

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TÍTULOS DE ANTICORPOS CONTRA *Leptospira* spp E  
ANÁLISE BIOQUÍMICA NO SORO SANGÜÍNEO EM  
MACACO PREGO (*Cebus apella nigrinus*)**

**Tatiana Morosini de Andrade  
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Outubro – 2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TÍTULOS DE ANTICORPOS CONTRA *Leptospira* spp E  
ANÁLISE BIOQUÍMICA NO SORO SANGÜÍNEO EM  
MACACO PREGO (*Cebus apella nigrilus*)**

**Pós-graduando: Tatiana Morosini de Andrade**

**Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Girio**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária na área de Medicina Veterinária Preventiva.**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Outubro – 2007**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**TATIANA MOROSINI DE ANDRADE** – nascida em 03 de janeiro de 1972, no Rio de Janeiro, RJ, é Médica Veterinária, formada em dezembro de 1998, pela Fundação Pinhalense de Ensino – Espírito Santo do Pinhal – SP. Mestre em Microbiologia do curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Jaboticabal – UNESP. Atualmente é docente do Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) e ministra as disciplinas de “Doenças Infeciosas”, “Epidemiologia”, “Zoonoses e saúde pública” e “Defesa Sanitária Animal” e responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas e Microbiológicas do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” em São José do Rio Preto, SP. Trabalhou durante quatro anos no Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP, ministrando as disciplinas de “Doenças infecciosas” e “Zoonoses”. Durante agosto de 2001 a dezembro de 2002, ministrou as disciplinas de “Doenças infecto-contagiosas” nas Faculdades Integradas Octávio Bastos em São João da Boa Vista, SP.

## DEDICO

Aos meus PAIS: **Antonio Pedro** e **Dulce** e ao meu esposo **Ciro** que me proporcionaram condições de estudar e sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus saudosos avós Leonor e José pelo incentivo durante a vida e por me mostrarem a beleza dos animais e da natureza.

“Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele. A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem nosso respeito e nossa proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles.”

*Philip Ochoa*

### *AGRADECIMENTOS*

A todos vocês que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho,

Ao Prof. Dr. **Raul José Silva Girio** pela amizade, confiança, dedicação e apoio, possibilitando a conclusão do presente trabalho.

Ao amigo irmão Guilherme Guerra Neto pelos ensinamentos, amizade e lealdade acima de tudo.

Ao Prof. Amaral, Prof<sup>a</sup> Maria da Glória e Prof<sup>a</sup> Ângela pelo incentivo e apoio,

Aos amigos Jeanne Gimenes Amaral, Matheus Torres Marinheiro, Estevam G. Lux Hoppe, Ana Paula Nakage Canesin, e toda a equipe de Biólogos do Projeto Macaco Prego, pela contribuição em toda a parte experimental.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. David De Jong pelo convite em trabalhar num projeto belo e árduo de conservação ambiental.

Aos meus fiéis amigos e companheiros de docência Irlan Leite Abreu, Carla Daniela Dan de Nardo, Antonio Carlos Cunha Lacrete Júnior, João Morelli Júnior e Rodrigo Storti Pereira, muito obrigada por me passarem seus conhecimentos durante a confecção desta tese.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Alan Peres Ferraz de Melo pelo incentivo em toda esta etapa e pela confiança, compreensão e coleguismo.

Ao Diretor do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” Prof<sup>o</sup> Msc. Halim Atique Netto e a Prof<sup>a</sup> Msc. Tábata Sallum Calille Atique pelo apoio, incentivo e companheirismo durante o curso de Pós Graduação.

Ao amigo Fernando Gomes Buchala pelos quatro anos de ensinamentos, cumplicidade e coleguismo.

A querida Dr<sup>a</sup> Luciana Souza Jorge, por cuidar de minha saúde e me apoiar num momento muito delicado.

Ao Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) pela liberação para cumprimento dos créditos e confiança neste trabalho.

A todos docentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP Jaboticabal, em especial ao Técnico e amigo Nivaldo de Assis.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Masaio Mizuno Ishizuka pela honra da convivência e pelos ensinamentos para a contribuição da minha formação profissional.

Aos meus amigos Sérgio da Silva Fialho, Fabiano Antônio Cadioli, Ramon Malheiros, Sandra Bernal Nicolau, Fabio Dias Carvalho e Osmar Fernandes Júnior pelo incentivo e credibilidade profissional.

Aos amigos Paola Bozoglian Duarte, Emílio Bussi Neto, Nathalia Ângelo Avilla, Conrado Del Papa Jr., Ildeu Campos Jr. e Isildinha Campos pelas risadas e pelo apoio durante essa etapa.

Aos animais, principalmente aqueles que sofrem as conseqüências da irracionalidade dos seres humanos. Por serem o principal fundamento de amor para mim nessa existência.

