10 - Relação entre as provas diagnósticas realizadas em roedores sinantrópicos (<i>Rattus spp.</i>) procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.....	65
Tabela 11 - Relação entre as provas diagnósticas realizadas em animais de vida livre procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.	67
Tabela 12 - Relação entre as provas diagnósticas realizadas em animais de cativeiro procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.	68
Tabela 13 - Valores de sensibilidade e especificidade relativa comparando Sororoglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em animais procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.	69
Tabela 14 - Valores de sensibilidade e especificidade relativa comparando Sororoglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em roedores capturados no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.	70
Tabela 15 - Valores de sensibilidade e especificidade relativa comparando Sororoglutinação Microscópica (SAM) e Cultura em meio de Fletcher em roedores capturados no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013	70

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Local de Estudo	39
3.2. Autorização para Realização do Estudo	40
3.3. Espécies Avaliadas.....	41
3.4. Contenção dos animais	42
3.4.1. Animais em cativeiro.....	42
3.4.2. Animais de vida livre.....	42
3.4.2.1. Roedores sinantrópicos, gambás e cotias	42
3.1.1.1. Tatus e Teiús	45
3.5. Colheita de amostras biológicas	46
3.5.1. Sangue	46
3.5.1.2 Animais em cativeiro.....	46
3.5.1.3 Animais de vida livre.....	47
3.5.2. Órgãos.....	48
3.6. Locais de execução dos procedimentos laboratoriais	49
3.7. Provas diagnósticas.....	50
3.7.1. Soroaglutinação microscópica (SAM).....	50

3.7.2.	Cultura em meio de Fletcher®.....	51
3.7.3.	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp.....	51
3.7.3.1.	Preparo das amostras para a extração do DNA	51
3.7.3.1.1.	Sangue e Culturas	51
3.7.3.1.2.	Órgãos.....	52
3.7.3.1.3.	Amplificação do DNA.....	52
3.7.3.1.4.	Eletroforese	52
3.7.4.	Controles	53
3.7.4.1.	Sangue e Culturas	53
3.7.4.2.	Órgãos.....	53
3.8.	Análise Estatística.....	
4.	RESULTADOS	56
4.1.	Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM).....	56
4.2.	Cultura em meio de Fletcher®.....	59
4.3.	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para <i>Leptospira</i> spp.....	60
4.3.1.	Sangue	60
4.3.2.	Cultura	62
4.3.3.	Órgãos.....	63
4.4.	Relação entre as técnicas diagnósticas utilizadas.....	64
4.4.1.	Roedores	64
4.4.2.	Demais espécies de vida livre	66

4.5.	Análise Estatística	68
5.	DISCUSSÃO	72
5.1.	Local	72
5.2.	Provas diagnósticas.....	74
5.2.1.	Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	74
5.2.2	Cultura em meio de Fletcher	81
5.2.3	Reação em Cadeia pela Polimerase	82
5.2.4.	Relação entre as provas diagnósticas	83
6.	CONCLUSÕES	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9.	ANEXOS	105
1.	Autorização do Cômite de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal para realização do Estudo.....	105
2.	Autorização do IBAMA para realização do estudo.	106
3.	Autorização da Companhia Energética de São Paulo para realização do estudo.....	107
4.	Protocolo de extração e purificação de DNA de Leptospira spp. de sangue dos animais estudados utilizando kit comercial Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®), segundo o manual do fabricante.....	105
5.	Protocolo de extração e purificação de DNA de Leptospira spp. dos fragmentos de fígado e rim de Rattus spp. analisados utilizando kit comercial Illustra™ tissue & cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®), segundo o manual do fabricante.....	109

10. APÊNDICES.....112

1. Relação dos sorovares reagentes nos 41 animais em cativeiro avaliados do Centro De Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira –SP.....112

2. Relação dos sorovares reagentes nos 59 animais de vida livre avaliados do Centro De Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira –SP.....115

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A maioria das recentes emergências de doenças infecciosas são causadas por mudanças nas interações ecológicas entre patógenos e hospedeiros (1,2). Tais mudanças podem ser naturais ou de origem antropogênica, incluindo expansão das atividades humanas e fronteiras agropecuárias, fragmentação de hábitat, poluição, entre outras (3). Essas mudanças ecológicas permitem o aumento do contato entre espécies de patógenos e novas populações de hospedeiros e a seleção natural pressiona para a dominância de patógenos que se adaptem a essas novas condições ambientais (2).

De fato, 61% de todos os patógenos humanos são classificados como zoonoses (4), ou seja, são doenças transmitidas dos animais para os seres humanos. A preocupação é que estas infecções possam espalhar-se amplamente entre populações humanas depois de introduzidas e possam atingir diferentes espécies de animais reservatórios.

Os animais silvestres da fauna brasileira estão localizados na natureza (vida silvestre) ou em cativeiro, vivendo em parques zoológicos (zoos), criadouros conservacionistas, científicos ou comerciais, institutos de pesquisa, centros de triagem e reabilitação ou em residências, criados ilegalmente como animais de estimação (5). Tais animais podem ser reservatórios e portadores de zoonoses, tais como a leptospirose. Estudos têm demonstrado que os animais silvestres ocupam

papel relevante na epidemiologia da leptospirose, principalmente pequenos mamíferos, atuando como reservatórios de diversos sorovares (6).

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete animais domésticos, silvestres e o homem. Assume caráter epidêmico em determinadas regiões, com maior frequência em países tropicais e em desenvolvimento (7), acarretando com isto sérios problemas sócio-econômicos. Foi primeiramente descrita em 1886 por Adolf Weil. O agente etiológico da doença é representado por espiroquetas patogênicas, pertencentes à Ordem Spirochaetales, Família Leptospiraceae e Gênero *Leptospira*. São microorganismos aeróbios obrigatórios, helicoidais, flexíveis e móveis que medem de 6 a 20 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro. Apresentam as extremidades dobradas ou em forma de ganchos e são constituídas por um corpo citoplasmático e filamento axial enrolados em espiral, sendo ambos envolvidos por uma membrana denominada envelope ou membrana envolvente, e uma camada de peptideoglicano formando um complexo basal semelhante ao de uma bactéria Gram-negativa, contudo com baixa atividade endotóxica (8,9, 10, 11).

Anteriormente o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies:

Leptospira interrogans, apresentando uma variação antigênica caracterizada por 23 sorogrupos e 202 sorotipos (12), que englobava um grande número de variedades antigênicas, e *Leptospira biflexa*, variedades de comportamento saprófita de vida livre presentes em água doce de superfície, distribuídas em 38 sorogrupos e 65 sorotipos (13). Essa divisão baseava-se em critérios estritamente

relacionados a reações sorológicas relativamente específicas, que forneciam os sorogrupos e os sorovares de leptospiros patogênicas e saprófitas. A identificação dos sorotipos só era possível pelo emprego da técnica de absorção cruzada de aglutininas, executada por laboratórios de referência (14).

Na reunião do Subcomitê de Taxonomia realizada em 2007 em Quito, Equador, as espécies de leptospiros foram reclassificadas e divididas em 13 espécies patogênicas (*L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. wielli* e *L. wolffii*) e seis saprófitas (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielli* e *L. wolbachii*) (15).

As variantes da bactéria não possuem especificidade por determinados hospedeiros, mas possuem certas preferências. Por exemplo, o sorogrupo Icterohaemorrhagiae é o mais importante em termos de saúde pública; já o sorogrupo Pomona tem tropismo pelos suínos e o Hardjo, por bovinos. O sorogrupo Icterohaemorrhagiae tem como hospedeiro preferencial o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), considerado o principal transmissor da leptospirose para o homem, pela proximidade e por existir em grande número. Os roedores das espécies *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo) também podem desempenhar o papel de transmissores (16).

Mais de 500 mil casos de leptospirose severa são reportados anualmente no mundo (17). A leptospirose humana é uma doença de notificação compulsória no

Brasil, onde no período entre 1997 a 2012 foram confirmados 53.923 casos com 5.664 óbitos (18). Apenas nos Estado de São Paulo no mesmo período de 1986 a 2013 foram confirmados 18.447 casos sedo que destes 3.285 vieram á óbito (19). A taxa de mortalidade da doença de Weil (forma grave) e da síndrome hemorrágica pulmonar severa é de 10% e 74%, respectivamente (20). Alguns estudos sugerem que a leptospirose pode representar entre 20 a 40% das doenças febris de origem desconhecida (21). Esta prevalência é subestimada devido à baixa sensibilização da comunidade médica, da ausência de sintomas específicos e da disponibilidade de testes diagnósticos, além do fato de alguns pacientes apresentarem a forma branda da doença, não procurando assistência médica (17).

A penetração da *Leptospira spp.* ocorre pelas mucosas, lesões na pele ou mesmo na pela pele íntegra, seguindo-se sua multiplicação no sangue e praticamente em todos os órgãos e tecidos (22). As manifestações clínicas da leptospirose variam conforme a espécie animal, a susceptibilidade individual, a patogenicidade e a virulência do sorovar envolvido (23,24). Após a penetração da bactéria no organismo susceptível, o microorganismo dissemina-se pela corrente sanguínea, atingindo todos os órgãos (25). O período de incubação geralmente é em torno de 5 a 14 dias, porém têm sido descrito períodos mais curtos ou longos, em alguns casos, como de 72 horas, a um mês ou mais. A leptospirose caracteriza-se por uma vasculite. O dano às células endoteliais capilares é a causa básica das manifestações clínicas, tais como disfunção tubular renal, hepática, miocardite e hemorragia pulmonar (26).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por exames sorológicos, para pesquisa de anticorpos, isolamento do agente ou pesquisa molecular do material genético bacteriano (27,28). A prova para detecção de anticorpos é a Soroaglutinação Microscópica (SAM), teste de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose (27, 29). O princípio da técnica é a reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos hospedeiros e o antígeno-O dos lipopolissacarídeos (LPS) de membrana das leptospiras (29). O isolamento do agente é realizado a partir da cultura que é o diagnóstico definitivo da leptospirose, porém é limitada pelo crescimento lento, com longo período de incubação (até 13 semanas). Não é rotineiramente utilizada por demandar longo período de tempo para o resultado final, porém o isolamento é importante para o conhecimento da epidemiologia da leptospirose (15). A biologia molecular para pesquisa do material genético bacteriano tem despontado como opção, pelas dificuldades e limitações das técnicas sorológicas e microbiológicas utilizadas no diagnóstico (30,31).

A leptospirose é tradicionalmente relacionada com as condições socioeconômicas e climáticas, que geralmente ocorrem em países em desenvolvimento, sendo esporadicamente relatada em países desenvolvidos, frequentemente como casos importados ligados a viagens internacionais (32).

Atualmente, surtos de leptospirose foram associados ao turismo (17) e atividades recreacionais em ambiente silvestre. Desta forma, verifica-se a importância de estudos relacionados ao papel de espécies de animais silvestres como reservatórios, tanto no ambiente silvestre como em cativeiro.

Caráter ocupacional, residência (ambiente rural e urbano – favelas) e incidência sazonal de chuva são reflexos do fator geográfico, climático, social e cultural, que são os determinantes básicos da leptospirose. O surto de leptospirose ocorre pela interação entre os três elos da cadeia epidemiológica: a leptospira, o reservatório e o hospedeiro susceptível (33).

As alterações climáticas não somente levam a calamidades naturais, mas também podem ter impacto na emergência de doenças, como a leptospirose. Em particular, alta pluviosidade e enchentes em algumas regiões levam frequentemente a epidemias graves (21). As condições sanitárias precárias e o sistema de drenagem de água de chuva inadequado, juntamente com o acúmulo de lixo, favorecem o contato humano com excreções de roedores, principalmente urina (34), assim como o contato de animais silvestres mantidos em cativeiro, bem como os animais de vida livre, com estas excretas.

No Brasil, a leptospirose foi descrita pela primeira vez por Beaufort de Aragão, em 1917 (35), demonstrando a presença do microorganismo em ratos, chamando assim a atenção para a existência desta enfermidade no país. Carini, em 1918 (36), foi quem, pela primeira vez, examinando ratos procedentes do bairro Ponte Grande, em São Paulo, demonstrou a existência da *L. icterohaemorrhagiae* em ratos, naturalmente infectados.

Marcos Enrietti (37), estudando a incidência de leptospiras em murédeos, caninos e suínos em Curitiba, Paraná, verificou que, o índice de leptospira entre os

ratos de esgoto foi de 78%, exercendo papel epidemiológico importante para disseminação desta infecção para estes animais nesta cidade.

Zea Constante Lins (38), estudando as leptospiroses humanas na Amazônia, em maio de 1968, evidenciou nove casos positivos em Belém, sendo dois fatais, tendo-se conseguido o isolamento do agente causal em um deles, acreditando-se ser o primeiro caso de isolamento registrado na região norte do país.

Marcelo Oswaldo Alvares Corrêa, no final dos anos 60 e início dos anos 70 (39), no Brasil, verificou os sorovares mais patogênicos isolados do homem, tendo encontrado o Icterohaemorrhagiae como o mais importante, assim como outros pesquisadores, como Carlos Almeida Santa Rosa e colaboradores, em 1970 (26). Em 1973, Carlos Almeida Santa Rosa e colaboradores (40) verificaram também o sorovar Pomona como o sorovar mais patogênico e prevalente em suínos.

Trabalhos relatados por Alvares Corrêa e Saburo Hyakutake, em 1972(41), reconheceram alguns surtos epidêmicos de leptospirose na cidade de Recife, tendo em vista o ambiente urbano propício à proliferação de roedores, associado a altas precipitações pluviométricas.

Em 1968 no Brasil, Santa Rosa e colaboradores e Giorgi, em 1981 , iniciaram relatos de levantamentos sorológicos de anticorpos anti-Leptospira de diferentes soroviedades, como Canicola, Grippothyphosa, Hebdomadis, Pyrogenes, Tarassovi e Wolfii (42,43).

A presença de animais retores para diferentes sorovariedades pode estar relacionada a presença de determinados animais domésticos e silvestres (44). Animais silvestres são relevantes na epidemiologia da leptospirose, pois algumas espécies, principalmente pequenos mamíferos, atuam como reservatórios de diversos sorovares (6).

Azevedo e colaboradores (45), na Paraíba, estudaram a soroprevalência para leptospirose em suínos, encontrando o sorovar Pomona como o mais freqüente.

Santa Rosa e colaboradores (46) publicaram a experiência de nove anos de estudos sobre leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Nesse período, foram examinados 21.263 soros humanos e de animais, sendo 15.080 soros de bovinos, onde pelo teste de Soroaglutinação Microscópica, houve a predominância do sorovar Wolffii; em 3242 soros de suínos, 19,5% foram reagentes, com predomínio do sorovar Pomona e em 916 soros humanos, a maior frequência foi o sorovar Icterohaemorrhagiae.

Fernando Cordeiro e colaboradores, em 1974 (47), em levantamento sorológico para leptospirose verificaram que, a sorovariedade Bratislava apresentou elevada prevalência em eqüinos da região de Minas Gerais, concordando com os trabalhos levantados por Santa Rosa e colaboradores, em 1968 (42).

Os reservatórios da doença são animais domésticos e silvestres, que transmitem a doença para o homem, cabendo ressaltar que os roedores

desempenham o papel de principais reservatórios da doença, pois albergam leptospiros nos rins, eliminando-as vivas no meio ambiente, e contaminando água, solo e alimentos (48). Os roedores funcionam como portadores permanentes para *Leptospira* na natureza, mantendo a bactéria inviolada no interior dos túbulos renais por longos períodos (49).

Desta forma, áreas com elevada população de ratos e sujeitas à ocorrência de enchentes não devem ser consideradas como as únicas de risco de leptospirose, mas também aquelas destinadas ao depósito de lixo, por exemplo, nas quais existe uma quantidade muito grande de roedores e há o contato de pessoas com aquele ambiente (50).

Entretanto, com o avanço dos estudos epidemiológicos, o número de hospedeiros de leptospiros reconhecidos passou a ter um aumento vertiginoso, sabendo-se hoje que, a maioria dos animais, sejam domésticos ou silvestres, em presença de fatores ecológicos favoráveis, podem contribuir para a perpetuação de sorovariedades patogênicas de leptospiros no ambiente em que vivem, disseminando-as pela urina (51).

Estudos em animais silvestres representam possível lacuna no estudo da cadeia epidemiológica, o que dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle desta enfermidade, em regiões com grande densidade de animais, matas e rios (52). A participação de animais silvestres como reservatórios ou portadores de zoonoses na natureza e em cativeiro é de grande importância (53). Neste contexto,

zoológicos oferecem oportunidades para o estudo desses animais em situações controladas e são importantes fontes de informação para investigações epidemiológicas de doenças transmissíveis (54,55). Apesar dos cuidados com o manejo sanitário, os jardins zoológicos ainda propiciam a transmissão de doenças como a leptospirose (5). Com a proximidade dos animais silvestres ao ambiente doméstico, devido a mudanças climáticas, queimadas e desmatamentos, o risco de infecção torna-se cada vez maior, contribuindo para a disseminação da enfermidade. Vale a pena salientar, que estes animais em quase totalidade mascaram os sinais clínicos, mesmo estando infectados com agentes etiológicos.