À Deus e a todos os colegas presentes nesta etapa. Muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Área de Estudo e espécie estudada.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2. Captura dos indivíduos em vida livre .....</b>	<b>18</b>
<b>5.3. Idade dos animais capturados .....</b>	<b>20</b>
<b>5.4. Contenção química.....</b>	<b>20</b>
<b>5.5. Obtenção das amostras de sangue. ....</b>	<b>21</b>
<b>5.6. Transponders. ....</b>	<b>22</b>
<b>5.7. Preparo dos antígenos de <i>Leptospira</i> spp.....</b>	<b>23</b>
<b>5.8. Técnica de soroglutinação microscópica (SAM) .....</b>	<b>23</b>
<b>5.9. Análise da bioquímica sérica.....</b>	<b>24</b>
<b>5.9.1. Determinação da glicemia.....</b>	<b>24</b>
<b>5.9.2. Níveis de creatinina sérica. ....</b>	<b>24</b>
<b>5.9.3. Níveis de Uréia.....</b>	<b>24</b>
<b>5.9.4. Níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato de Aminotransferase.....</b>	<b>24</b>

5.9.5. Níveis de Albumina .....	25
5.9.6. Níveis de Fosfatase Alcalina .....	25
5.10. Análise da urina pelo método da PCR. ....	25
5.10.1. Amostra.....	25
5.10.2. Extração do DNA.....	25
5.10.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	26
5.10.4. Eletroforese .....	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS .....	42



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Páginas</b>
<p><b>1.</b> Número (N<sup>o</sup>) e porcentagem (%) de amostras de soro sangüíneo reagentes e não reagentes para leptospirose pela prova de SAM, de acordo com os primatas <i>C. apella nigritus</i> de vida livre estudadas. Jaboticabal-SP. 2007.....</p>	29
<p><b>2.</b> Resultados da prova de SAM para diagnóstico da leptospirose em <i>C. apella nigritus</i>, quanto ao número de animais reagentes e os sorovares encontrados. Jaboticabal-SP. 2007... ..</p>	30
<p><b>3.</b> Distribuição de soros sangüíneos de <i>C. apella nigritus</i> examinados pela prova de SAM, em relação ao sexo e idade. Jaboticabal-SP. 2007... ..</p>	32
<p><b>4.</b> Resultados da prova de SAM para o diagnóstico da Leptospirose de <i>Cebus apella nigritus</i> pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, para o diagnóstico de leptospirose segundo o sorovar reagente e o título* obtido e a freqüência de positividade. Jaboticabal-SP. 2007.....</p>	33
<p><b>5.</b> Distribuição de soros sangüíneos de <i>C. apella nigritus</i> pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de glicose. Jaboticabal-SP. 2007.....</p>	35
<p><b>6.</b> Distribuição de soros sangüíneos de <i>C. apella nigritus</i> pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de uréia. Jaboticabal-SP. 2007.....</p>	36
<p><b>7.</b> Distribuição de soros sangüíneos de <i>C. apella nigritus</i> pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Alanina Amino Transferase (ALT). Jaboticabal-SP. 2007. ....</p>	37

8. Distribuição de soros sangüíneos de *C. apella nigritus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de creatinina Jaboticabal-SP. 2007 .....38
9. Distribuição de soros sangüíneos de *C. apella nigritus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Fosfatase Alcalina. Jaboticabal-SP. 2007 .....38
10. Distribuição de soros sangüíneos de *C. apella nigritus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Aspartato de Amino Transferase (AST) Jaboticabal-SP. 2007 .....39
11. Distribuição de soros sangüíneos de *C. apella nigritus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de albumina. Jaboticabal-SP. 2007 .....40
12. Distribuição de idade e sexo de *C. apella nigritus* capturados na Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP. Jaboticabal-SP. 2007 .....40

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro</b>	<b>Páginas</b>
1. Relação das sorovares* de <i>Leptospira</i> empregadas como antígenos para a realização da técnica de soroaglutinação microscópica. Jaboticabal, 2007 .....	27

**TÍTULOS DE ANTICORPOS CONTRA *Leptospira* spp E ANÁLISE  
BIOQUÍMICA NO SORO SANGÜÍNEO EM MACACO PREGO (*Cebus apella  
nigritus*)**

**RESUMO** – A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, assumindo um forte significado social, econômico e cultural. A enfermidade acomete, praticamente, todos os animais domésticos, selvagens e o ser humano, bem como a maioria das espécies silvestres, entre os quais destacam-se os carnívoros, roedores, primatas e marsupiais, que podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação do microrganismo na natureza. O presente estudo foi realizado na Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, onde foi realizada a captura de *Cebus apella nigritus* de vida livre. Foram colhidos amostras de sangue para a realização da soroaglutinação microscópica (SAM), estudo da bioquímica sérica e teste da reação em cadeia da polimerase na urina dos animais. Foram capturados 55 animais e foi observado a soro-reação em 33 animais (60%). Os sorovares encontrados foram Shermani (11/55, 33,33%), Andamana (8/33, 24,24%), Pyrogenes (4/33, 12,12%), Grippotyphosa (2/33; 6,06%), Australis, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Hardjo, Hebdomadis, Pomona e Wolffi (1/33, 3,03%), respectivamente. Foi colhido oito amostras de urina dos animais (14,54%) e a análise das amostras de urina pela PCR foi negativa, não demonstrando excreção renal da *Leptospira* spp. A análise do soro nas provas de bioquímica sérica não foi elucidativa, pois alguns animais apresentaram alto título de anticorpos e níveis normais da bioquímica sérica.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Leptospira* spp., *Cebus apella*, vida livre, primatas, bioquímica sérica.