A infecção e a disseminação de patógenos podem ocorrer para os animais silvestres do próprio zoológico, animais sinantrópicos, funcionários e o público visitante (55). Neste ambiente, primatas e carnívoros selvagens podem vir a se comportar como hospedeiros e reservatórios de agentes etiológicos de zoonoses, como a leptospirose (56).

A demonstração de leptospiras em várias espécies de animais silvestres tem ocorrido em várias partes do mundo, como em roedores, edentatas, carnívoros e artiodáctilas, os quais podem atuar como fontes de infecção (57, 58, 59). Desta forma, disseminam a infecção pela urina para outros animais e para o ambiente, infectando também o homem, constituindo-se, portanto a leptospirose em uma importante zoonose e um sério problema de saúde pública (53,60).

Poucos estudos evidenciam a presença da leptospirose acometendo populações cativas, relatando óbito em primatas (61,62), guanaco (63) e ariranhas (64).

No Brasil, as investigações sorológicas sobre a leptospirose em animais selvagens de cativeiro têm apresentado resultados variáveis, sendo realizadas em zoológicos do São Paulo-SP (56), Rio de Janeiro-RJ (65), Foz do Iguaçu-PR (66) Uberaba-MG (67), Bauru-SP (68) e Sorocaba-SP(69). Em primatas, os sorovares mais prevalentes foram Castellonis, Copenhageni e Grippothyphosa (56, 65); em canídeos, foram Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Gryppothyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Patoc e Pomona (56,66,67) e em procionídeos e mustelídeos foi o sorovar Copenhageni (65).

Em pesquisas realizadas por Corrêa et al. (56), 302 amostras de soro de animais silvestres foram analisadas num período de três anos, na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, onde 59 foram reagentes para a técnica de SAM. Foram utilizados 25 antígenos, sendo que o isolamento do agente ocorreu a partir do tecido renal do *Rattus norvegicus* e *Didelphis marsupialis*, sendo o primeiro, responsável pela transmissão das leptospiras nos animais do zoológico. Estudos realizados por Esteves et al. (67) mostraram que a incidência de leptospirose em animais silvestres mantidos em cativeiro foi menor do que em animais de vida livre. Porém, a infecção por *Leptospira* spp, também ocorreu nos primeiros, pela disseminação das bactérias pela urina. Souza Júnior et al. (70) realizaram um estudo sorológico em 427 animais de vida livre resgatados do lago da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães,

Tocantins, sendo 286 macacos prego (*Cebus apella*), 82 bugios (*Alouatta caraya*), 31 quatis (*Nasua nasua*), 10 cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), sete cutias (*Dasyprocta sp.*), seis tamanduás mirins (*Tamandua tetradactyla*) e cinco tatus (*Euphractus sexcinctus*) e encontraram soros positivos em 16,1% dos macacos prego, 2,4% dos bugios, 12,9% dos quatis, 20% dos cachorros do mato e os títulos variaram de 100 a 1600. Todas as cutias, tamanduás e tatus foram negativos para leptospirose.

Na região do Pantanal do Mato Grosso, Miranda (71) relatou que apesar de ocorrência de coaglutinação, três dos seis tamanduás-bandeira (*M. tridactyla*) sororreagentes para *Leptospira* spp., sendo prevalentes os sorovares Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bataviae e Shermani.

Pequenos mamíferos, geralmente espécies selvagens, são os reservatórios mais importantes de leptospiros na natureza. Entre eles, o guaxinim (*Procyon lotor*), tem sido relatado como uma das espécies silvestres mais importantes devido ao maior potencial para a transmissão de doenças, incluindo leptospirose e cinomose, destes para espécies domésticas, especialmente bovinos, no caso de leptospirose, vários estudos têm constatado que guaxinins são soropositivos para *Leptospira interrogans* sorovares Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae (72,73,74,75).

Pimentel et. al. (76) realizaram pesquisa no Zoológico do Parque da Cidade “Governador José Rollemberg”, em Aracaju- SE, verificando que, dos 32 animais examinados, quatro (12,5%) reagiram para *Leptospira* spp., sendo três animais

procedentes da natureza e um nascido no zôo. Foram encontradas reações para o sorovar Copenhageni, nos primatas macaco-prego e macaco-prego-peito-amarelo, bem como em carnívoros raposa e guaxinim. Reações para este sorovar já foram observados por Marchiori Filho et al. (77) em javalis (*Sus scrofa scrofa*), em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), por Milagres (78) e em veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) por Girio et al. (52). Portanto, outras espécies também podem estar participando da cadeia epidemiológica deste sorovar. Destaca-se que, no Brasil, este sorovar foi o principal responsável pelos casos de leptospirose em humanos, em São Paulo (79).

Em trabalho recente realizado por Ullman et al. (69), no Zoo de Sorocaba, de 229 mamíferos estudados, 13 foram reagentes para *Leptospira* spp, sendo que dentre as espécies estudadas, de 3 animais da espécie *Alouatta caraya* avaliados um foi reagente para o sorovar Butembo, de 14 animais da espécie *Cercopithecus thomasi* dois foram reagentes para o sorovar Sentot e de 16 animais da espécie *Cercopithecus brachyurus* foram avaliadas 16 amostras sendo uma positiva para o sorovar Canicola.

Embora veterinários, biólogos e zootecnistas se esforcem para um bom manejo de espécies silvestres mantidas em parques, zoológicos e unidades de preservação, muitas doenças causadas por vírus e bactérias podem atingir esses animais e, conseqüentemente, tornarem-se portadores e/ou reservatórios disseminadores de enfermidades. Uma das doenças que pode atingir os recintos é a leptospirose, representando papel importante na saúde pública, pois, ao atingir os

animais, devido ao estreito contato favorece a transmissão para o homem. Desta forma, tendo em vista que os animais silvestres podem ser reservatórios de leptospirosas, representam um fator de risco para os indivíduos que trabalham direta ou indiretamente com estes animais, bem como com os que vivem nas proximidades, ou até mesmo para os visitantes do local, representando, portanto, uma doença de caráter zoonótico que deve ser levada em consideração.

O conhecimento da leptospirose na fauna silvestre é de grande importância para o seu controle e profilaxia; portanto, a proposta do presente estudo foi realizar um inquérito soropidemiológico no Centro de Conservação de Fauna Silvestre (CCFS), o qual é mantido pela Companhia Energética do Estado de São Paulo (CESP) no município de Ilha Solteira. Constitui-se em uma área de 18 hectares de vegetação do tipo cerrado, destinada à conservação de muitas espécies da fauna brasileira. Foi construído em 1979 pela administração da CESP, com a finalidade de abrigar e preservar animais provenientes do enchimento dos reservatórios das hidrelétricas de Jupia e de Ilha Solteira.

Atualmente é reconhecida pela comunidade Zoológica Nacional, com as quais mantêm intercâmbio pelos trabalhos de alto nível na preservação, reprodução e criação em cativeiro de espécies como o jacaré-de-papo amarelo (*Caiman latirostris*), arara Canindé (*Arara ararauna*), tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), bugio vermelho (*Alouatta caraya*), cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*), entre outros. É também pioneiro no

aleitamento artificial de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (80). Além das espécies mantidas em cativeiro, ainda há no local a fauna de vida livre que é constituída de cotias, tatus, tucanos, gambás, teiús, ratos silvestres, micos, morcegos entre outros, os quais possuem grande importância para o estudo epidemiológico da leptospirose, tendo em vista que esses animais podem atuar como reservatórios desta zoonose.

Por ser uma enfermidade de grande importância em saúde pública e pelo estreito contato entre animais silvestres de vida livre e de cativeiro, é de extrema importância a realização de um estudo epidemiológico no CCFS. Além disso, a unidade de preservação encontra-se no perímetro urbano do município de Ilha Solteira, havendo portanto, a necessidade de avaliar riscos zoonóticos nessa área. Dessa forma, torna-se necessário identificar os focos da leptospirose e avaliar os fatores epidemiológicos de riscos envolvidos na manutenção e na disseminação desta enfermidade para que se possa adotar melhorias no manejo destes animais e tomar medidas eficazes no controle da expansão desta enfermidade.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- ✓ Verificar a soroprevalência de leptospirose em animais silvestres em cativeiro e em animais de vida livre, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre-CCFS/CESP de Ilha Solteira, bem como em roedores sinantrópicos comensais, capturados próximos aos recintos dos animais, por meio da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM); e posterior realização da prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.;

- ✓ Verificar a participação dos roedores sinantrópicos comensais, capturados no CCFS, como portadores renais e/ou hepáticos de *Leptospira* spp. pelo isolamento em meio de cultura de Fletcher e confirmação pelas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.;

- ✓ Comparar a sensibilidade e especificidade das técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. e também do isolamento em meio de cultura.

MATERIAL

E

MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Estudo

A cidade de Ilha Solteira localiza-se no extremo noroeste do Estado de São Paulo, na divisa com Mato Grosso do Sul, na margem paulista do Rio Paraná, logo abaixo da confluência com o rio São José dos Dourados. Tem como coordenadas geográficas: longitude 51°06'35''W e latitude 20°38'44''S. O clima é classificado como tropical chuvoso de bosque, marcado por chuvas de verão e estiagem no inverno. O índice pluviométrico anual é de 1.300mm, com temperatura média anual de 28°C, sendo a média das máximas anuais de 31°C. O município é banhado pelo Rio Paraná a oeste, Rio Tietê ao sul e Rio São José dos Dourados ao centro, sendo que os dois últimos desembocam no primeiro (81). Os animais estudados foram procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira, que se localiza no perímetro urbano do município (Figura 1).

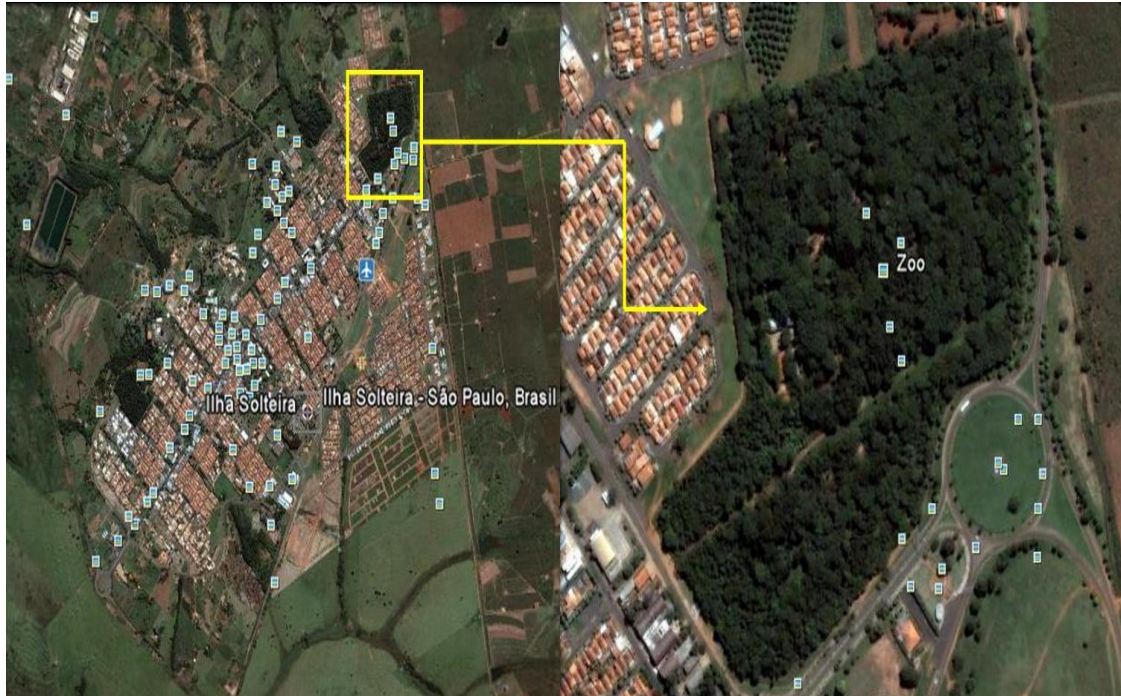


Figura 1 – Imagem de satélite do município de Ilha Solteira/SP. O Centro de Conservação da Fauna Silvestre, é representado pelo contorno (amarelo). Fonte: <http://earth.google.com.br>. Botucatu, SP, 2013.

3.2. Autorização para Realização do Estudo

Para realização do presente estudo o mesmo foi apresentado aos órgãos competentes para prévia autorização, sendo estes: Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação animal (CEEA) da FMB-UNESP, tendo sido aprovado em 31 de março de 2011, protocolo 871-2011 (Anexo1). Solicitada prévia autorização junto ao IBAMA em 22 de março de 2011, número 26841-1 (Anexo 2). As colheitas biológicas dos animais do CCFS foram autorizadas pelos responsáveis (Anexo 3).

3.3. Espécies Avaliadas

Participaram do estudo 100 animais silvestres, sendo 41 mantidos em cativeiro (Quadro 1) e 59 animais de vida livre, os quais circulavam no interior do CCFS (Quadro 2).

Quadro 1 - Relação de animais em cativeiro e quantidade de animais estudados, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

Animais em Cativeiro	Quantidade
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	3
Macaco Prego (<i>Cebus apella</i>)	2
Mão Pelada (<i>Procyon cancrivorus</i>)	5
Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	8
Cachorro do Mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	3
Gato Mourisco (<i>Herpailurus yaguarondi</i>)	5
Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	12
Raposinha (<i>Pseudolopex ventulus</i>)	1
Lobo guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	1
Cachorro do Mato Vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)	1
Total	41

Quadro 2 - Relação de animais de vida livre e quantidade dos animais estudados do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

Animais	Quantidade
Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	13
Teiú (<i>Tupinambis merianae</i>)	14
Cotia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	13
Gambá (<i>Didelphis albiventris</i>)	6
Rato (<i>Rattus spp.</i>)	13
Total	59

3.4. Contenção dos animais

3.4.1. Animais em cativeiro

Os animais mantidos em cativeiro foram capturados com auxílio de puçá (Figura 2) e anestesiados com a associação de Xilazina (2mg/kg, Calier®) e Ketamina (25mg/kg Forte Dodge®), por via subcutânea.

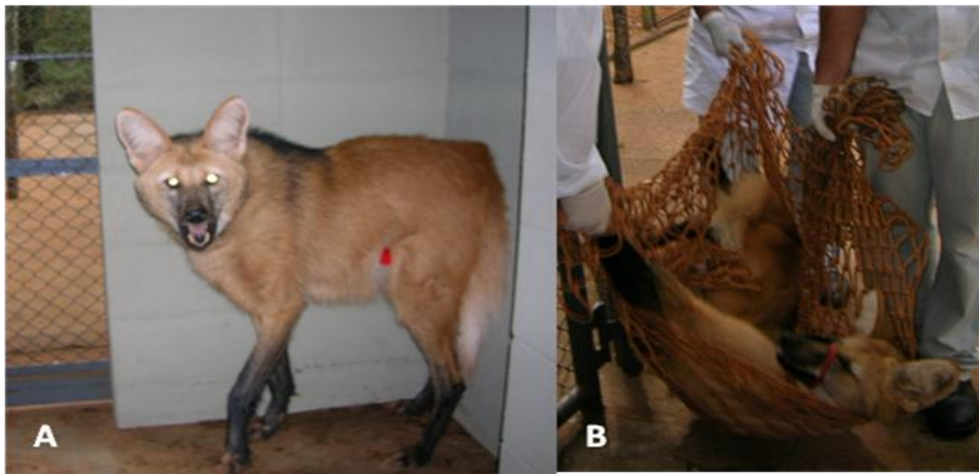


Figura 2 – Procedimento de contenção para animais em cativeiro. A- Contenção química em um Cachorro-do-Mato (*Cerdocyon thous*). B-Contenção Física. Botucatu, SP, 2013.

3.4.2. Animais de vida livre

3.4.2.1. Roedores sinantrópicos, gambás e cotias

Animais de vida livre foram capturados em armadilhas de arame galvanizado com gancho e/ou sem do tipo “Shermann” (Figuras 3 e 4), as quais eram posicionadas próximas aos recintos dos animais, desde às 17 horas até às 7 horas do dia seguinte (Figura 5). Posteriormente estes animais foram contidos e imobilizados com associação de Xilazina (2mg/kg, Calier®) e Ketamina (25mg/kg Forte Dodge®)s via subcutânea.