**ANTIBODY TITRES AGAINST *Leptospira* spp. AND BIOCHEMISTRY ANALYSIS ALTERATIONS IN BLOOD SERUM IN CAPUCHIN MONKEY (*Cebus apella nigritus*)**

**ABSTRACT** – Leptospirosis is a worldwide zoonosis, being social, economic and culture significance. The disease occurs in all domestic animals, wild animals and man, as well as, in majority wildlife species, mainly carnivores, rodents, not human primates and marsupials and they are able to become reservoirs, disseminating the bacteria in the nature. This study were in Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, where were collected serum of wildlife *Cebus paella nigritus* and processed by Microscopic Agglutination test (MAT), analysis of serum biochemistry and polymerase chain reaction (PCR) in urine of these animals. Were captured 55 primates (*C. apella*) and the results showed 33 animals (60%) reactive serum. The serovars: Shermani (11/55, 33,33%), Andamana (8/33. 24,24%), Pyrogenes (4/33, 12,12%), Grippotyphosa (2/33; 6,06%), Australis, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Hardjo, Hebdomadis, Pomona and Wolffi (1/33, 3,03%) respectively. Were collected 8 urine samples from primates (14,54%) and analysis from PCR were negative, not showed kidney excretion of *Leptospira* spp. The serum analyses were not elucidative, because some animals showed high titres antibody levels and normal levels of serum biochemistry.

**Keywords:** *Leptospira* spp., *Cebus apella nigritus*, wildlife, primates, blood biochemistry.

## 1. INTRODUÇÃO

Os incêndios e ataques nas florestas tropicais remanescentes da América, em decorrência da expansão da agricultura e pecuária, exploração de madeira, mineração, biopirataria, formação de usinas hidroelétricas, urbanização, entre outros, têm causado danos consideráveis a estes ecossistemas, habitats dos muitos animais brasileiros os quais hoje fazem parte do livro vermelho de animais ameaçados de extinção.

As doenças e seus agentes são parte dos ecossistemas e participam de um conjunto de inter-relações com os componentes bióticos e abióticos do meio, contribuindo com a dinâmica das populações envolvidas. Portanto, as doenças, assim como os predadores, disponibilidade de alimentos, abrigo, temperatura e outros mais, vão atuar sobre as populações mantendo um equilíbrio dinâmico e conseqüentemente a integridade do meio.

Neste contexto, onde algumas espécies têm populações muito reduzidas, isoladas e na maioria das vezes em contato direto com os animais domésticos e/ou seres humanos, as doenças infecciosas constituem uma ameaça real de extinção. A introdução de doenças exóticas a essas populações poderá acarretar efeitos devastadores.

Os animais selvagens são hospedeiros de um grande número de microrganismos, incluindo vírus, bactérias, parasitos e outros. A natureza da relação agente *versus* hospedeiro é bastante complexa e pode ser modulada por diversos fatores ligados ao ambiente, hospedeiro e agente.

Em primatas, os dados sobre leptospirose são escassos. Dos estudos com primatas de vida livre, a baixa incidência da leptospirose na natureza está associada ao comportamento e hábitos arborícolas dos primatas neotropicais. Fato este, que reduz a exposição a agentes contaminantes no solo e contato com os reservatórios.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete animais domésticos, silvestres e o homem, assumindo um forte significado social, econômico e cultural.

A primeira descrição da enfermidade foi feita por Larrey, em 1880, no Cairo, e posteriormente, por Landonzy, em 1883. Porém o primeiro a descrever o quadro clínico da doença no homem foi Weil, em 1886, na Alemanha (CORRÊA e CORRÊA, 1992), o qual caracterizou minuciosamente o quadro por febre, icterícia e hemorragia, podendo ocorrer ainda comprometimento renal e hepático. Posteriormente, por sugestão de Goldschmidt (DIESCH e ELLINGHAUSEN, 1975), tal enfermidade passou a ser denominada de doença de Weil (CALDAS et al., 1992).

A leptospira foi detectada em praticamente todos os países que realizam investigações epidemiológicas (PANDEY, 1994), e está mundialmente distribuída. Sua incidência tem forte associação com períodos de alta pluviosidade (ACHA e SZYFRES, 1986; PLANK e DEAN, 2000) e, sob condições favoráveis e na presença de hospedeiros adequados, as leptospirosas podem persistir por semanas ou meses (PLANK e DEAN, 2000) no ambiente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Em regiões secas, infecções acidentais ocorrem próximas a águas represadas com alta concentração de animais. Em regiões temperadas as infecções são sazonais, ocorrendo com maior frequência nos meses quentes e chuvosos (SZYFRES, 1976).

Na América Latina, na África e na Ásia, os casos de leptospirose humana atingem principalmente a população de baixo poder aquisitivo, e seu controle apóia-se em melhoria de saneamento básico, água, esgoto, colheita e disposição de lixo e melhores condições de moradia (FAINE, 1982; BRASIL, 1995).

A Organização Panamericana de Saúde (OPS) não coordena nenhum trabalho específico destinado ao controle da leptospirose devido ao fato da mesma ser considerada um problema regional. Cabe, portanto, a cada país determinar a importância local (ARGENTINA, 1998). Exatamente por essa característica focal da doença, é que a leptospirose foi excluída das doenças de notificação compulsória, pela Organização Panamericana de Saúde (OPS). As medidas de controle estão ligadas ao saneamento básico das grandes cidades, recomendando-se a notificação nas áreas de ocorrência (BRASIL, 1998).

O agente etiológico da leptospirose pertence à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Segundo a classificação taxonômica clássica, com base em sorogrupos e sorovares e na patogenicidade, as leptospirosas podem ser divididas em dois grandes grupos: patogênicas e saprófitas. As patogênicas, que podem infectar o homem e os animais são: *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. weillii* e *L. santarosai*; possuem mais de 200 sorovares agrupados em 23 sorogrupos. As espécies saprófitas de vida livre são: *L. biflexa*, *L. wolbachii* e *L. hollandia*; possuem 38 sorovares agrupados em seis sorogrupos, sendo encontradas principalmente em água doce, e há raros registros de infecção no homem e nos animais (FAINE, 1982; ACHA e SZYFRES; 1986; KMETY e DIKKEN, 1992). A variante sorológica ou sorovar é a unidade taxonômica do gênero. Grupos geneticamente distintos foram descritos com base na homologia do DNA, de forma que, enquanto os sorogrupos não são necessariamente relacionados, estirpes geneticamente homólogas guardam afinidade sorológica entre si (GENOVEZ, 1985; BARANTON, 1998).

A ocorrência da leptospirose é variável em diferentes áreas geográficas, no entanto, são freqüentes as situações de endemia, com variações sazonais revelando picos epidêmicos nos meses chuvosos, onde há associação entre as condições ambientais propícias e a alta densidade de animais infectados. Os casos de leptospirose estão usualmente associados à exposição à água contaminada com a urina ou tecidos provenientes de animais infectados (FAINE et al., 1999).

## 2.2. Caracterização da espécie de estudo

O macaco-prego, *Cebus apella nigritus* LINNAEUS, 1758 (Primata, Cebidae, Platyrrhinae) tem possivelmente a mais ampla distribuição geográfica entre todas as espécies de primatas neotropicais, sendo encontrado desde o leste da Cordilheira dos Andes até 27° Sul, ocorrendo desde o nível do mar até 2.700m na Colômbia (AURICCHIO, 1995; FRAGASZY et al., 1990; FREESE e OPPENHEIMER, 1981). A espécie vive comumente em uma grande variedade de tipos florestais, incluindo florestas chuvosas inundáveis ou não, florestas primárias, secundárias, caatinga, palmeirais, campos e mangues, conseqüentemente adaptando-se a uma alimentação onívora grandemente variada (AURICCHIO, 1995).

Utilizam-se de frutos (60%), sementes (7%), castanhas, flores, gomas, néctar, fungos, seiva, ovos, insetos, aracnídeos, pequenos vertebrados e até algumas espécies de ostras e caranguejos encontrados em regiões costeiras (manguezal). Gastam metade do dia caçando, o que os torna permanentemente ativos (AURICCHIO, 1995).

São muito curiosos, mexendo, removendo e quebrando coisas sendo talvez o primata mais inteligente das Américas (DI BITETTI, 1997).

O *C. apella* é uma espécie que vive em grupos geralmente grandes, com o número de indivíduos variando entre 6 a 30 aproximadamente (AURICCHIO, 1995; DI BITETTI, 1997; FREESE e OPPENHEIMER, 1981). O tamanho dos grupos varia tanto entre as espécies de *Cebus*, quanto dentro das espécies e entre grupos vizinhos na mesma região. (FRAGASZY et al., 1990). O *C. apella* é uma espécie poligâmica, com vários machos e fêmeas de todas as classes de idade presentes no bando (DI BITETTI, 1997).

A dentição dos primatas, com dentes de formas diferentes, incluindo nítida distinção entre dentes molariformes trituradores e dentes cortadores e perfuradores, possibilita uma dieta onívora, apesar de variações dentro de cada setor corresponderem a certas especializações (CAMPBELL, 1974; GREGORY, 1951).



### 2.3. Leptospirose em seres humanos e primatas não humanos

A leptospirose acomete, praticamente, todos os animais domésticos, selvagens e o ser humano, manifestando ou não os sintomas decorrentes da infecção. Inúmeros animais domésticos, bem como a maioria das espécies silvestres, entre os quais destacam-se os carnívoros, roedores, primatas e marsupiais, podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação do microrganismo na natureza.

Um estudo realizado por BAULU et al. (1987) em Barbados com macacos verde africano (*Cercopithecus aethiops sebaeus*) de vida livre, onde foram capturado 646 macacos durante um ano e mantido em gaiolas durante cinco anos. Durante esse período foi realizada a Soroaglutinação Microscópica (SAM) e os animais mostraram-se soro-reagentes para a *Leptospira* spp.

A penetração da *Leptospira* spp no hospedeiro ocorre através das mucosas ou de lesões de pele, seguindo-se da sua multiplicação no sangue e praticamente em todos os órgãos e tecidos. Nos animais que conseguem sobreviver à fase aguda da leptospirose, os microrganismos alcançam à luz dos túbulos contornados renais e passam a serem eliminados pela urina por períodos de tempo variados, caracterizando a modalidade de fonte de infecção denominada de portador convalescente (VASCONCELLOS, 1987). Outra fonte de infecção importante é o roedor, tanto silvestre quanto sinantrópico, que pode exercer o papel de reservatório de leptospiros e, além de manter o agente, o dissemina por meio da urina no ambiente (FAINE, 1982). A infecção é comum em roedores que atuam como reservatórios, apresentando o agente sem manifestar sinais clínicos (ACHA e SZYFRES, 1986).