Figura 3 – Captura de roedor sinantrópico (*Rattus* spp.), com a utilização de armadilhas. Botucatu, SP, 2013.



Figura 4 – Captura de gambá (*Didelphis albiventris*), com a utilização de armadilhas. Botucatu, SP, 2013.



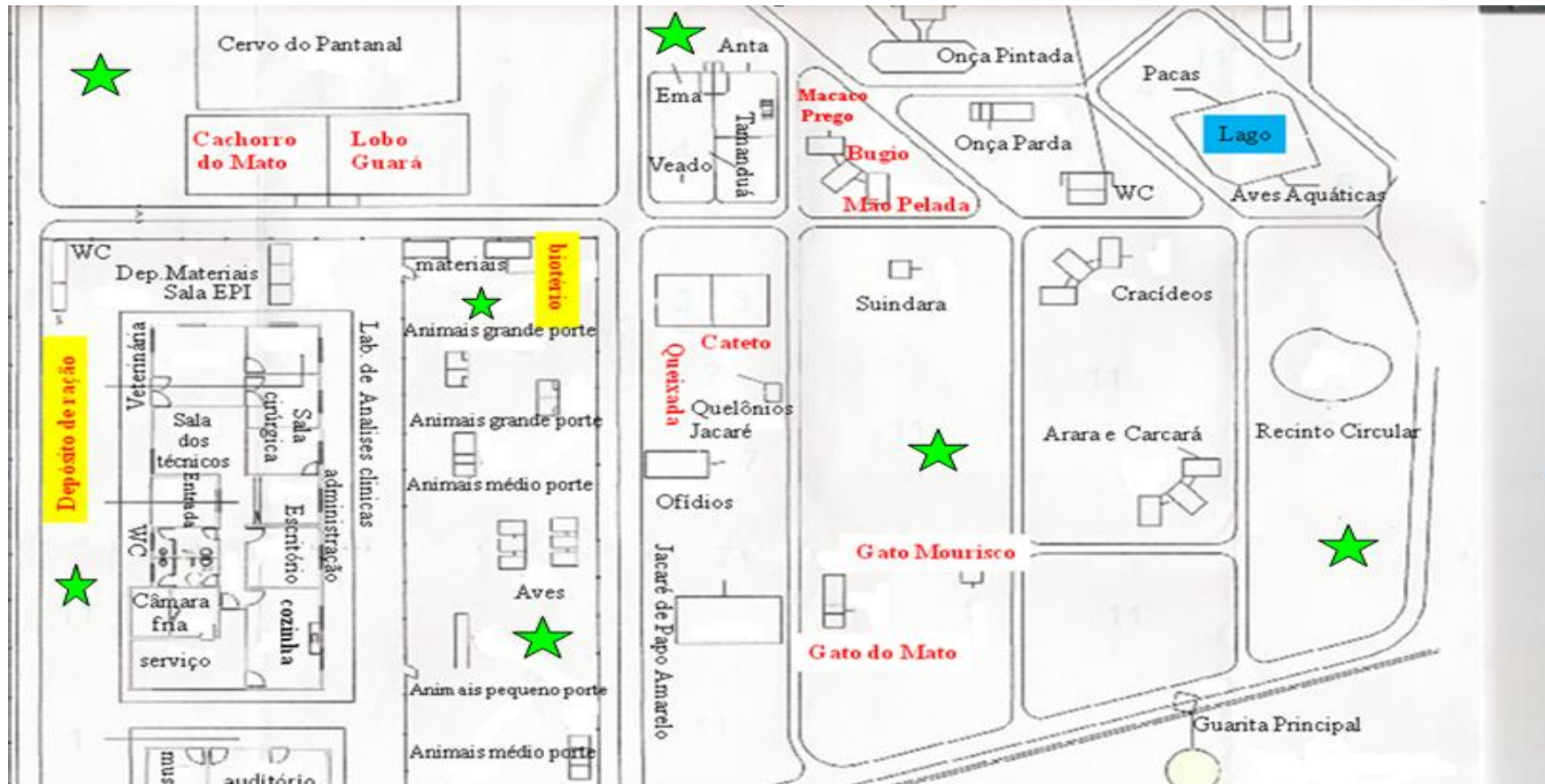


Figura 5 - Mapa ilustrativo do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, com a localização dos recintos dos animais estudados. As estrelas marcam a posição onde as armadilhas foram colocadas para captura dos roedores. Botucatu, SP, 2013.

3.4.2.2. Tatus e Teiús

Os tatus (*Dasypus novemcintus*) e teiús (*Tupinambis merianae*) foram capturados com o auxílio de puçá (Figura 6), no período da tarde e em diversos locais do CCFS.



Figura 6 - Captura de teiú (*Tupinambis merinae*) com a utilização de puçá.

Botucatu, SP, 2013.

Os anestésicos utilizados para os animais de vida livre foram uma associação de Cloridrato de Xilazina (25 mg/kg, Forte Dodge®) e Cloridrato de Cetamina (2mg/kg, Calier®) ou Zoletil 50 (50 mg/kg, Virbac®), por via intramuscular, exceto para teiús, onde a coleta foi realizada através de contenção física.

3.5. Colheita de amostras biológicas

3.5.1. Sangue

Logo após a contenção dos animais, foram coletados de 3 a 5 mL de sangue, dependendo da espécie.

3.5.1.2 Animais em cativeiro

A colheita de sangue dos animais em cativeiro deu-se pela veia jugular, veia cefálica ou veia safena lateral, dependendo da espécie (Figura 7).



Figura 7 – Procedimento de colheita de sangue em um Cachorro do Mato (*Cerdocyon thous*). Botucatu, SP, 2013.

3.5.1.3 Animais de Vida Livre

A colheita de sangue dos gambás, teiús e tatus-galinha deu-se pela veia caudal central. Para as cotias a via de acesso foi a veia safena lateral. Para os roedores sinantrópicos, realizou-se punção cardíaca (Figura 8).

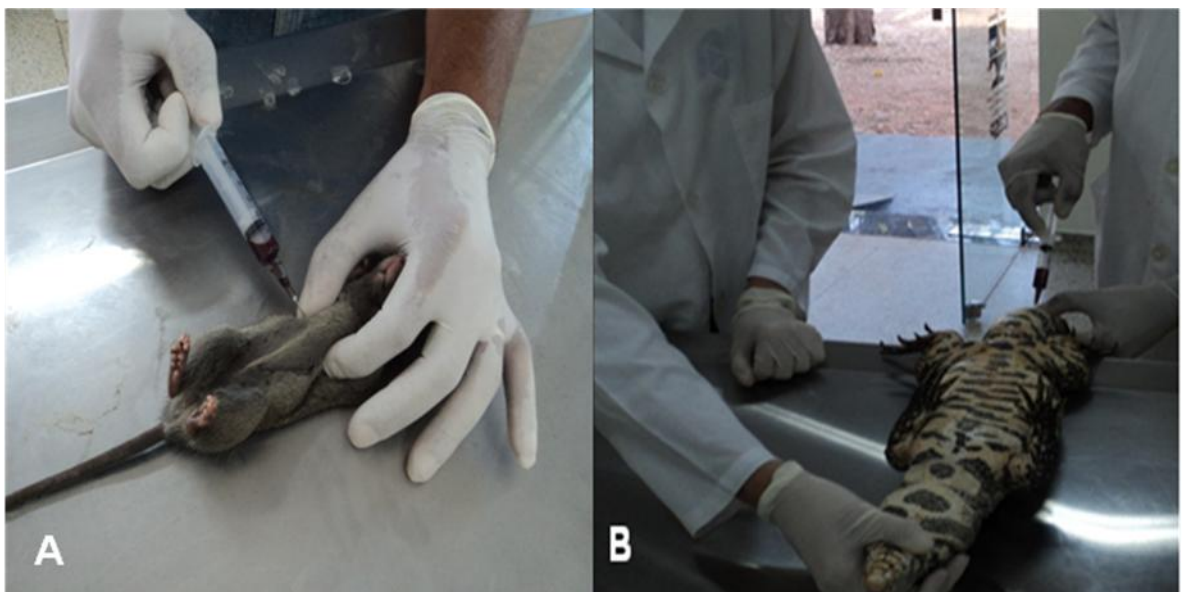


Figura 8 - Colheita de sangue em animais de vida livre. A- roedor sinantrópico (*Rattus* spp.). B- teiú (*Tupinambis merianae*). Botucatu, SP, 2013.

Após a colheita do sangue, uma alíquota foi acondicionada em tubos vacutainer contendo EDTA para posterior realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., e a outra, armazenada em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro e realização da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM). Os tubos foram devidamente identificados com o número de cada animal e acondicionados sob temperatura de refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável até a chegada ao Laboratório de Imunoparasitologia, do Depto.

de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS - UNESP, apenas para armazenamento.

As amostras de sangue que seriam destinadas à SAM foram dessoradas após a retração do coágulo e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, sendo cada amostra de soro acondicionada em microtubos de 1,5mL, devidamente identificados e mantidos em freezer a -20°C até o momento da realização da prova. O sangue a ser utilizado para PCR foi armazenado em microtubos de 1,5mL, devidamente identificados e mantidos em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.5.4 Órgãos

Tendo a vista a realização rotineira do controle populacional de roedores sinantrópicos no interior do CCFS, foi possível realizar a colheita de órgãos (rins e fígado) destes animais (Figura 9) para a realização da PCR e isolamento em meio de Fletcher. Fragmentos de fígado e rins dos roedores capturados próximos aos recintos foram colocados individualmente em microtubos estéreis, devidamente vedados e identificados, sendo prontamente encaminhados, sob temperatura de refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, para o Laboratório de Sanidade Animal da Unidade de Pesquisa de Bauru/SP, pertencentes ao Pólo Regional Centro Oeste, órgão vinculado à Agência Paulista Tecnológica dos Agronegócios (APTA), Secretaria da Agricultura e Abastecimento (SAA), para realização do cultivo em meio de Fletcher.

Uma parte de cada fragmento, pesando entre 5 a 50mg, foi acondicionado em microtubos estéreis de 1,5mL livres de DNase e RNase, contendo 1,0 mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 estéril, para a realização da extração do

DNA e posterior Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., mantidos em freezer a -20°C até o momento de seu processamento.



Figura 9 - Retirada de fígado e rins de roedor sinantrópico (*Rattus* spp.) capturado no interior do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira (CCFS), para a realização da técnica de isolamento de leptospiros em meio de cultura Fletcher. Botucatu, SP, 2013.

Após a colheita do material biológico os animais de vida livre eram marcados, os que eram anestesiados permaneciam em observação e posteriormente soltos no mesmo local. Os teiús eram soltos logo após a marcação.

3.6. Locais de execução dos procedimentos laboratoriais

As técnicas de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e cultivo de fragmentos de rim e fígado de roedores em meio de Fletcher foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da APTA - Unidade de Pesquisa de Bauru/SP. A prova de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., foi realizada no Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

3.7. Provas diagnósticas

3.7.1. Soroaglutinação microscópica (SAM)

A prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi realizada segundo as normas do Ministério da Saúde (82). Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50 em solução salina tamponada pH 7,2 como ponto de corte positivo e testada para 29 sorovares de *Leptospira* spp., considerando-se como positiva aquela que apresentou 50% ou mais de aglutinação em relação ao controle. As amostras positivas ao título inicial foram de 1:100, novamente diluídas sucessivamente na razão dois e testadas para os sorovares que reagiram anteriormente. O título final foi aquele que ainda apresentou 50% ou mais de aglutinação (44).

Como antígenos, foram utilizados culturas vivas de *Leptospira* spp., mantidas em estufa a 29°C no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/ Bauru, e que não apresentassem contaminantes e nem auto-aglutinação. Os 29 sorovares utilizados foram mantidos por repiques semanais em meio de cultura líquido de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), a saber: 1A (Australis), 1B (Bratislava), 2A (Autumnalis), 2B (Butembo), 3 (Castellonis), 4A (Bataviae), 5 (Canicola), 6B (Whitcombi), 7 (Cynopteri), 8A (Djasiman), 8B (Sentot), 9 (Grippotyphosa), 10 (Hebdomadis), 11A (Copenhageni), 11B (Icterohaemorrhagiae), 12 (Javanica), 13 (Panama), 14A (Pomona), 15 (Pyrogenes), 16A (Hardjo), 16B (Wolffi), 17 (Shermani), 18 (Tarassovi), 19 (Andamana), 21 (Patoc), PRA (Hardjoprajitno), MIN (Hardjo miniswajezak), CTG (HardjoCTG) e BOV (Hardjobovis).

3.7.2. Cultura em meio de Fletcher®

Os fragmentos de fígado e rim utilizados para o cultivo foram processados segundo Passos et al. (83). Em capela de fluxo laminar, devidamente esterilizada com álcool 70% e sob ação de luz ultravioleta durante 30 minutos, o fragmento hepático, bem como o de rim (um de cada animal) foram macerados. Em seguida, o material obtido de cada um dos órgãos foi inoculado em tubo contendo meio de cultura semi-sólido de Fletcher com 0,15 % de ágar, acrescido de 100µg de 5-fluorouracil/mL e 1% de soro estéril de coelho e inativado, a 56°C por 30 minutos, e incubados a 29°C por 16 semanas. As leituras de cada um dos tubos foram realizadas na segunda, quarta e sexta semanas após a semeadura, colocando-se 10µL da amostra de meio de cultura de cada tubo entre lâmina e lamínula, e observadas sob microscopia de campo escuro no aumento 40X, pesquisando-se o desenvolvimento bacteriano com a formação do anel de opalescência (zona da Dinger). Foram consideradas amostras positivas quando visualizado espiroquetas móveis/ou quando houvesse formação do anel de opalescência.

3.7.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.

3.7.3.1. Preparo das amostras para a extração do DNA

3.7.3.1.1. Sangue e Culturas

As alíquotas de sangue e culturas de rim e fígado que estavam armazenadas a -20°C em microtubos livres de DNases e RNase foram descongeladas em gelo e a extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®), conforme recomendações do fabricante (Anexo 4)

3.7.3.1.2. Órgãos

A partir das amostras de fígado e rins, procedeu-se à extração de DNA utilizando-se o kit Illustra™ Tissue & Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), conforme recomendações do fabricante. (Anexo 5).

3.7.3.1.3. Amplificação do DNA

Os iniciadores foram descritos por Mérien et al. (84) os quais amplificam 331pb, como segue:

LEP 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3')

LEP 2 (5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3')

A amplificação do DNA foi realizada segundo a adaptação descrito por Mérien et al. (84), com adaptações. As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2mL com volumes totais de 25,0µL, sendo 2,5µL de solução tampão de PCR (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,0), 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µL de solução de dNTP (0,2mM), 0,5µL de *Taq Platinum* DNA (1U) (Invitrogen®), 0,5µL de cada iniciador (10pM), 17,75µL de água ultrapura e 2µL de DNA da amostra obtida no final da extração.

A preparação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), com o seguinte perfil de ciclagem: 94°C por três minutos, 35 ciclos de 94°C por um minuto, anelamento a 63°C por 1 minuto e meio e extensão a 72°C por dois minutos, incluindo-se dez minutos adicionais a 72°C ao final para completar a extensão dos segmentos amplificados.

3.7.3.1.4. Eletroforese

A visualização dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de eletroforese. Para tanto preparou-se gel de agarose a 1,5% adicionado de 5µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®). Foram utilizados 10µL do produto de PCR e como marcador de peso molecular 4µL de 100pb ladder (Invitrogen®). Para todas as amostras foram adicionados 2µL de uma solução de Blue Juice Gel Loading (Invitrogen®). O gel foi submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal HE99 (GE-Healthcare) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09m de ácido bórico e 0,001M de EDTA) e a voltagem de 90V por aproximadamente 35 minutos, utilizando a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE-Healthcare). O gel foi visualizado no transluminador de luz UV.

3.7.4. Controles

3.7.4.1. Sangue e Culturas

Para a visualização dos produtos amplificados na PCR foram utilizados controles negativos e positivos. Como controle positivo foram utilizadas alíquotas de culturas em EMJH de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e como controle negativo foi utilizada água ultrapura.

3.7.4.2. Órgãos

Para cada sequência de extração e purificação, foram utilizados controles positivos e negativos para a técnica Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Para isso foram preparadas suspensões de fígado e rim, contaminadas com *L. interrogans* sorovar Canicola, como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura.