No Brasil são escassos os relatos de levantamentos epidemiológicos a respeito de leptospirose ou de outras enfermidades infecciosas realizados em populações de animais selvagens, principalmente em animais de vida livre.

Em vários locais do mundo, investigações sobre a presença de leptospiros em animais selvagens foram demonstradas em roedores, edentatas, carnívoros, artiodáctilos e primatas, os quais podem atuar como fonte de infecção (REILLY et al., 1968; SHIVE et al., 1969; MICHNA e CAMPBELL, 1970; SÁ et al., 1999).

O melhor conhecimento da leptospirose na fauna selvagem é importante para o controle e profilaxia da enfermidade nas espécies domésticas e também no ser humano (SOSA et al., 1988).

Na fauna selvagem, os sinais relatados são semelhantes aos apresentados por animais domésticos, havendo descrição de baixo índice de fertilidade, nascimento de crias fracas, abortamentos e transtornos oculares (ALVARES et al., 1996).

Na ordem Rodentia, o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é apontado como importante reservatório do sorovar Icterohaemorrhagiae (SANTA ROSA et al., 1975), no rato d'água (*Nectomys squamipes*) tem sido demonstrado o sorovar Australis (CORDEIRO et al., 1981) e no preá (*Cavia aperea azarae*) o sorovar Icterohaemorrhagiae (PESTANA DE CASTRO et al., 1961; SILVA, 1976).

Levantamentos sorológicos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies sinantrópicas e silvestres das ordens Didelphimorfia e Rodentia, como potenciais disseminadores dos diferentes sorovares de *Leptospira* spp (McCAUGHEY e FAIRLEI, 1971; SANTA ROSA et al., 1975; AL SAAD et al., 1976; CIRONI et al., 1978; CORDEIRO et al., 1981; EVERARD et al., 1983; SHIMIZU, 1984; RIM et al., 1993; HARTSKEERL e TERPSTRA, 1996).

Entre os marsupiais da ordem Didelphimorfia, como gambás (*Didelphis marsupialis*) foram descritos títulos para os sorovares Ballum, Bataviae, Icterohaemorrhagiae, Szwajizam e Grippytyphosa (HATHAWAY et al., 1981; SANTA ROSA et al., 1975; CALDAS et al., 1992). DUHAMEL et al. (1998) descreveram o *Didelphis virginianus* como potencial reservatório para espiroquetas. Títulos para o sorovar Balcanica foram descritos em opossums (*Trichosurus vulpecula*) na Nova Zelândia (HATHAWAY et al., 1978; DAY et al., 1997; DAY et al., 1998).

Os guaxinins americanos (*Procyon lotor*), respectivos representantes da família Procyonidae, são considerados sinantrópicos na América do Norte e foram descritos como potenciais reservatórios de leptospiros. O sorovar Bratislava foi descrito nesta espécie por MIKAELLIAN et al. (1997) e os sorovares Grippytyphosa, Canicola e Icterohaemorrhagiae descritos por MITCHELL et al. (1999).

Na ordem primata os trabalhos a respeito da epidemiologia da leptospirose são escassos, principalmente em animais de vida livre. Dos estudos que se têm conhecimento com primatas de vida livre, a baixa incidência da leptospirose na natureza está associada com comportamento e hábitos arborícolas dos primatas neotropicais. Fato este, que reduz a exposição a agentes contaminantes no solo e contato com roedores (REID et al., 1993). Segundo esses mesmos autores, em seu relato de caso envolvendo infecção leptospírica na sua forma ictérica em sagüi imperador (*Saguinus labiatus*), foi sugerido que o animal provavelmente adquiriu a doença por ingestão de comida ou água contaminada por urina de roedores. Esse mesmo animal veio à óbito e o resultado da sorologia não detectou a presença de anticorpos aglutinantes, provavelmente pelo tempo insuficiente para o desenvolvimento de resposta de anticorpo detectável. O que se verifica em seres humanos é que o título de anticorpo no soro sangüíneo se desenvolve durante a segunda semana da doença e permanece no máximo de três a quatro semanas após a infecção.

Segundo FAINE et al. (1999) o diagnóstico da leptospirose em primatas é mais difícil do que em outras espécies animais por que os sinais clínicos e lesões são menos evidentes à resposta de anticorpos séricos. Os mesmos são detectados por um curto período de tempo, dificultando o diagnóstico sorológico.

CORRÊA et al. (2004) realizaram um levantamento sorológico para leptospirose em animais silvestres mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, no período de 1996 a 1999, em que das 302 amostras de soros sangüíneos analisadas, 59 (19,5%) foram positivas para a prova de soroaglutinação microscópica. Dos animais da Ordem Primata, a análise dos resultados da soroaglutinação microscópica demonstrou 25 animais positivos (22,5%), em um total de 111 animais examinados. Para a espécie *C. apella* (macaco prego) dos 47 animais estudados, 16 foram positivos (34%) e os sorovares encontrados foram: Copenhageni (68,70%), Grippytyphosa (12,50%) e Bratislava (6,20%).

Foi isolado *Leptospira* do sorogrupo Icterohaemorrhagiae em três casos fatais ocorridos em primatas de cativeiro da espécie macaco *Rhesus* (*Macaca sylvana*), no National Zoological Park, Washington D.C. (SHIVE et al., 1969).

Em 1987, pesquisadores relataram óbito em chimpanzés com infecção pelo sorovar Icterohaemorrhagiae e quadros com sinais clínicos em babuínos naturalmente infectados pelo sorovar Ballum, relatam ainda infecções experimentais pelo sorovar Icterohaemorrhagiae em calitriquídeos, cebídeos e cercopithecídeos (BRACK, 1987).

Em estudo realizado na Guiana Francesa pelo Instituto Pasteur com 109 primatas da espécie mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), PEROLAT et al. (1992) isolaram do sangue desses animais duas cepas de *Leptospira interrogans* em onze primatas os quais apresentaram doença aguda com icterícia e síndrome hemorrágica, sendo que dez vieram a óbito. Foi isolado o sorovar Copenhageni de dois dos animais doentes, bem como de um roedor sinantrópico capturado nas adjacências da área. Nas semanas seguintes, cinco fêmeas prenhes apresentaram anticorpos para o sorovar Icterohaemorrhagiae. A pesquisa sorológica de anticorpos para leptospiros foi realizada nos 93 animais remanescentes e os sorovares encontrados foram: Icterohaemorrhagiae, Ballum, Grippytyphosa, Sejroe e Panama. A titulação encontrada foi de 100 para 26% dos animais e de 50 para 12% para os mesmos sorogrupos.

Na cidade de Sochi, Rússia, foi realizado um estudo com 351 primatas por STASILEVICH et al. (2000) de seis diferentes espécies: *Cercopithecus aethiops*, *Macaca nemestrina*, *Macaca mulatta*, *Papio anubis*, *M. fascicularis* e *P. hamadryas*, e foi encontrado soro-reação em 48%, 30,4%, 14,7%, 10%, 28,3% e 26,3%, dos primatas respectivamente. Os sorovares reagentes foram: Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippytyphosa, Sejroe, Tarassovi, Hebdomadis e Canicola. Os anticorpos foram detectados em 67,1% das fêmeas e 32,9% dos machos. A frequência da soro-reação em animais de 3-10 anos de idade foi de 65,8% e em animais de 1 a 2 anos de idade foi de 10,20%.

Um relato de caso feito por REID et al. (1993) num parque zoológico nos Estados Unidos, um primata *Saguinus labiatus* de cativeiro, veio a óbito e foi realizada a necropsia e coletado soro do animal logo em seguida. À necropsia, todos os tecidos estavam icterícos e os pulmões estavam hemorrágicos e edemaciados. Foram coletados vários fragmentos de órgãos e submetidos à coloração de Warthin-Starry para avaliação das lesões nos órgãos. Foi revelado um número moderado de estruturas espirais

filamentosas, das quais foram morfologicamente compatíveis com as leptospiros. Porém não houve soro-reação neste animal.

Segundo SCARCELLI et al. (2003) a leptospirose em primatas está se tornando importante, pois, esses animais se tornam portadores renais do agente e colocam em risco os trabalhadores de zoológico e laboratoristas, Médicos Veterinários, outras espécies de primatas e animais do mesmo habitat.

O desejo de encontrar regiões intocáveis pelo desenvolvimento dos seres humanos permite aos mesmos uma exploração de áreas remotas e os colocam em contato com populações animais relativamente isoladas (WILSON, 2002).

A urbanização atua de maneira negativa o meio ambiente em diversas maneiras, como: construção de ferrovias, onde há fragmentação de habitats, estradas e pontes, que fragmentam barreiras físicas como montanhas, rios e desertos e podem servir como novas passagens para a migração da vida biológica. As barreiras físicas tradicionalmente servem de limite natural para a movimentação e, entretanto afetam a distribuição de certos vetores e reservatórios que podem carrear microrganismos ou parasitos (WILSON, 1991).

O termo medicina da conservação foi inicialmente apresentado por KOCH (1996) para descrever a ecologia geral no contexto saúde. Traz consigo disciplinas da saúde e ecologia juntas. A medicina da conservação e biologia da conservação dividem a ajuda comum em tentar a melhoria da saúde ecológica. A medicina da conservação estuda por um lado a múltipla interação entre patógenos e doenças e por outra as espécies e ecossistema.

Em resposta ao crescimento das implicações da degradação do meio ambiente, a medicina da conservação está emergindo como um campo interdisciplinar para endereçar o complexo de inter-relações entre o contexto saúde e ecologia. Como por exemplo: (a) mudanças na estrutura do habitat e uso da terra; (b) emergência e reemergência de agentes infecciosos, parasitas e contaminantes ambientais e (c) manutenção da biodiversidade e funções do ecossistema como sustentação da saúde da flora e fauna, incluindo os seres humanos (TABOR et al., 2001; ALEXANDER et al., 2002).

## 2.4 Bioquímica sérica

Segundo THRALL et al. (2007) a bioquímica sérica é uma ferramenta útil para avaliar o estado de saúde de mamíferos. Diversas variáveis como idade, sexo, estado de hidratação e condição nutricional influenciam os resultados da mesma. Os fatores ambientais como: fotoperíodo, temperatura e manejo, bem como, métodos de coleta de amostras, técnicas laboratoriais e equipamentos representam outras fontes de variação.