3.8. Análise estatística

Com os dados obtidos a partir dos testes diagnósticos realizados, foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade comparando-se as técnicas de sorologia (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de sangue para espécies de animais em cativeiro e espécies de vida livre; para os roedores sinantrópicos também foi calculado esses valores comparando as técnicas de cultura a partir de órgãos e PCR de órgãos; foi possível também calcular o coeficiente Kappa para verificar a concordância entres esses testes. Foi utilizado o programa SAS for Windows, versão 9.2, para os cálculos estatísticos do presente estudo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.5. Sorologia – Soroaglutinação microscópica (SAM)

Do total de 100 amostras de soro analisadas pela prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), 89 (89%) foram reagentes para um ou mais sorovares de *Leptospira spp.*, sendo que, dos 41 animais em cativeiro, 33 (80,5%) foram reagentes e, dos 59 animais de vida livre 56 (94,9%) apresentaram anticorpos anti-*Leptospira spp.* (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1 - Espécies de animais em cativeiro avaliados reagentes á técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e respectivos sorovares reagentes para leptospirose, dentre as 41 amostras testadas. Botucatu, SP, 2013.

Espécie	Soros Examinados	Soros Reagentes	%	Sorovares Reagentes
Bugio Preto (<i>Alouatta caraya</i>)	8	6	75	1A, 2A, 3, 9, 10,11A, 14A, 16A, 16B, 19, PRA
Macaco Prego (<i>Cebus apella</i>)	2	1	50	14A
Gato Mourisco (<i>Herpailurus yaguarondi</i>)	5	5	100	1A,2A,2B, 7, 9, 15, 19, BOV
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	3	2	66,7	9, 10, 11A, 14A, 15
Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	12	11	91,7	1A, 2B, 3, 4A, 5, 6B, 7, 8A, 9, 10, 11A, 13, 15, 16B, 17, 18, 19, 21,PRA, MIN, CTG
Cachorro do Mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	3	3	100	2A, 2B, 3, 5, 6B, 8A,,8B, 11A, 11B, 12, 13, 14A, 18
Cachorro do Mato Vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)	1	0	0	_____
Lobo Guará (<i>Crysocyon brachyurus</i>)	1	1	100	BOV
Mão Pelada (<i>Procyon concrivurus</i>)	5	4	80	2B, 5, 8A, 9, 14A, 16B, 17, 19
Raposinha (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	1	0	0	_____
Total	41	33	80,5	_____

Legenda: 1A (Australis), 2A (Autumnalis), 2B (Butembo), 3 (Castellonis), 4A (Bataviae), 5 (Canicola), 6B (Whitcombi), 7 (Cynopteri), 8A (Djasiman), 9 (Grippotyphosa), 10 (Hebdomadis), 11A (Copenhageni), 11B (Icterohaemorrhagiae), 12 (Javanica), 13 (Panama), 14A (Pomona), 15 (Pyrogenes), 16A (Hardjo), 16B (Wolffi), 17 (Shermani), 18 (Tarassovi), 19 (Andamana), 21 (Patoc), PRA (Hardjoprajitno), MIN (Hardjo miniswajezak), CTG (HardjoCTG) e BOV (Hardjobovis).

Tabela 2 - Animais de vida livre avaliados á técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e respectivos sorovares reagentes para leptospirose, dentre as 59 amostras testadas. Botucatu, SP, 2012.

Espécie	Soros Examinados	Soros Reagentes	%	Sorovares Reagentes
Rato (<i>Rattus spp.</i>)	13	13	100	1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4A, 5, 6B, 7, 8A, 8B, 9, 10, 11A, 11B, 12, 13, 15, 16A, 16B, 17, 18, 19, MIN, BOV
Gambá (<i>Didelphis albiventris</i>)	6	5	83,3	1A, 1B, 2A, 2B, 4A, 5, 8A, 8B, 9, 10, 11B, 14A, 16A, 18, 19, 21
Cotia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	13	13	100	1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4A, 5, 6B, 7, 8A, 9, 10, 11A, 11B, 12, 13, 14A, 15, 16A, 16B, 17, 18, 19, 21, PRA, MIN, CTG, BOV
Teiú (<i>Tupinambes merinae</i>)	14	13	92,8	1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4A, 5, 6B, 7, 8A, 8B, 9, 10, 11A, 11B, 12, 13, 14A, 15, 16A, 16B, 17, 18, 19, 21, PRA, MIN, CTG, BOV
Tatu (<i>Dasyprocta aguti</i>)	13	12	92,3	1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4A, 5, 6B, 8A, 8B, 9, 10, 11B, 13, 15, 16A, 17, 18, 19, 21, PRA, MIN, CTG, BOV
Total	59	56	94,9	_____

Legenda: 1A (Australis), 1B (Bratislava), 2A (Autumnalis), 2B (Butembo), 3 (Castellonis), 4A (Bataviae), 5 (Canicola), 6B (Whitcombi), 7 (Cynopteri), 8A (Djasiman), 8B (Sentot), 9 (Grippotyphosa), 10 (Hebdomadis), 11A (Copenhageni), 11B (Icterohaemorrhagiae), 12 (Javanica), 13 (Panama), 14A (Pomona), 15 (Pyrogenes), 16A (Hardjo), 16B (Wolffi), 17 (Shermani), 18 (Tarassovi), 19 (Andamana), 21 (Patoc), PRA (Hardjoprajitno), MIN (Hardjo miniwajezak), CTG (HardjoCTG) e BOV (Hardjobovis).

Dos 29 sorovares de *Leptospira spp.* testados, todos (100%) foram reagentes para um animal ou mais. O sorovar Andamana foi o que apresentou maior número de animais reagentes, sete animais de cativeiro e 17 animais de vida livre. O sorovar Panama e Hardjoprajitno apresentaram a menor sororreatividade, tendo-se

somente sete (7) animais de vida livre e um (1) animal em cativeiro reagente a estes sorovares (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição em porcentagem, dos 29 sorovares positivos à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para leptospirose e a variação do título para cada sorovar testado nos animais do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

Sorovar	Número de animais de vida livre reagentes	Número de animais em cativeiro reagentes	Varição de Título
1A	17	4	100-3200
1B	15	0	100-3200
2A	9	4	100-3200
2B	8	5	100-3200
3	9	3	100-800
4A	11	1	100-1600
5	10	3	100-200
6B	9	3	100-1600
7	11	3	100-800
8A	14	7	100-400
8B	14	1	100-800
9	13	9	100-400
10	13	3	100-1600
11A	9	3	100-3200
11B	10	1	100-1600
12	10	1	100-400
13	7	1	100-400
14A	10	4	100-400
15	12	2	100-3200
16A	12	1	100-1600
16B	4	7	100-3200
17	16	2	100-1600
18	15	2	100-400
19	17	7	100-800
21	9	1	100-3200
PRA	7	1	100-3200
MIN	2	12	100-3200
CTG	9	2	100-3200
BOV	1	12	100-1600

Legenda: 1A (Australis), 1B (Bratislava), 2A (Autumnalis), 2B (Butembo), 3 (Castellonis), 4A (Bataviae), 5(Canicola), 6B (Whitcombi), 7(Cynopteri), 8A(Djasiman), 8B(Sentot), 9(Grippotyphosa), 10(Hebdomadis), 11A(Copenhageni), 11B(Icterohaemorrhagiae), 12(Javanica), 13(Panama), 14A (Pomona), 15 (Pyrogenes), 16A (Hardjo), 16B (Wolffi), 17 (Shermani), 18 (Tarassovi), 19(Andamana), 21 (Patoc), PRA (Hardjoprajitno), MIN (Hardjo miniwajezak), CTG (HardjoCTG) e BOV (Hardjobovis).

A espécie em cativeiro *Allouata caraya* (Macaco-Prego) apresentou sorreatividade apenas para o sorovar Pomona, e Lobo Guará (*Crysocyon brachyuris*) apresentou sorreatividade somente para o sorovar *Hardjobovis*. As espécies *Pseudopolex ventulus* (Raposinha) e *Speothos venaticus* (Cachorro do mato Vinagre) foram não reagentes para todos os sorovares.

4.6. Cultura em meio de Fletcher®

Dentre os 13 animais avaliados, sete (53,8%) apresentaram cultivo positivo. Destes, três (42,8 %) foram positivos apenas em relação aos fragmentos hepáticos; dois (28,6%) foram positivo apenas para amostra renal, e dois (28,6%) dos animais avaliados apresentaram positividade nos fragmentos de rim e fígado simultaneamente.

A relação dos sete ratos positivos de acordo com o órgão examinado pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição de sete ratos positivos á cultura em meio de Fletcher, segundo o órgão examinado. Botucatu, SP, 2013.

Animal	Órgão
Rato 1	Rim Fígado
Rato 2	Fígado
Rato 5	Fígado
Rato 6	Rim Fígado
Rato 7	Rim
Rato 8	Rim
Rato 9	Fígado

Em todos os roedores com cultivo positivo a partir de fragmentos de fígado e/ou rim, foram visualizados à microscopia de campo escuro espiroquetídeos com movimento espiralado. Observou-se anel de opalescência característico de

crescimento bacteriano em seis culturas de rim e em oito culturas de fígado (Tabela 5), porém sem a visualização de espiroquetídeos em todas essas culturas.

Tabela 5 - Roedores que apresentaram anel de opalescência à cultura em meio de Fletcher. Botucatu, SP, 2013.

Animal	Presença de anel de opalescência	
	Rim	Fígado
Rato 1	+	+
Rato 2	+	+
Rato 3	-	+
Rato 4	-	+
Rato 5	+	+
Rato 6	+	+
Rato 7	-	-
Rato 8	+	-
Rato 9	-	+
Rato 10	-	-
Rato 11	+	-
Rato 12	-	+
Rato 13	-	-

4.7. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira spp.*

4.7.1. Sangue

Dos 100 animais avaliados, 38 (38%) apresentaram positividade à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira spp.*, em amostras de sangue (Figura 10) .

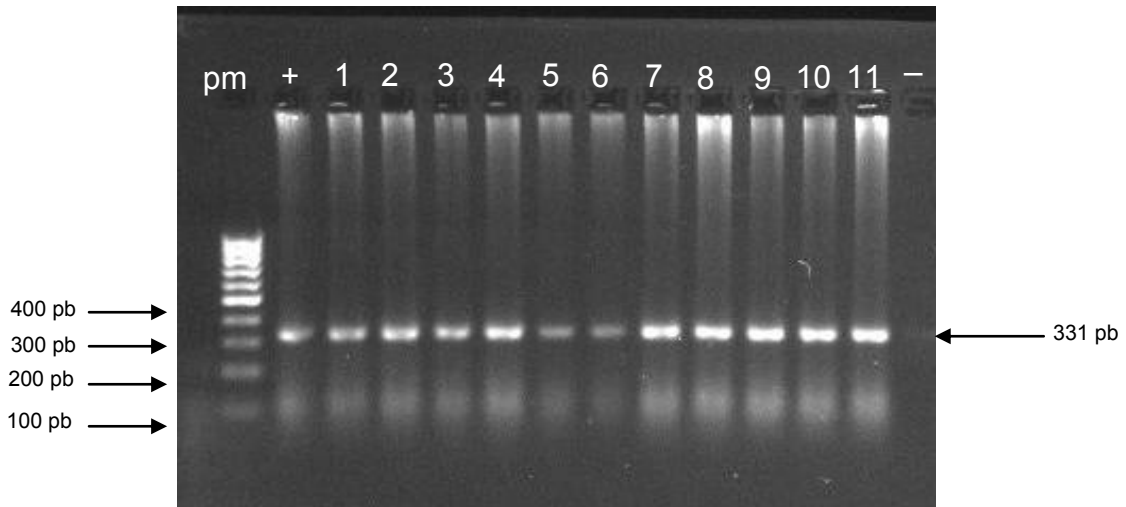


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os iniciadores LEP 1 e LEP 2 de 331 pares de base para *Leptospira* spp. em amostras de sangue positivas de espécies avaliadas do Centro de Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira-SP, pm= marcador de peso molecular, + = controle positivo, 1(bugio), 2 (mão pelada), 3= (cachorro do mato), 4 (macaco prego), 5 (queixada), 6 (cateto),7 (cotia), 8 (gambá), 9 (tatu), 10 (teiú), 11 (rato), - (controle negativo).

Dentre os 59 animais de vida livre estudados, 22 (37,3%) foram positivos à PCR para *Leptospira* spp., (Tabela 6) sendo que, dentre os 13 ratos analisados, seis (46,1%) foram positivos; em relação às cotias dentre os 13 animais avaliados, sete (53,8%) foram positivos; dos 13 tatus avaliados, um (7,7%) foi positivo ; dentre os seis gambás avaliados, um (16,6%) foi positivo e entre os 14 teiús avaliados, sete (50%) foram positivos.

Tabela 6 - Relação de animais de vida livre positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., a partir de amostras de sangue, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP,. Botucatu, SP, 2013.

Espécies de vida livre	Quantidade	% de animais positivos
Ratos (<i>Rattus</i> spp.)	13	6 (46,1)
Cotia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	13	7 (53,8)
Teiú (<i>Tupinambis merianae</i>)	14	7 (50)
Tatu (<i>Dasypus novemcintus</i>)	13	1 (7,7)
Gamba (<i>Didelphis albiventris</i>)	6	1 (7,7)
Total	59	22 (37,3)

Do total de 41 animais em cativeiro estudados, 16 (39%) foram positivos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira spp.*, (Tabela 7) sendo que, dentre os 12 queixadas avaliados, cinco (41,7%) foram positivos; dentre os oito bugios, quatro (50%) foram positivos; dentre os cinco mão pelada, um (20%) foi positivo; em relação ao cachorro do mato dos três animais avaliados, dois (66,7%) foram positivos; dentre os dois macacos prego, um (50%) foi positivo e dentre os três catetos, apenas um (33,3%) foi positivo. Os animais lobo guará e cachorro do mato vinagre foram avaliados apenas um sendo estes positivos (100%) . Os cinco gatos mouriscos e a raposinha avaliada foram negativos à PCR.

Tabela 7 - Relação de animais em cativeiro positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira spp.*, a partir de amostras de sangue, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP,. Botucatu, SP, 2013.

Espécies em cativeiro	Nº de animais	Nº / % de animais positivos
Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	12	5 (41,7)
Mão-pelada (<i>Procyon concrivourus</i>)	5	1 (20)
Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	8	4 (50)
Cachorro do Mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	3	2 (66,7)
Lobo Guará (<i>Crysocyon brachyurus</i>)	1	1 (100)
Macaco Pregó (<i>Alouatta caraya</i>)	2	1 (50)
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	3	1 (33,3)
Gato Mourisco (<i>Herpailurus yaguarondi</i>)	5	0
Raposinha (<i>Pseudolopex vetulus</i>)	1	0
Cachorro do Mato Vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)	1	1 (100)
Total	41	16 (39)

4.7.2. Cultura

Dos treze roedores sinantrópicos avaliados pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir da cultura em meio de Fletcher de órgãos (rim e fígado) quatro animais (30,8%) foram positivos à cultura, sendo um (7,7%) positivo nas duas culturas, um (7,7%) positivo somente na cultura de rim e dois (15,4%) somente na cultura de fígado (Tabela 8).

Tabela 8 - Relação de roedores positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir da cultura de órgãos, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

Animal	PCR (cultura/rim)	PCR (cultura/fígado)
Rato 1	-	-
Rato 2	-	-
Rato 3	-	-
Rato 4	-	-
Rato 5	-	-
Rato 6	-	-
Rato 7	+	-
Rato 8	-	+
Rato 9	-	-
Rato 10	+	+
Rato 11	-	+
Rato 12	-	-
Rato 13	-	-

4.7.3. Órgãos

Foi realizado também a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de rim e fígado dos treze roedores, com nove (69,2%) animais, sendo um animal (7,7%) positivo em rim e no fígado, dois (15,4%) positivos apenas no fígado e seis (46,1%) positivos apenas em rim (Tabela 9).

Tabela 9 - Relação de roedores positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de órgãos, procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, Botucatu, SP, 2013.

Animal	PCR (rim)	PCR (fígado)
Rato 1	+	-
Rato 2	+	-
Rato 3	-	-
Rato 4	-	+
Rato 5	+	-
Rato 6	-	+
Rato 7	+	-
Rato 8	-	-
Rato 9	+	+
Rato 10	+	-
Rato 11	-	-
Rato 12	+	-
Rato 13	-	-

4.8. Relação entre as técnicas diagnósticas utilizadas

Do total das 15 espécies avaliadas, observou-se que, em 14 (93,3%) haviam animais reagentes a pelo menos uma das provas diagnósticas utilizadas.

4.8.1. Roedores

Quanto aos roedores, pôde-se observar que à prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM), 13 animais (100%) foram reagentes, sete animais (53,8%) foram positivos à técnica de cultivo em meio de Fletcher®; seis (46,1%) apresentaram-se positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira spp.* a partir de sangue, nove (69,2%) foram positivos a PCR a partir de órgãos e quatro (30,7%) apresentaram positividade à técnica de PCR realizada a partir de uma alíquota da cultura de órgãos.(Tabela 10).

Tabela 10 - Relação entre as provas diagnósticas realizadas em roedores sinantrópicos (*Rattus* spp.) procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, Botucatu, SP, 2013.

Animal	SAM	Resultados						
		Cultura		PCR (sangue)	PCR (órgãos)		PCR (cultura)	
		Rim	Fígado		Rim	Fígado	Rim	Fígado
Rato 1	+	+	+	+	+	-	-	-
Rato 2	+	-	+	+	+	-	-	-
Rato 3	+	-	-	-	-	-	-	-
Rato 4	+	-	-	-	-	+	-	-
Rato 5	+	-	+	+	+	-	-	-
Rato 6	+	+	+	+	-	+	-	-
Rato 7	+	+	-	-	+	-	+	-
Rato 8	+	+	-	-	-	-	-	+
Rato 9	+	-	+	+	+	+	-	-
Rato 10	+	-	-	-	+	-	+	+
Rato 11	+	-	-	-	-	-	-	+
Rato 12	+	-	-	+	+	-	-	-
Rato 13	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: SAM= Soroaglutinação Microscópica; PCR= Reação em Cadeia pela Polimerase.
+ (Positivo); - (Negativo).

O gráfico 1 ilustra o número de roedores sinantrópicos positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, a partir de diferentes amostras.

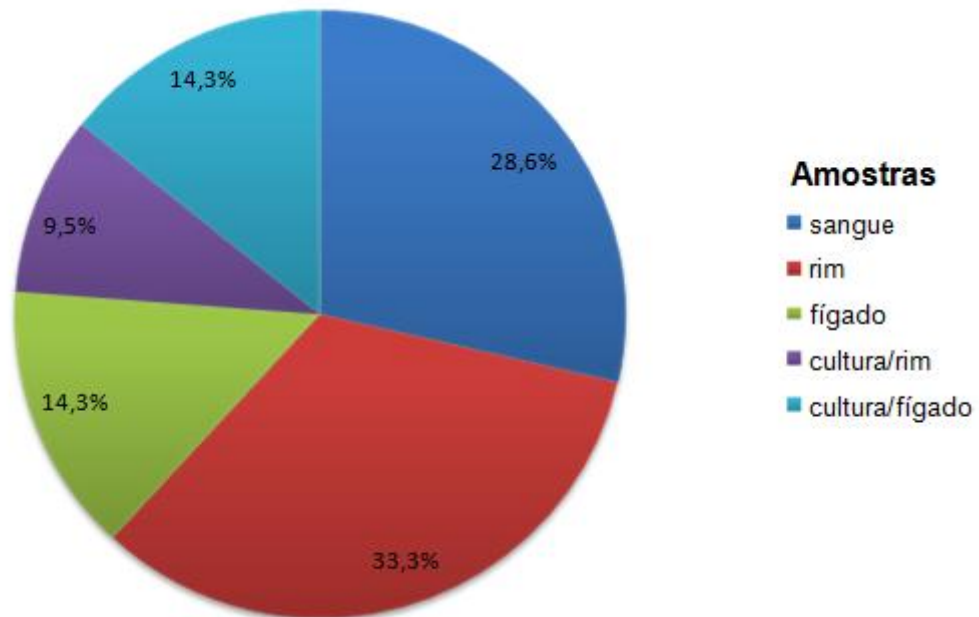


Gráfico 1 - Número de roedores sinantrópicos positivos à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp., procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

4.8.2. Demais espécies de vida livre

Em relação às demais espécies de vida livre; dentre os 14 teiús (*Tupinambis merianae*) sete (50%) foram positivos à PCR e 13 animais (92,8%) foram positivos à SAM; dentre os 13 tatus (*Dasypus novemcintus*), 12 (92,3%) foram positivos à SAM e um (7,7%) à PCR para *Leptospira* spp.; dos seis gambás (*Didelphis albiventris*) avaliados, seis (100%) foram positivos à SAM e um (7,6%) à PCR para *Leptospira* spp. e dentre as 13 cotias (*Dasyprocta aguti*) analisadas, 13 (100%) foram positivas à SAM e sete (53,8%) positivas à PCR para *Leptospira* spp. (Tabela 11).

Tabela 11 - Relação entre as provas diagnósticas realizadas em animais de vida livre procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

Animal/ Espécie	Resultados		
	Total de animais estudados	Nº de animais positivos à SAM	Nº de animais positivos à PCR para <i>Leptospira spp.</i>
Tatu (<i>Dasybus novemcintus</i>)	13	12 (92,3%)	1 (7,7%)
Teiu (<i>Tupinambis merianae</i>)	14	13 (92,8%)	7 (50%)
Gambá (<i>Didelphis albiventris</i>)	6	6 (100%)	1 (16,7%)
Cotia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	13	13 (100%)	7 (53,8%)
Total	46	44 (74,5%)	16 (34,8%)

Legenda: SAM= Soroaglutinação Microscópica; PCR= Reação em Cadeia pela Polimerase.

Em relação às espécies em cativeiro, apenas a raposinha (*Pseudolopex ventulus*) foi negativa em todos os testes diagnósticos realizados. Dentre os três catetos (*Pecari tajacu*), dois (66,7%) foram positivos à SAM e apenas um (33,3%) positivo à PCR para *Leptospira spp.*; em relação aos queixadas (*Tayassu pecari*), 11(92%) dos 12 animais avaliados foram positivos à SAM e cinco (41,6%) positivos à PCR; dos oito bugios (*Allouata caraya*) avaliados, seis (86%) foram positivos à SAM e quatro (57%) positivos a PCR; dentre os gatos mouriscos (*Herpailurus yaguarondi*) estudados, cinco (83,3%) foram positivos à SAM e todos foram negativos a PCR; dos cinco mão pelada avaliados, quatro (80%) foram positivos à SAM e um (20%) positivo à PCR; dos três cachorros do mato (*Cerdocyon thous*) avaliados, três (100%) foram positivos à SAM e dois (66,7%) à PCR; o cachorro do mato vinagre (*Speothos venaticus*) avaliado foi negativo à SAM e positivo à PCR; dentre os dois macacos prego (*Cebus apella*) avaliados, um (50%) foi positivo à SAM e à PCR. Quanto ao lobo guará (*Crysocyon brachyurus*), o mesmo foi positivo á SAM e à PCR (Tabela 12).

Tabela 12 - Relação entre as provas diagnósticas realizadas em animais de cativeiro procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

Animal/ Espécie	Resultados		
	Total de animais estudados	Nº de animais positivos à SAM	Nº de animais Positivos à PCR para <i>Leptospira spp.</i>
Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	12	11 (91,7%)	5 (41,7%)
Bugio (<i>Allouata caraya</i>)	8	6 (75%)	4 (50%)
Gato Mourisco (<i>Herpailurus yaguarondi</i>)	6	5 (100%)	0
Mão-pelada (<i>Procyon concrivourus</i>)	5	4 (80%)	1 (20%)
Cachorro do Mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	3	3(100%)	2 (66,7%)
Cachorro do Mato Vinagre (<i>Speothos venaticus</i>)	1	0	1(100%)
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	3	2 (66,7)	1 (33,3%)
Macaco Prego (<i>Cebus apella</i>)	2	1 (50%)	1 (50%)
Raposinha (<i>Pseudolopex ventulus</i>)	1	0	0
Lobo Guará (<i>Crysocyon brachyurus</i>)	1	1 (100%)	1 (100%)
Total	41	33 (80,5%)	16 (39,02%)

Legenda: SAM= Soroaglutinação Microscópica; PCR=Reação em Cadeia pela Polimerase.

4.9. Análise Estatística

A partir dos resultados obtidos através da técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) foi possível avaliar a sensibilidade e especificidade relativa das provas diagnósticas. Observando uma especificidade de 100% nos animais de vida livre e 38,6% de sensibilidade, no grupo de animais SAM em cativeiro a especificidade foi de 85,7% e a sensibilidade 44,1% (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de sensibilidade e especificidade relativa comparando Sororoglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em animais procedentes no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

SAM	PCR (sangue)					
	Animais em cativeiro			Animais de vida livre		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
Não reagente	6	1	7	2	0	2
Reagente	19	15	34	35	22	57
Total	25	16	41	37	22	59

Legenda: SAM= Soroaglutinação Microscópica, PCR= Reação em Cadeia pela Polimerase, S=sensibilidade, E= especificidade, K= kappa.

Animais em cativeiro; S= 44,1%, E= 85,7%, K= 0,04

Animais de vida livre: S= 38,6%, E= 100%, K= 0,14.

A partir das provas diagnósticas realizadas para os roedores sinantrópicos foi possível calcular a sensibilidade e especificidade relativa utilizando como padrão ouro a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), comparando-a com a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir de sangue, cultura em meio de Fletcher de órgãos (rim e fígado) e órgãos(rim e fígado), sendo que, nas três técnicas a especificidade foi de 0% com sensibilidade variando na PCR de sangue 46,1%, PCR de cultura 30,8% e PCR a partir de órgãos 69,2% (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de sensibilidade e especificidade relativa comparando Sororoglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em roedores capturados no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

SAM	PCR (sangue)			PCR (Cultura)			PCR (órgãos)		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
Não reagente	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reagente	7	6	13	9	4	13	4	9	13
Total	7	6	13	9	4	13	3	9	13

Legenda: SAM= Soroaglutinação Microscópica, PCR= Reação em Cadeia pela Polimerase, S=sensibilidade, E= especificidade, k= kappa.

PCR (sangue): S= 46,1%, E= 0%, K= -0,000%.

PCR (cultura): S= 30,8%, E= 0%, K= - 0,000%.

PCR(orgãos); S= 69,2%, E= 0%, K= -0,000%

Entre a Soroaglutinação Microscópica (SAM) e o cultivo em meio de Fletcher, na cultura observou-se uma maior sensibilidade (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores de sensibilidade e especificidade relativa comparando Sororoglutinação Microscópica (SAM) e Cultura em meio de Fletcher em roedores capturados no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP. Botucatu, SP, 2013.

SAM	Cultura em meio de Fletcher		
	Negativo	Positivo	Total
Não reagente	0	0	0
Reagente	6	7	13
Total	6	7	13

Legenda: SAM= Soroaglutinação Microscópica, S=sensibilidade, E= especificidade, K= kappa,

S= 53,8%, E= 0%, K= -0,000%.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Local

No estudo de uma zoonose a avaliação de alguns aspectos é de fundamental importância. Neste estudo, o foco é a pesquisa da infecção por *Leptospira* spp. em animais silvestres de vida livre e em cativeiro procedentes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira-SP, sendo que, alguns fatores epidemiológicos devem ser considerados. O local de origem dos animais estudados é o primeiro fator, pois as condições locais propiciarão ou não a permanência do agente infeccioso.

O CCFS possui uma área com ampla vegetação do tipo cerrado, localizando-se no perímetro urbano do município. Além dos animais em cativeiro, alberga animais de vida livre como teiús, tatus, cotias e gambás, tendo os mesmos sido avaliados no presente estudo. O clima quente do município de Ilha Solteira pode favorecer a manutenção de leptospiros nos recintos dos animais (bebedouros), bem como em coleções de água formada por acúmulos pluviais. Podemos verificar que os sete pontos de colocação das armadilhas para captura dos roedores foram estrategicamente colocados por toda extensão do Centro de Conservação da Fauna Silvestre, tendo-se capturado roedores em todos os pontos; o que demonstra que esses animais estão disseminados por todo o local.

As barreiras físicas nos recintos, representadas principalmente pelas grades de proteção, impedem a entrada de animais de vida livre como gambás, tatu, teiús e cotias. No entanto, não são suficientes para impedir a entrada dos roedores, os quais são atraídos pelas sobras alimentares, recolhidas uma vez ao dia pelos

funcionários do CCFS. Com isso, acabam por circular livremente pelos recintos, havendo a possibilidade de contaminação dos bebedouros dos animais pela urina destes roedores.

A possibilidade de eliminação de urina contaminada nos recintos é um fato a ser considerado, tendo em vista que as capturas dos roedores sinantrópicos ocorreram próximos aos seguintes recintos: anta (*Tapirus terrestris*), lobo guará (*Crysocyon brachyurus*), aves e queixadas (*Tayassu pecari*), tendo sido detectado positividade em queixadas e lobo guará à SAM e à PCR para *Leptospira* spp., como uma provável infecção destes animais a partir da urina destes roedores.

Roedores também foram encontrados no biotério, onde são mantidos camundongos e coelhos oferecidos como alimento para espécies como onça parda (*Puma concolor*) e onça pintada (*Panthera onça*). Tal fato pode ser relevante tendo em vista a possibilidade de contaminação da ração com a urina destes roedores, o que pode vir a desencadear a transmissão de leptospirose para os animais que consomem este alimento.

Os roedores são os principais reservatórios de leptospirosas, pois albergam essa bactéria nos rins e as eliminam vivas para o meio ambiente (48). A possibilidade destes roedores capturados no interior do CCFS terem tido acesso ao recinto dos animais em cativeiro é um fato possível, já que os mesmos poderiam eliminar leptospirosas nos bebedouros dos animais, possibilitando assim a infecção.

Alguns roedores foram capturados próximos ao recinto de animais positivos à SAM bem como à PCR, como foi o caso dos queixadas e do lobo guará, bem como próximos ao biotério. Camundongos, coelhos e galinhas, que são mantidos no

biotério, são oferecidos como alimento para estes animais, possibilitando uma fonte de infecção para estes animais, caso os mesmos tenham entrado em contato com as leptospirosas liberadas no ambiente do biotério, pela urina destes roedores que lá circulam. Da mesma forma, em relação ao aspecto de saúde pública, a contaminação do local coloca em risco os tratadores que trabalham neste ambiente e que diariamente entram em contato com diversos fômites que podem estar contaminados com a urina de roedores. Além disso, há ainda a circulação de visitantes do CCFS, que podem eventualmente entrar em contato com estes fômites, o que representa um grave problema de saúde pública.

Outro aspecto importante é o fato do CCFS estar localizado no perímetro urbano, o que facilita a sobrevivência dos roedores, pela acessibilidade ao alimento e aos domicílios vizinhos, e com isso a possibilidade de contaminação do ambiente com a urina destes animais.

5.2. Provas diagnósticas

5.2.1. Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Poucos estudos têm sido realizados para se obter a prevalência de leptospirose em animais silvestres no Brasil, devido a dificuldade de obtenção da colheita de amostra biológicas. Entretanto, em se tratando de animais em cativeiro tal procedimento é possível. No caso do CCFS, além dos animais mantidos em cativeiro também são encontrados animais de vida livre circulando livremente pelo local, o que possibilitou a captura dos mesmos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença da infecção por *Leptospira* spp., em diferentes espécies de animais selvagens mantidas em cativeiro no Centro de

Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, em espécies de vida livre e também em roedores sinantrópicos.

De acordo com o resultado sorológico obtido observou-se que 89% dos animais foram reagentes a leptospirose, indicando a presença desta zoonose no local. Verificamos que, 80,5% das espécies em cativeiro e 94,9% das espécies de vida livre foram reagentes, corroborando com o estudo realizado por Lenharo et al (68), em 72 mamíferos silvestres procedentes do Zoológico Municipal de Bauru com 60 (83,3%) dos animais reagentes, tendo-se como prevalente o sorovar Pyrogenes (15,2%). Já no presente estudo, o sorovar Andamana foi prevalente entre todos os animais avaliados.

Em relação à resposta sorológica de animais de vida livre e de animais em cativeiro, trabalho realizado por Silva (85), em Ribeirão Preto-SP, pesquisando a leptospirose em 339 animais silvestres, apresentou uma diferença em relação ao nosso estudo, onde se verificou maior número de animais em cativeiro reagentes à SAM (27,1%) em relação aos animais de vida livre, com 22,4% de animais reagentes.

Percentuais inferiores foram relatados por Corrêa et al. (56) em estudo realizado no Zoológico de São Paulo, onde foram avaliados 302 animais, sendo 59 (19,5%) positivos à SAM com prevalência dos sorovares Copenhageni (25,4%), Pomona (22%) e Castellonis (16,9%). Souza Junior et al. (70) no estado do Tocantins, avaliaram várias espécies de animais silvestres obtendo-se positividade à SAM de 12,6%. Esteves et al. (66) em pesquisa realizada no Zoo de Uberaba, avaliando 166 animais silvestres observaram que 12,9% apresentaram anticorpos

anti leptospiros, sendo os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Andamana os mais frequentes.

No presente estudo o sorovar Andamana foi o de maior prevalência entre os 29 sorovares testados, apresentando reatividade em 24 (24%) animais avaliados. Ainda que o sorovar Andamana tenha sido o sorovar de maior reatividade entre os animais, dentre as 15 espécies estudadas houve uma grande variação em relação à resposta sorológica por outros sorovares. A resposta sorológica aos diferentes sorovares empregados à técnica de SAM variou de espécie para espécie, no presente estudo. A espécie *Tayassu tajacu* (cateto) foi reagente para os sorovares Pyrogenes, Hebdomadis, Gryppothyphosa, Copenhageni e Pomona, apresentando título 400 apenas para os sorovares Hebdomadis e Copenhageni. Já Esteves et al. (67) verificaram o sorovar Icterohaemorrhagiae como sendo o único sorovar reagente para esta espécie.

Dos dois animais avaliados da espécie *Cebbus apella* (macaco prego) no presente estudo, um deles (50%) foi reagente apenas para o sorovar Pomona. Trabalho realizado em Tocantins por Souza Junior (70), estudando 286 macacos-prego, 46 (16,1%) foram sororreagentes para diferentes sorovares testados, dentre eles Shermani, Andamana, Pyrogenes, Grippothyphosa, Australis, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Hardjo, Hebdomanis, Pomona e Wolffi.

Dentre os cinco animais avaliados em nosso estudo da espécie *Procyon concrivourus* (Mão Pelada), quatro (80%) apresentaram sororreatividade para oito sorovares, sendo estes Butembo, Canicola, Grippothyphosa, Pomona, Shermani, Andamana, Wolffi e Djasiman, sendo este último o de maior título (400). Já o estudo

realizado por Pimentel em Aracaju-SE (76), com seis animais dessa espécie apenas um (16,7%) foi reagente e somente para o sorovar Copenhageni.

No presente estudo, a prevalência de animais reagentes da espécie *Allouata caraya* (bugio) foi alta, com 75% entre os oito animais avaliados, para os seguintes sorovares: Autumnalis, Copenhageni, Andamana, Grippothyphosa, Australis, Castellonis, Pomona, Hardjominiswajezak, Hardjoprajitno, Hebdomadis e Wolffi, tendo sido o sorovar Pomona de maior prevalência e apresentado o maior título (200). Lenharo (68), em seu estudo no Zoo de Bauru, dentre os dois bugios avaliados, apenas um foi reagente para os sorovares Pomona e Pyrogenes.

Dentre os três animais da espécie *Cerdocyon thous* (Cachorro do Mato) avaliados, três (100%) foram reagentes para os sorovares Autumnalis, Djasiman, Copenhageni, Butembo, Castellonis, Sentot, Canicola, Whitcombi, Icterohaemorrhagiae, GryppotyphosaJavanica, Panamá, Pomona e Tarassovi. Por outro lado, Pimentel et al. (76), avaliando um exemplar cachorro do mato em Aracaju-SE, o animal apresentou sorreatividade apenas para o sorovar Copenhageni.

Ainda, em nosso estudo, dos cinco gatos mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*) avaliados 100% de animais foram reagentes para os sorovares Butembo, Cynopteri, Pyrogenes, Australis e Autumnalis, sendo prevalentes os sorovares Autumnalis, Butembo, Cynopteri, Grippothyphosa, Andamana e Hardjobovis, com maior título para o Autumnalis (1600). Confrontando-se com os resultados obtidos por Lenharo et al. (68), em seis animais desta espécie, quatro (66,7%) reagentes para os sorovares Hebdomanis e Pyrogenes.

Lopes et al. (86), avaliando animais silvestres de produção, analisaram 27 queixadas (*Tayassu pecari*) em abatedouros nos estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais e obtiveram 48% de positividade, tendo-se como prevalente o sorovar Gryppothyphosa. Entretanto, no presente estudo encontraram-se 11 animais positivos (91,7%) para os sorovares Bataviae, Whitcombi, Djasiman, Wolffi, Australis, Gryppothyphosa, Tarassovi, Andamana, Patoc, Hardjominiswajezak, HardjoCTG, Butembo, Castellonis, Cynopteri, Hebdomadis, Copenhageni, Shermani e Canicola, Panama, Pyrogenes, Hardjoprajitno, tendo-se como mais prevalentes os sorovares Djasiman e Gryppothyphosa com sorovar Copenhageni apresentado maior título (3200).

Apenas um exemplar de lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) foi avaliado, e este foi reagente para o sorovar Hardjobovis. Da mesma forma, Esteves (67) avaliaram um animal desta espécie e verificaram positividade apenas para o sorovar Canicola.

Em relação às espécies de vida livre deste estudo, todas foram reagentes para diversos sorovares. Quanto aos 13 tatus (*Dasypus novemcinctus*), 12 (92,3%) foram reagentes para os sorovares Djasiman, Shermani, Patoc, Cynopteri, Tarassovi, Hardjominiswajezak, Canicola, Whitcombi, Bataviae, Sentot, Hebdomadis, Pyrogenes, Hardjo, Australis, Panamá, Bratislava, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Castellonis, Andamana, Butembo, HardjoCTG, Hardjobovis, Hardjo prajitno e Gryppothyphosa. Os sorovares Patoc, Butembo, HardjoCTG e Hardjo prajitno apresentaram maior título (3200), sendo o sorovar Sentot o mais prevalente. No entanto, Silva et al. (87) no Instituto Lauro de Souza Lima em Bauru-SP, avaliando 31 tatus (*Dasypus novemcinctus*), três (9,68%) foram sororreagentes para os

sorovares Autumnalis, apresentando título 200; um animal reagente para Grippytyphosa (título 50) e outro reagente ao sorovar Patoc (título 100). Os tatus são considerados potenciais transmissores de leptospirose, mesmo porque existem locais onde o hábito de ingerir essa carne mal cozida é comum, constituindo um fator de risco (87).

No presente estudo, quatorze teiús (*Tupinambis merianae*) foram avaliados, obtendo-se 92,8% de animais soropositivos, com resposta para os 29 sorovares testados. Os sorovares mais prevalentes foram Cynopteri, Djasiman, Andamana, Hardjo, Javanica, Hebdomadis, Bataviae, Hardjo miniswajezak e Pyrogenes; entretanto os sorovares com maior título (3200) foram Cynopteri e Djasiman.

Os animais de vida livre cotia (*Dasyprocta aguti*), gambá (*Didelphis albiventris*) e os ratos (*Rattus* spp.) apresentaram 100% de soropositividade, com grande número de sorovares reagentes. As cotias foram reagentes para 28 dos 29 sorovares testados, tendo-se como prevalentes os sorovares Shermani e Djasiman. O sorovar Bataviae apresentou o maior título (1600).

Quanto aos seis gambás avaliados, os mesmos apresentaram sororreatividade para os sorovares Andamana, Autumnalis, Bratislava, Butembo, Djasiman, Hebdomadis, Pomona, Hardjo, Tarassovi, Bataviae, Canicola, Australis, Grippythyphosa, Icterohaemorrhagiae, Sentot e Patoc, tendo-se como mais prevalentes o Andamana e Autumnalis ambos com título 3200. Já Silva et al. (85) realizaram um estudo em Jaboticabal-SP onde foram analisados 25 gambás, tendo-se 11(44%) animais positivos somente para os sorovares Patoc, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae; Jorge (88), estudando 33 gambás (*Didelphis albiventris*) em

Pelotas-RS obteve soropositividade em 12 (36,36%) dos animais reforçando a importância desta espécie na epidemiologia desta zoonose.

Os 13 ratos deste estudo demonstraram soropositividade sendo reagentes a 25 dos 29 sorovares testados (Sentot, Whitcombi, Tarassovi, Castellonis, Cynopteri, Shermani, Autumnalis, Hardjobovis, Bratislava, Andamana, Butembo, Sentot, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Hardjo, Australis, Canicola, Gryppothyphosa, Wolffi, Hebdomadis, Copenhageni, Javanica, Bataviae, Djasiman e Panamá). Foram mais prevalentes os sorovares Wolffi e Sentot, com maior título (3200) para os sorovares Castellonis, Australis, Pyrogenes e Wolffi.

Verificou-se uma alta soropositividade à SAM nos roedores sinantrópicos capturados no CCFS, assim como uma grande variedade dentre os sorovares reagentes. Estes resultados que corroboram os obtidos por Lenharo et al. (68) no Zoo de Bauru, pois de 50 roedores sinantrópicos capturados, 48 (96%) foram reagentes, com uma ampla variedade de sorovares reagentes.

Côrrea et al. (56), em trabalho realizado no Zoo de São Paulo avaliaram sete roedores capturados no interior do parque, encontrando positividade em somente três animais (42,8%), reagentes apenas ao sorovar Icterohaemorrhagiae, diferindo desta pesquisa e dos trabalhos citados anteriormente, cujos roedores foram reagentes a uma ampla variedade de sorovares, dentre eles também ao sorovar Icterohaemorrhagiae.

As espécies *Herpailurus yagouaroundi* (Gato Mourisco), *Cerdocyon thous* (Cachorro do Mato), *Crysoyon brachyurus* (Lobo Guará) e *Procyon concrivurus* (Mão Pelada), do centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, são

imunizados anualmente com a vacina Duramune® Max 5 Cvk/4L. Entretanto, esta vacina contém quatro sorovares *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona* e *Gryppothyphosa*. Estes animais apesar de apresentarem resposta a alguns sorovares da vacina, também foram reagentes para outros sorovares.

5.3. Cultura em meio de Fletcher

A tentativa de isolamento do agente infeccioso tem sido considerada uma técnica com baixa sensibilidade, laboriosa e que depende de muitos fatores para que se obtenha sucesso na visualização do espiroquetídeo. (89). Em 2004 Girio et al., (52) em seu estudo com animais silvestres tentaram o isolamento a partir de fragmentos de rim de doze animais, porém sem sucesso. Em nosso estudo o isolamento em meio de Fletcher a partir de fragmentos de fígado e rim dos treze roedores sinantrópicos capturados em diferentes pontos do CCFS, apresentou positividade em órgãos de sete animais (53,8%). Dos sete animais positivos ao isolamento, três ratos (42,8%) foram positivos apenas para amostra renal; dois ratos (28,6%) do total avaliado apresentaram positividade nos fragmentos de rim e dois animais (28,6%) apresentaram positividade nos fragmentos de rim e fígado simultaneamente. No entanto, animais negativos ao isolamento, porém positivos à SAM, apenas desenvolveram anticorpos contra alguns sorovares de leptospiras, demonstrando o contato prévio com o agente. Já os animais positivos ao cultivo, representam um perigo à saúde pública, já que apresentam leptospiras nos rins, evidenciando o fator de risco como disseminadores desta bactéria no ambiente.

5.4. Reação em Cadeia pela Polimerase

Uma ferramenta de diagnóstico que vem sendo utilizada com sucesso para detecção e confirmação do agente causador da leptospirose, é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) uma vez que, para o emprego da técnica não é necessário a viabilidade do patógeno, permitindo a detecção do agente em amostras autolisadas, congeladas ou mal conservadas, o que não seria possível no isolamento e a inoculação experimental (90). É portanto considerada uma técnica sensível e específica (91).

Em nosso estudo obteve-se uma alta porcentagem (89%) de animais positivos a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), e apenas 38% de positividade à PCR a partir de amostras de sangue. Em estudo realizado por Oliveira (88) ele cita vários fatores para a diferença de positividade à SAM em relação à PCR. O título de anticorpos contra *Leptospira* spp. apresentados por esses animais seriam apenas de um contato com o agente infeccioso porém sem o desenvolvimento da leptospirose doença e , portanto sem o encontro desse agente à PCR.

Espécies como *Procyon concrivurus* (mão pelada), *Crysoyon brachyurus* (lobo guará) e *Cerdocyon thous* (cachorro do mato) são animais vacinados anualmente e que apresentaram positividade a SAM porém com animais negativos a PCR , podendo ser explicado pelo fato dos títulos sorológicos apresentados por esses animais serem oriundos de reposta vacinal. (89)

Dos roedores sinantrópicos também foi realizada a PCR a partir de fragmentos de rim e fígado, sendo que dos treze animais positivos a SAM, apenas

nove (69,2%) foram positivos a PCR a partir de órgãos. Isto pode estar ligado ao fato desses animais estarem com infecção recente, apresentando altos títulos sorológicos sem no entanto ter ocorrido a colonização renal ou hepática (89). A PCR realizada a partir da cultura de rim e fígado em meio de Fletcher, evidenciou quatro (30,8%) animais positivos, devendo-se considerar a dificuldade de isolamento desde o momento da coleta dos órgãos destes animais e a chegada a laboratório, até o seu processamento, ou devido estes animais apresentarem no momento da coleta, um pequeno número de leptospiras nestes órgãos, insuficientes para o sucesso ao isolamento e conseqüentemente à PCR.

5.5. Relação entre as provas diagnósticas

Em relação às diferentes técnicas diagnósticas empregadas para a detecção da leptospirose, o teste preconizado pelo Ministério da Saúde é a prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) (82). Na interpretação desta prova, deve-se considerar a resposta ao título obtido, sendo a sorologia pareada adequada para uma interpretação segura. No entanto, os animais deste estudo foram submetidos à colheita de sangue em apenas um momento. Verificou-se que 89 (89%) dos animais foram sororreagentes e que, destes, 38 (38%) foram positivos à técnica de PCR para *Leptospira* spp. a partir das amostras de sangue, o que sugere uma infecção ativa, tendo em vista o encontro do DNA da bactéria no sangue, o que é um fato bastante alarmante, sugerindo medidas urgentes de controle da leptospirose no CCFS de Ilha Solteira.

A partir da análise dos resultados obtidos nas técnicas de diagnóstico realizadas, observaram-se os prováveis estágios de infecção nos animais

estudados, baseando-se em estudo de Levett (92). Dos 100 animais analisados, nove animais foram negativos em todas as provas realizadas, indicando ausência de infecção; 48 animais foram positivos somente à sorologia, indicando provavelmente um contato prévio com o agente etiológico, sem desenvolvimento da doença.

A partir da análise estatística pode-se observar uma fraca concordância entre a soroalutinação microscópica (SAM) e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de sangue, isso devido a fatores citados anteriormente quanto a diferença de animais positivos.

Vários estudos têm demonstrado que a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) têm sido uma técnica com maior sensibilidade que a sorologia e também mais precisa (93). É Considerada uma técnica importante para a detecção precoce do microrganismo, enquanto que os outros métodos falharam ou provam não serem confiáveis (94,95).

Os resultados de nosso estudo evidenciaram a sorologia como mais sensível, sendo que a PCR apresentou uma sensibilidade de 44,1% nos animais de vida livre e 38,6% nos animais em cativeiro. No entanto a PCR mostrou ser mais específica em relação a SAM com uma especificidade de 100% nos animais em cativeiro e de 85,9% nos animais de vida livre.

Nos roedores sinantrópicos, apesar de não se ter uma concordância entre a sorologia e a PCR realizada a partir dos diferentes tipos de amostras biológicas(sangue, órgão e cultura de órgãos), a sensibilidade das técnicas para detecção do agente infeccioso foi maior na PCR de órgãos.

Apesar da cultura bacteriológica ser considerada uma técnica bastante laboriosa e muitas vezes sem sucesso em diversas pesquisas(96, 97, 98, 99) em nosso estudo mostrou ser mais sensível que a SAM .

O conhecimento da presença de anticorpos contra *Leptospira* na fauna silvestre de vida livre e em cativeiro, nos ambientes de Zoo e parques, é importante para o controle e profilaxia nas espécies domésticas e também para o ser humano (68,100). Portanto, tendo em vista os resultados obtidos em nosso estudo, tanto para os animais de vida livre como os animais em cativeiro, sugere-se que há necessidade de um monitoramento constante dos animais e a necessidade da adoção de medidas de controle para esta e outras zoonoses no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, foi possível concluir que:

- A soroprevalência de leptospirose entre os animais de vida livre foi maior que em relação aos animais em cativeiro;
- Animais em cativeiro apresentaram maior positividade à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em relação aos animais de vida livre;
- Os roedores siantrópicos capturados no interior do CCFS são portadores renais e/ou hepáticos de *Leptospira* spp., comprovado tanto pelo cultivo em meio de Fletcher, quanto ao teste de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp.;
- A Soroaglutinação Microscópica (SAM) mostrou-se mais sensível em relação à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) a partir do sangue e cultura; já a PCR a partir órgãos apresentou maior sensibilidade que a técnica de SAM;
- O isolamento em meio de Fletcher foi mais sensível que a Soroaglutinação Microscópica (SAM);
- A infecção leptospírica ocorre entre os animais mantidos em cativeiro, entre os animais de vida livre e entre os roedores sinantrópicos que

circulam no Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira-SP, sendo então necessária a manutenção do controle populacional de roedores sinantrópicos e a adoção de medidas profiláticas para controle desta zoonose no local.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Dobson AP, Carper ER. Infectious diseases and human population history. Bioscience. 1996; 46(2): 115-26.
- 2-Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta Trop. 2001; 78 (2): 103-16.
- 3- Patz JA, Graczyk TC, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int. J. Parasitol. 2000; 30 (12-13): 1395-405. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00141-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00141-7).
- 4- Taylor LH, Latham Sm, Woolhouse MEJ. Risk factors for human disease emergence.Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 2001; 356(1411): 983-89.
- 5- Guerra Neto G. Freqüência de anticorpos contra *Leptospira spp.* em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil [dissertação]. Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; Universidade Estadual Paulista ; 2006.
- 6- Millán J, Candela MG, López-Bao JV, Pereira M, Jiménez, MA, León-Viscaíno, L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009;9(5):549-54.

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biochemical journals. Ann Inter Med 1997; 126:36-47.

National library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2001. 248p.

- 7- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(12): 757- 71. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2).
- 8- Trabulsi LR. *Microbiologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2004; p. 212-3.
- 9- Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes Infect.* 2000; 2(10):1265-76. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01280-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01280-6).
- 10- Veronesi R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- 11- Corrêa JR. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- 12-Baraton G, Postic D. *Méthodes de Laboratoire: leptospirose, borreliose Lyme*. Paris: Instituto Pasteur. 1989; 107.
- 13-Faine S. *Leptospira and Leptospirosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994; 353.
- 14-Centro Panamericano de Zoonosis. *Manual de Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis*. Washington; 1985. (Nota Técnica,30).
- 15- Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira and leptospirosis*. *Vet. Microbiol.* 2010; 140(3-4):287-96. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

- 16- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys M A, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Braz. J. Med. Biol. Res. 2004;37(4):459-77.
- 17- Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, Pettinelli F, et al. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). Plos Negl. Trop. Dis. 2010;4(6):724.
- 18- Portal da Saúde. Leptospirose [Internet]. Brasília. [acesso 2013 jan 15]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1562
- 19- Leptospirose. Série histórica [Internet]. São Paulo. [acesso 2012 fev 20] Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/LEPTO_ANO.htm
- 20- Gouveia EL, Metcalfe J, De Carvalho ALF, Aires TSF, Villalobos-Bisneto JC, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhage syndrome, Salvador, Brazil. Emerg Infect Dis. 2008;14(3):505-8.
- 21- Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis. Intern. J. Antimicrob. Agents. 2010;36 suppl 1:55-7. doi: 10.1016/j.ijantimiag.2010.06.012
- 22- Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLRS, Dellagostin OA. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(4):294-300. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000400003>

- 23- Venugopal K, Ratnam S. Lesions and immune responsis produced in hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of *Leptospira* Indian. Indian J. Exp. Biol. 1990; 28(11): 1075-77.
- 24- MACEDO NA. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorovar pomona [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 1991.
- 25- Huttner MD, Pereira HCP, Tanaka RM. Pneumonia por Leptospirose. J Pneumologia 2002; 28 (4): 229- 232. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-35862002000400007>.
- 26- Hill MK, Sanders CV. Leptospiral pneumonia. Semin Respir Infect . 1997; 12(1): 44- 9.
- 27- Ministério da Saúde (Brasil), Fundação Nacional da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia Manual de Leptospirose. Brasília: 2^a. ed, 1995. 98 p.
- 28- Ahmad SN, Shah S, Ahmad FMH. Laboratory diagnosis of leptospirosis. J Postgrad Med.2005;51(3):195-200
- 29- World Health Organization (2003). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, 2003;109.
- 30 –Smythe LD, Smith IL., Smith GA, Dohnt, MF, Symonds ML, Barnett LJ, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis. 2002;2(13). doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-2-13>

- 31-Palaniappan RU, Mcdonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, et al. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect Immun*. 2006; 74(3) 1745-50.
- 32- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V.; Christou L., Akritidis N. The globalization of leptospirosis; worldwide incidence trends. *Inter. J. Infect. Dis*. 2008;12(4):351-7.
- 33- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*. 2. ed., Melbourne: MedSci; 1999.
- 34- Dias JP, Teixeira MG, Costa MCN, Mendes CMC, Guimarães P, Reis MG, K A, Barreto ML. Factors associated with *Leptospira* sp. infection in a large urban Center in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(5):499-50
- 35- Beaurepaire AH. *Brasil Médico*. 1917;31:329.
- 36- Carini A. *An. Paul. Med. Cir*. 1918;9:70.
- 37- Enrietti M. Contribuição ao conhecimento da incidência de *Leptospiras* em murédeos, caninos e suínos no Paraná. *Arq Biol Tecnol*. 1954;9:21-72.
- 38- Lins ZC, Lopez ML, Maroja OM. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição a ciências biológicas e a medicina tropical In: *Epidemiologia da leptospirose com particular referência a Amazônia brasileira*. Belém, Brasil. 1986;2:733-64.
- 39- Corrêa MOA, Hyakutake S, Natale V, Galvão PAA, Aguiar HA. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 1965/1970; 25/27:11-25.

- 40- Santa Rosa CA, Silva AS, Giorgi W, Machado A. Isolamento de *Leptospira* sorotipo Pomona e Brucella suis de suínos do Estado de Santa Catarina. Arq. Inst. Biol. 1973;40:29-32.
- 41- Corrêa MOA, Hyakutake S, Azevedo R. Considerações sobre novo surto epidêmico de leptospirose na cidade do Recife em 1970. Rev Inst Adolfo Lutz. 1972;32:83-7.
- 42- Santa Rosa CA, Castro AFP, Campedelle Filho O, Mello D. Leptospirose em Equinos. Arq Inst Biol. São Paulo. 1968;35:61-5.
- 43- Giorgi W., Teruya JM., Silva A.S Leptospirose: Resultados das soroaglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo durante os anos de 1974/1980. Biológico. 1981; 47(11):299-309.
- 44- Faine S. Guidelines for the controlo of Leptospirosis. World Health Organization, WHO offset publication. 6. Genebra. 1982.
- 45- Azevedo SS, Alves CJ, Oliveira RM, Assis DM, Farias AEM, Lucena TCC, Batista CSA, Castro V, Figueiredo SM, Santos TCP, Genovez ME. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira spp.* em suínos abatidos no matadouro público de Patos, Estado da Paraíba. Arq Inst Biol. 2008;75:517-520.
- 46- Santa Rosa CA, Castro AFPD, Silva ASD, Teruya JM. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 1969/1970; 29/8019-27.
- 47- Cordeiro F, Ramos AA, Batista Jr JA. Aglutininas antileptospira em soros de equinos de Minas Gerais. Pesq Agropec Bras. 1974;9:45-8.

48- Ministério da Saúde (BR). Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia. Guia de Vigilância epidemiológica. 4ª Ed. Brasília: Ministério da As; 1998. 523p.

49- Marinho M, Langoni H, Oliveira SL, Carreira R, Perri SHV, Luvizoto MC. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e Balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. Pesq Vet Bras. 2003;23(1):5-12.

50- Vedor EP. Leptospirose Humana: uma análise climato-geográfica de sua manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. In: Anais XII Simpósio Brasileiro de sensoriamento remoto, Goiânia. INPE. 2005: 2301-8.

51- Lins ZC, Lopez ML. Maroja OM. Epidemiologia da leptospirose com particular referência a Amazônia brasileira. In: Fundação Serviços de Saúde Pública. Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição as Ciências Biológicas e a medicina tropical; 1986. p.733-64.

52- Girio RJS, Pereira FLG, Marchiori MF, Mathias LA, Herreira RCP, Alessi AC, et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. Ciênc. Rural. 2004;34(1):165-9.

53- Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales: Bacteriosis y Micosis. 3ª ed. Washington: Pan. American Health Organization; 2003

- 54- Thrusfield M. Epidemiologia Veterinária. 2ª ed. São Paulo:Roca; 2004.
- 55-Silva JCR, Marvulo MFV, Dias RA, Ferreira F, Amaku M, Adania CH, et al. Risk factors associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Brazil. *Prev Vet Med.* 2007;78(3-4):286-95.
- 56- Corrêa SHR, Vasconcellos SA, Moraes Z, Teixeira AA, Dias RA, Guimarães MABV, et al. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2004;41(3):189-93.
- 57- Reilly JR, Ferris DH, Hanson LE. Experimental demonstration of the enteric route of infection with *Leptospira grippotyphosa* in wild carnivores. *Am J Vet Res.* 1968; 29(9):1849-54.
- 58- Michna SW, Campbel RSF. Leptospirosis in wild animals. *J. Comp.e Pathol.* 1970;80:101-6. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9975\(70\)90036-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9975(70)90036-8)
- 59-Twigg GI, Cox PJ. The distribution of leptospirosis in the kidney tubules of some british wild mammals. *J Wildl Dis.* 1976;12(3):318-21
- 60- Webster JP, Ellis WA, Macdonald DW. Prevalence of *Leptospira spp.* In wild brown on farms. *Epidemiol Infect.* 1995;114:195-201.
- 61- Shive RJ, Green SS, Evans BS, Garner FM. Leptospirosis in barbary apes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1969; 155(7):1776-8.
- 62- Sá LRM, Teixeira RHF, Loreto C, Catão-Dias JL. Leptospirose em primatas neotropicais. In: Congresso da associação brasileira demedicos veterinários de animais selvagens, 3.; encontro da associação brasileira de médicos veterinários de animais selvagens, 8., São Pedro, SP. Resumos. São Paulo: 1999. p.7.

- 63-Hodgin C, Schillorn WT, Fayer R, Richter N. Leptospirosis and coccidial infection in a guanaco. J. Am. Vet. Med., 1984; 185(1):1442-4.
- 64- Farias TM, Silva LHR, Pimentel TL. Incidence of leptospirosis in giant otters at the FUNPEB, Brasilia Pole Ecological Foundation. In: BRAZIL BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 1999, Wailea: The Society of Marine Mammology, p.55
- 65-Lilenbaum W., Monteiro R.V., Ristow P., Fraguas S., Cardoso V.S. & Fedullo L.P.L. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. Res. Vet. Sci. 73:319-21.
- 66- Guerra Neto G, Girio RJS, Andrade TM, Koproski LP, Moraes W, Santos LC. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira spp.* em felídeos neotropicais pertencentes ao criadouro de animais silvestres da Itaipu Binacional e ao zoológico municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, Estado do Paraná. ARS Vet. 2004;20(1):75-80.
- 67- Esteves FM, Guerra-Neto G, Girio RJ Da S, Silva-Vergara ML. Carvalho AC De FB. Detecção de anticorpos para *Leptospira spp.* em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. Arq Inst Biol. 2005;72(3):283-8.
- 68- Lenharo DK, Santiago MEB, Lucheis SB. Avaliação sorológica para Leptospirose em mamíferos silvestres procedentes do parque zoológico municipal de Bauru, SP. Arq Inst Biol. 2012; 79(3):333-41.

- 69- Ullman LS, Neto ND, Teixeira RHF, Nunes AV, Silva RC, Pereira-Richini VB, et al. Epidemiology of leptospirosis at Sorocaba Zoo, São Paulo state, Southeastern Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2012; 32(11):1174-78.
- 70- Souza-Junior MF, Lobato ZIP, Lobato FCF, Moreira EC, Oliveira RR, Leite GG, et al. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. *Rev Soc Bras Med. Trop.* 2006;39(3):292-94.
- 71- Miranda FR. Pesquisa de anticorpo para bactéria do gênero *Brucella* spp, *Leptospira* spp, *Clamydophila* spp em tamanduás-bandeira (*Mymecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758), da RPPN SESC Pantanal, Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Nacional das Emas [dissertação]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2008.
- 72- Shotts EB, Andrews CL, Harvey TW. Leptospirosis in selected wild mammals of Florida panhandle and southwestern Georgia. *J Am Vet Med Assoc.* 1975;167(7):587–89.
- 73- Mitchell MA, Hungerford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier RJ, et al. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *J Wildl Dis.* 1999;35(2):347–55.
- 74- Richardson DJ, Gauthier JL. A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2003;3(4):187–93.

75- Junge RE, Bauman K, King M, Gompper ME. A serologic assessment of exposure to viral pathogens and *Leptospira* in a urban raccoon(*Procyon lotor*) population inhabiting a large zoological park. J Zoo Wild Med. 2007;38(1):18-26.

76-Pimentel JS , Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcelos SA, Morais ZM, et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. Pesq Vet Bras. 2009;29(12):1009-14. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009001200010

77- Marchiori Filho M, Girio RJS, Lui JF, Mathias LA, Brasil ATR. Estudo sorológico para leptospirose em populações de diferentes grupos genéticos de javalis (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758) dos estados de São Paulo e Paraná. Arq Inst Biol. 2002;69(3):9-15.

78- Milagres BS. Perfil sorológico de algumas infecções capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* capturadas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2004.

79- Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC, Silva MV, Lomar AV. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1992; 34(3): 217-21.

80- Ilha Solteira.Prefeitura Municipal.Conheça as maravilhas de Ilha solteira [internet]. Ilha Solteira; 2013. [acesso 2012 nov 27]. Disponível em: www.ilhasolteira.sp.gov.br.

81- Companhia Energética do Estado de São Paulo. Manejo Silvestre. Ilha Solteira/SP; 2011. [acesso 2011 fev 08]. Disponível em: www.cesp.com.br.

- 82- Ministério da Saúde (Brasil), Fundação Nacional da Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia Manual de Leptospirose. Brasília: 2^a. ed, 1995. 98 p.
- 83- Passos EC, Vasconcellos AS, Ito FH, Yasuda PH, Júnior RN. Isolamento de leptospiras a partir do tecido renal de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. Emprego das técnicas da pipeta Pasteur e das diluições seriadas em meio de Fletcher tratado com o 5-Fluor-Uracil ou sulfato de neomicina. Rev Fac Med Vet Zootec Univ S Paulo. 1988; 25(2):221-35.
- 84- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons IS. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* in clinical samples. J Clin Microbiol. 1992;30(9):2219-24.
- 85- Silva FJ, Mathias LA, Magajevski FS, Werther K, Assis NA, Girio RJS. Anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais domésticos e silvestres presentes no campus universitário da FCAV, Unesp, Jaboticabal/SP. ARS Vet. 2010; 26(1):17-25.
- 86-Lopez RPG. Avaliação sanitária de animais silvestres de produção abatidos em abatedouro. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo; 2009.
- 87-SILVA RC, Zetun CB, Bosco SMG, Bagagli E, Rosa OS, Langoni H. Toxoplasma gondii and *Leptospira spp.* infection in free-ranging armadillos. Vet Parasitol. 2008;157:291-3.

- 88- Jorge S. Identificação molecular e perfil sorológico de leptospira spp. isolada de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) no sul do Brasil [dissertação]. Pelotas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
- 89- Shimabukuro FH, Domingues PF, Langoni H, Silva AV, Pinheiro JP, Padovani CR. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003;40:243-53.
- 90- Scarcelli E, Piatti RM, Fedullo JDL, Simon F, Vasconcellos C, Castro V, et al. *Leptospira* spp detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*). *Braz J Microbiol.*, 2003;34:143-6.
- 91- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, Mezabrewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32 : 1894- 8.
- 92- LevettPN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(2):296-326.
- 93- Souto A. Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres no Pantanal Sul-Matogrossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares [dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2009.
- 94- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard COR, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 1995;43:110–4.

- 95- Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods* 2006;65:247–57.
- 96- Grooms, D.L., Bolin, C.A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and *Leptospira* spp. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2005;21:463–72.
- 97- Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhaim LJ, et al. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res Vet Sci.* 2009;87:16–9.
- 98- Fearnley C, Wakley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C, et al. The development of a real time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res. Vet. Sci.* 2008.85:8–16.
- 99-Fornazari F, Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HEO, Luvizotto MCR, Langoni H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J. Microbiol. Methods.*, 2012;90:321–6.
- 100- Sosa G, Santos O, Duarte CL, Hernandez D. Investigación sorológica y bacteriológica de leptospirosis realizada en fauna exótica. *Rev Cub Ciên Vet.* 1988; 19(3):219-26.


ANEXOS

8. ANEXOS

1. Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CEEA) para realização do Estudo.

 <p>UNESP</p> <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA</p>  <p>FMB 1931</p>	 <p>CEEA</p> <p>Comitê de Ética em Experimentação Animal</p>  <p>Citada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99</p>
<h1>Certificado</h1>	
<p>Certificamos que o (Protocolo CEEA 871-2011) Diagnóstico laboratorial da infecção por <i>Leptospira</i> spp. em animais silvestres e em rebanhos procedentes do centro de conservação da fauna silvestre de Ilha Solteira - SP, a ser conduzido por Mirian dos Santos Paixão, orientada pela Prof^a. Dr^a. Simone Baldini Luchesi, co-orientada por Wilma Aparecida Stanke Buzetti, com o apoio técnico de Lucio de Oliveira e Souza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os animais são provenientes do Centro de Conservação da Fauna Silvestre-CESP de Ilha Solteira.</p>	
<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 31/03/2011.</p>  <p>Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA</p>	 <p>Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA</p>
<p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</p>	

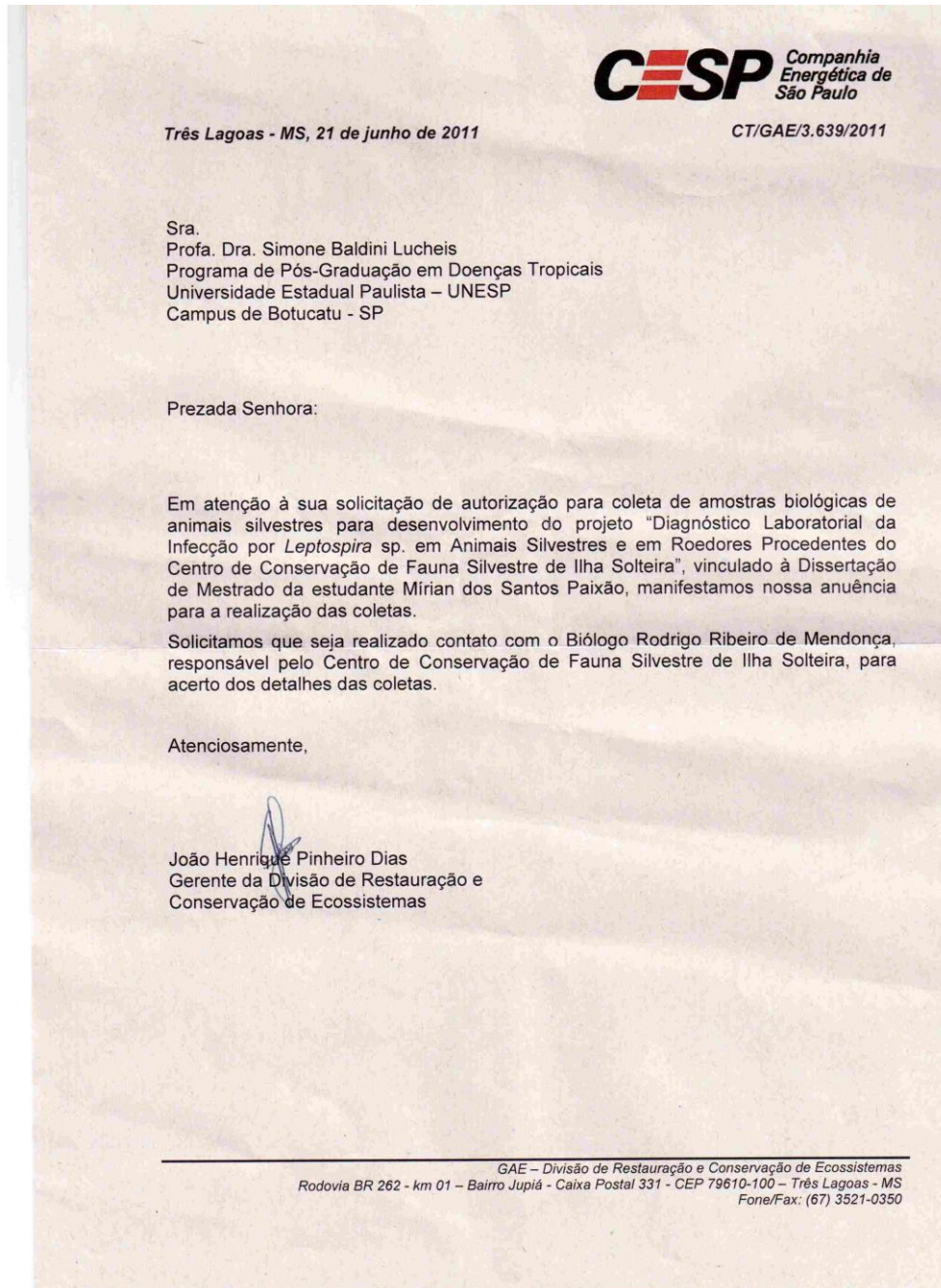
2. Autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para realização do estudo.

	Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO	
	Autorização para atividades com finalidade científica	
Número: 26841-1	Data da Emissão: 22/03/2011 17:42	
Dados do titular		
Nome: Simone Baldini Lucheis		CPF: 126.014.428-32
Título do Projeto: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR <i>Leptospira</i> spp. EM ANIMAIS SILVESTRES E EM ROEDORES PROCEDENTES DO CENTRO DE CONSERVAÇÃO DA FAUNA SILVESTRE DE ILHA SOLTEIRA-SP.		
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento		CNPJ: 46.384.400/0128-21

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Lucio de Oliveira e Souza	Coleta de materiais biológicos	782.959.809-63	4944156-8 Parana-PR	Brasileira
2	Mirian dos Santos Paixão	coleta e análise de materiais biológicos	371.045.228-75	34.005.230-2 SSP-SP	Brasileira

3. Autorização da Companhia Energética de São Paulo (CESP) para realização do estudo.



4. Protocolo de extração e purificação de DNA de *Leptospira spp.* de sangue dos animais estudados utilizando kit comercial Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®), segundo o manual do fabricante.

- Adicionou-se 20µL proteinase K (20mg/mL);
- Adicionou-se 300µL solução de lise 1;
- Misturou-se em vórtex 10 segundos;
- Incubou-se em temperatura ambiente por 10 minutos;
- Centrifugou-se por 30 segundos a 11000rpm;
- Transferiu-se a mistura para o filtro do kit Illustra no tubo de 2mL;
- Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
- Adicionou-se 500µL de lise 1;
- Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
- Adicionou-se 500µL de tampão de lavagem;
- Centrifugou-se a 11.000g por 3minutos;
- Descartou-se o líquido centrifugado;
- Descartou-se o tubo coletor de 2mL;
- Transferiu-se o filtro para um microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase;
- Adicionou-se 100µL do tampão de eluição a 70°C;
- Incubou-se a temperatura ambiente 1 minuto;
- Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
- Descartou-se o filtro;
- Armazenou-se os microtubos em congelador a -20°C.

5. Protocolo de extração e purificação de DNA de *Leptospira* spp. dos fragmentos de fígado e rim de *Rattus* spp. analisados utilizando kit comercial Illustra™ tissue & cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare®), segundo o manual do fabricante.

- Adicionou-se 50µL solução de lise 1;
- Adicionou-se 10µL proteinase K (20mg/mL);
- Misturou-se em vórtex 15 segundos;
- Incubou-se a 56°C por 1 hora;
- Centrifugou-se por 10 segundos a 2.000g;
- Adicionou-se 5µL RNase;
- Adicionou-se 500µL de lise 2;
- Misturou-se em vórtex 15 segundos;
- Incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos;
- Transferiu-se a mistura para o filtro do kit Illustra no tubo de 2mL;
- Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
- Descartou-se o líquido centrifugado;
- Adicionou-se 500µL de lise 2;
- Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
- Descartou-se o líquido centrifugado;
- Adicionou-se 500µL de tampão de lavagem;
- Centrifugou-se a 11.000g por 3 minutos;
- Descartou-se o tubo coletor de 2mL;
- Transferiu-se o filtro para um microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase;
- Adicionou-se 200µL do tampão de eluição a 70°C;
- Incubou-se a temperatura ambiente 1 minuto;

- Centrifugou-se a 11.000g por 1 minuto;
- Descartou-se o filtro;
- Armazenou-se os microtubos em geladeira *over night*.

APÊNDICES

9. APÊNDICE

1. Relação dos sorovares reagentes nos 41 animais em cativeiro avaliados do Centro De Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira – SP.

Animal	Sorovares Reagentes (sigla)	Título
Cateto 1	10	400
	15	100
Cateto 2	9	100
	11 ^a	400
	14 ^a	200
Cateto 3	NR	NR
Macaco Prego 1	14 A	100
Macaco Prego 2	NR	NR
Mão Pelada 1	NR	NR
Mão Pelada 2	2B	100
	5	200
	9	100
	14 ^a	100
	17	200
Mão Pelada 3	19	100
Mão Pelada 4	16B	100
Mão Pelada 5	8 ^a	400
Bugio 1	2 ^a	100
	11A	100
	19	100
Bugio 2	9	100
Bugio 3	1A	100
	3	100
	14A	200
	16A	100
Bugio 4	14A	200
Bugio 5	NR	NR
Bugio 6	PRA	200
Bugio 7	2A	100
	10	100
	16B	100
Bugio 8	NR	NR
Cachorro do Mato 1	8A	100
	11A	200
	2A	400

Cachorro do Mato 2	2B	100
	3	100
	8B	100
	5	100
	6B	100
	11B	100
	12	100
	13	100
	14A	100
Cachorro do Mato 3	18	100
	2B	100
Cachorro do mato Vinagre 1	6B	400
	NR	NR
Gato Mourisco 1	2B	200
	7	200
	15	100
Gato Mourisco 2	1 ^a	100
	2 ^a	1600
	2B	200
Gato Mourisco 3	19	100
	BOV	100
Gato Mourisco 4	2 ^a	100
	7	200
	9	200
Gato Mourisco 5	9	400
Queixada 1	4A	200
	6B	200
	8A	400
	16B	100
Queixada 2	1A	100
	9	100
	18	100
	19	100
	21	100
	MIN	100
	CTG	800
Queixada 3	1A	800
	2B	800
	3	100
	8A	100
	9	100
Queixada 4	1A	400
	19	200
	CTG	100
Queixada 5	NR	NR

Queixada 6	6B	100
	7	100
	9	100
	10	100
	11A	3200
Queixada 7	8A	400
	9	100
	19	400
Queixada 8	8A	200
	9	100
	16B	100
	17	200
Queixada 9	2B	200
	3	100
	MIN	100
Queixada 10	5	100
	13	100
	15	100
Queixada 11	8A	100
	11A	100
	19	100
Queixada 12	NR	NR
Raposinha 1	NR	NR
Lobo Guar 1	BOV	100

Legenda: 1A (Australis), 1B (Bratislava), 2A (Autumnalis), 2B (Butembo), 3 (Castellonis), 4A (Bataviae), 5(Canicola), 6B (Whitcombi), 7(Cynopteri), 8A(Djasiman), 8B(Sentot), 9(Grippotyphosa), 10(Hebdomadis), 11A(Copenhageni), 11B(Icterohaemorrhagiae), 12(Javanica), 13(Panama), 14A (Pomona), 15 (Pyrogenes), 16A (Hardjo), 16B (Wolffi), 17 (Shermani), 18 (Tarassovi), 19(Andamana), 21 (Patoc), PRA (Hardjoprajitno), MIN (Hardjo miniwajezak), CTG (HardjoCTG) e BOV (Hardjobovis).

2. Relação dos sorovares reagentes nos 59 animais de vida livre avaliados do Centro De Conservação da Fauna Silvestre (CCFS) de Ilha Solteira – SP.

Animal	Sorovares reagentes (sigla)	Título
Tatu 1	1A	100
	3	100
	8A	200
	17	200
	21	200
Tatu 2	7	100
	17	100
	18	200
	MIN	100
Tatu 3	5	100
	6B	100
Tatu 4	1B	100
	4A	100
	8B	100
Tatu 5	10	100
	15	100
	16A	100
Tatu 6	NR	NR
Tatu 7	1A	200
	5	100
	8B	200
	13	100
Tatu 8	1B	100
	2 ^a	100
	8B	100
	11B	100
Tatu 9	10	100
	11B	100
Tatu 10	3	100
	1B	100
	8A	200

	18	200
	19	200
	21	200
Tatu 11	1B	1600
	2B	3200
	21	200
	MIN	1600
	CTG	3200
	BOV	1600
Tatu 12	8B	200
	PRA	3200
Tatu 13	1B	3200
	8B	800
	9	400
	21	3200
Teiú 1	1A	800
	9	100
	14 A	100
	15	200
	PRA	100
	MIN	100
	CTG	400
	BOV	200
Teiú 2	1B	100
	2A	100
	4A	100
	5	100
	6B	3200
	7	100
	8A	200
	8B	800
	10	100
	11B	100
	12	100
	13	100
	14A	100
	15	200
	16A	200
	17	100
	18	100
	19	100
	21	200
	PRA	200
MIN	400	
CTG	100	
	1A	400

Teiú 3	1B	400
	2A	200
	4A	100
	5	100
	6B	100
	7	100
	8A	3200
	9	100
	10	200
	11A	200
	12	400
	13	100
	14A	400
	16A	400
	19	400
	21	400
	PRA	400
	MIN	200
	CTG	100
Teiú 4	1A	400
	1B	200
	2A	400
	2B	800
	3	800
	4A	200
	5	400
	6B	1600
	7	400
	9	200
	10	800
	11A	800
	11B	1600
	12	400
	13	400
	14A	400
	15	1600
	16A	1600
	16B	400
	17	1600
	18	200
	19	800
	21	1600
19	800	
MIN	200	
CTG	100	
BOV	200	

Teiú 5	1A	100
	2A	200
	2B	200
	9	400
	10	200
	12	100
	15	100
	16B	100
	18	100
	19	100
	MIN	100
	BOV	200
Teiú 6	2B	100
	3	100
	4A	200
	6B	200
	8A	100
	10	100
	12	100
	14A	200
	15	200
	16A	100
	16B	100
	17	100
Teiú 7	1A	100
	16A	100
Teiú 8	1A	200
	1B	100
	16A	100
Teiú 9	1A	100
	4A	100
	5	100
	6B	800
	8A	200
	9	100
	12	100
	14A	400
	15	200
	MIN	200
CTG	100	
Teiú 10	1A	100
	8B	100
	5	100
	17	100
	19	400
	PRA	400

	MIN	100
	CTG	200
	BOV	100
Teiú 11	NR	NR
Teiú 12	2B	100
	4A	200
	7	100
	16A	100
	17	100
	19	800
Teiú 13	13	200
	16A	400
	21	200
	MIN	400
Teiú 14	10	1600
	11A	100
	11B	100
	16	100
	15	100
	16A	400
	17	200
Cotia 1	1A	200
	1B	100
	18	200
Cotia 2	1B	100
	4A	1600
	5	100
	7	800
	8A	200
	9	100
	11A	200
	19	200
Cotia 3	8A	100
	11A	200
	17	100
	19	100
	21	100
	PRA	100
	MIN	200
	CTG	400
	BOV	200
Cotia 4	6B	400
	10	100
	11A	100
	13	100
	14A	100

	16A	100
	16B	100
	17	200
	18	200
	19	200
Cotia 5	1A	400
	1B	100
	2A	200
	2B	100
	3	100
	4A	100
	8A	100
	11A	200
	12	100
	17	100
	18	200
Cotia 6	8A	400
	9	400
	15	100
	17	800
	18	200
	19	100
	BOV	100
Cotia 7	18	100
	BOV	200
Cotia 8	1A	100
	3	400
	10	200
	11B	200
	14A	100
	17	200
	21	100
	PRA	100
Cotia 9	4A	100
	8A	100
	10	100
	11A	400
	11B	100
	12	100
	18	100
	PRA	100
	BOV	200
Cotia 10	1A	100
	1B	200
	9	100
	15	100

	17	100
	MIN	100
Cotia 11	1A	200
	2A	100
	2B	200
	7	100
	14A	100
	1B	400
Cotia 12	7	200
	8A	200
	14A	200
	18	400
	CTG	200
	1A	100
Cotia 13	4A	100
	7	100
	1B	100
Gambá 1	8A	100
	10	100
	14A	200
	19	100
	16 A	100
	Gambá 2	18
19		3200
4A		100
Gambá 3	5	100
	18	200
	21	400
	1A	200
Gambá 4	1B	100
	2B	100
	9	400
	11B	200
	19	100
	8B	100
Gambá 5	10	800
	14A	100
	16A	100
	2A	3200
Gambá 6	2B	100
	6B	100
Rato 1	18	100
	3	100
Rato 2	7	100
	17	400
	1A	100

Rato 3	3	100
	2A	200
	BOV	100
Rato 4	1B	100
	19	200
Rato 5	1A	100
Rato 6	2A	200
	2B	800
	8B	100
	7	400
	11B	100
	15	3200
	16A	200
	1A	100
Rato 7	1B	200
	3	400
	8B	800
	5	100
	6B	100
	9	200
	16B	400
	BOV	100
Rato 8	1A	800
	1B	100
	2A	200
	8B	400
	10	100
	11A	100
	11B	200
	19	100
Rato 9	18	200
Rato 10	8B	100
	12	100
	16B	3200
	18	100
	19	100
Rato 11	4A	200
	8B	400
	5	100
	8A	100
	9	200
	10	100
	11A	1600
	12	200
	13	100
16B	200	

	BOV	200
Rato 12	1B	100
	2A	100
	6B	100
	7	400
Rato 13	9	100
	15	100
	16A	100
	17	200
	MIN	3200