A mensuração da concentração sérica ou plasmática de creatinina é amplamente utilizada na avaliação da função renal em primatas. A avaliação da função renal de primatas segue os mesmos procedimentos descritos para mamíferos domésticos (THRALL et al., 2007).

A creatinina sérica é derivada principalmente do catabolismo da creatinina muscular. A fosfocreatinina é utilizada para armazenar energia na musculatura e o catabolismo da creatinina ocorre quando o animal está em repouso. A excreção da mesma ocorre via renal (BUSH, 1991).

Em primatas, o ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas; a concentração plasmática desse ácido pode ser um indicador pouco sensível de doença renal. Os primatas do Novo Mundo apresentam baixo teor de uricase no fígado, e concentração sérica de ácido úrico relativamente alta (THRALL et al., 2007).

As enzimas no soro ou plasma, como ALT e AST são comumente utilizadas como testes de detecção de doença hepática em primatas. Outros testes como, albumina, uréia, glicose são empregados para avaliar a função hepática de primatas. O aumento da atividade sérica de ALT é um fator inespecífico, porém sensível, de doença hepática em primatas. No tecido hepático destes, a atividade de ALT é alta, mas ela também é percebida no músculo cardíaco e rins. Acredita-se que a atividade sérica de ALT aumente apenas com lesão celular, enquanto o aumento de AST ocorra somente quando há morte celular (Di GIACOMO et al., 1975).

O AST está presente em maior concentração nos hepatócitos e nas células musculares (esqueléticas e cardíacas). Portanto o AST não é uma enzima hepato-específica. É uma enzima de extravasamento, pois, parte dela está livre no citoplasma de

hepatócitos. O aumento de sua atividade sérica pode ser causado por necrose e lesão subletal de hepatócitos e células musculares (KESSLER et al., 1983).

O aumento da atividade sérica de ALT é um indicador inespecífico, porém sensível, de doença hepática em primatas. No tecido hepático, a atividade de ALT é alta, mas também ela é percebida no músculo cardíaco e rins. Acredita-se que a atividade sérica de ALT aumente apenas com lesão celular, enquanto o aumento da atividade sérica de AST ocorra somente quando há morte celular (McCLURE et al., 1972).

A maior atividade do AST é no músculo cardíaco; no entanto, ela também se dá em fígado, músculo esquelético, rins e cérebro. Lesão cerebral é uma causa improvável de aumento da atividade sérica de AST, pois esta enzima, não atravessa a barreira hematoencefálica (KESSLER et al., 1983).

O fígado tem importante participação no metabolismo da glicose. A glicose absorvida pelo intestino delgado é transportada ao fígado pela circulação portal e, em seguida, chega aos hepatócitos, que a transformam em glicogênio, auxiliando no controle da glicose sérica. A concentração plasmática da glicose em jejum superior a 115 mg/dL indica anormalidade no metabolismo da glicose; glicemia superior a 140 mg/dL sugere diabetes mellitus. Em primatas, considera-se hipoglicemia quando a concentração sérica de glicose é inferior a 50mg/dL (HOWARD, 1982).

Entretanto, existem poucas informações sobre bioquímica sérica em diferentes primatas, particularmente em primatas do Novo Mundo (RIVIELLO e WIRZ, 2001).

### 3. JUSTIFICATIVAS

A presença de grupos de macacos prego (*C. apella nigrilus*) residentes na Mata de Santa Teresa, localizada no perímetro urbano de Ribeirão Preto, SP, estando aproximadamente a 16 km do marco zero do município, torna o local uma área de lazer para os munícipes. O contato direto e a alimentação fornecida aos animais pelos visitantes, agravam o risco de transmissão direta de zoonoses.

Considerando o ponto de vista de risco zoonótico e saúde pública, é de extrema importância que se conheça as zoonoses que poderão ser transmitidas dos primatas para os seres humanos e vice-versa.



#### 4. OBJETIVOS

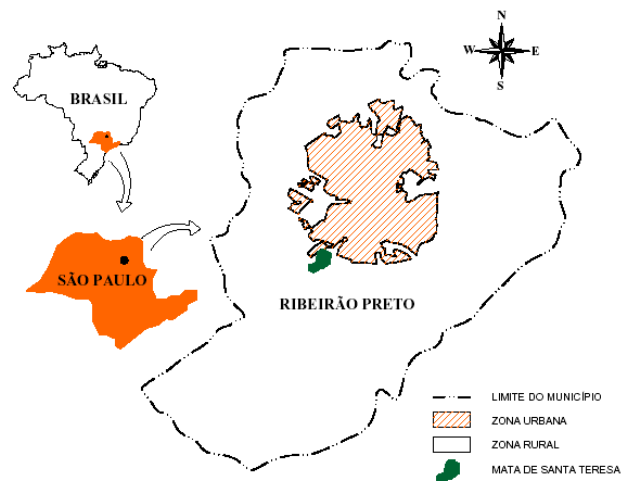
Devido à escassez de informações sobre a epidemiologia da leptospirose para os primatas neotropicais de vida livre, o presente estudo teve como objetivos:

1. Investigar a ocorrência de anticorpos para *Leptospira* na população de macacos prego (*Cebus apella nigrilus*) habitantes da Mata Santa Teresa, Ribeirão Preto – SP.
2. Identificar os sorovares de maior ocorrência nos indivíduos a serem estudados.
3. Pesquisar por meio da reação em cadeia da Polimerase (PCR) a presença da proteína da *Leptospira* spp na urina dos primatas capturados.
4. Avaliar as enzimas e proteínas séricas que indicam alterações renais e hepáticas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Área de estudo e espécie estudada

Foram utilizados 55 indivíduos de três bandos de macacos-prego (*Cebus apella nigrinus*) de vida livre. Estes bandos habitam a Mata Santa Teresa, Estação ecológica de Ribeirão Preto, uma reserva Estadual semi-urbana, na região sul de Ribeirão Preto, SP (21°14'S, 47°55'W; 570m acima do nível do mar) (SIEMERS, 2000), que consiste de uma mata mesófila semidecídua em regeneração, com 158,21ha. A altura do dossel varia entre 20 a 25m, a vegetação rasteira é densa, epífita e principalmente cipós são numerosos (SIEMERS, 2000). A Mata de Santa Teresa é rodeada por plantações de cana-de-açúcar e cercada por diversas propriedades de pequeno porte. Pessoas freqüentemente cruzam a mata, por uma estrada de terra, de carro, de carroça ou a pé. O clima é marcadamente sazonal, com uma estação fria seca e uma estação quente chuvosa. As espécies de primatas que habitam a mata são *Cebus apella* e *Callithrix penicillata*.



**Figura 1.** Localização geográfica da Mata Santa Teresa no Município de Ribeirão Preto, SP.



**Figura 2.** Foto aérea da Mata de Santa Teresa, mostrando seu isolamento por áreas de plantações, loteamentos e anel viário.  
Foto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, SP. Arquivo Projeto Macaco Prego – Mata Santa Teresa/USP.

## 5.2. Captura dos indivíduos em vida livre

A princípio foi utilizado o tipo *Tomahawk* de armadilha, confeccionada sob orientação de profissionais em manejo de animais silvestres, que já participaram de trabalhos semelhantes anteriormente, oferecendo total segurança aos animais e aos próprios pesquisadores. Durante um mês foram montadas armadilhas desarmadas e com frutas como iscas e colocadas em locais previamente escolhidos na mata. Esses lugares são pontos onde os macacos costumam permanecer durante certo período do dia.

No entanto, as armadilhas foram modificadas, pois os macacos estavam pegando os alimentos com as mãos sobre o disparador, sem entrar na mesma, introduzindo suas mãos através da tela. Essa reforma consistiu de ampliação do comprimento da armadilha, de modo que as frutas ficassem mais fundo no seu interior obrigando o macaco a passar adiante do disparador, e do uso de tela de malha dupla na região onde ficavam as frutas, para que os indivíduos não as retirassem.

Após essas reformas, as armadilhas foram novamente colocadas nos pontos específicos, por 6 meses, para a nova habituação. Posteriormente, consideramos que os animais estavam bem habituados, possibilitando assim arriscar uma primeira captura.

Os indivíduos foram capturados de fevereiro de 2003 a março de 2005, utilizando-se armadilhas contendo alimento como isca dispostas em círculos e cujos disparadores eram acionados manualmente por barbantes.

A captura ocorreu em menor tempo possível, e assim que as armadilhas eram acionadas, colocava-se um tecido escuro cobrindo-as, evitando transtornos no comportamento dos indivíduos. Os animais foram transferidos para uma gaiola de contenção para facilitar o manejo e a contenção química. Em seguida, foram coletadas as amostras de sangue e urina e posteriormente os animais foram colocados em gaiolas plásticas, cobertas por um tecido escuro e monitorados até o momento de sua recuperação e posterior soltura dos mesmos.





**Figura 3.** Armadilha do tipo *Tomahawk*, com frutas no seu interior.



**Figura 4.** Macaco Prego preso na armadilha.

### 5.3. Idade dos animais capturados

A faixa etária dos 55 indivíduos capturados foi apenas estimada devido à falta de tabelas morfológicas detalhadas para isso que contivessem, por exemplo, medidas craniais e dentais. Esta estimativa enquadra os indivíduos em categorias etárias convencionais, para as quais foi usada a classificação encontrada em ROBINSON (1998). As idades foram estimadas baseando-se na dentição, seja pelo desgaste, seja pela presença/ausência de alguns dentes, e na maturidade sexual evidenciada pelos testículos, no caso dos machos, e ainda em caracteres como a presença de topete desenvolvido, entre outras, algumas destas características guiadas pela tabela do autor acima citado, outras por dados encontrados em HERSHKOVITZ (1977). É importante lembrar que as categorias etárias englobam ambos sexo e idade, uma vez que caracteres sexuais secundários fazem parte da informação para classificação (ROBINSON, 1998).

### 5.4. Contenção química

Foram utilizados três diferentes protocolos anestésicos:

Protocolo 1 (P1): 10 mg/kg de cetamina e 2 mg/kg de xilazina;

Protocolo 2 (P2): 10 mg/kg de cetamina e 1 mg/kg de midazolam.

Protocolo 3 (P3): 7 mg/kg de tiletamina-zolazepan.

Após a administração de um dos fármacos em uma mesma seringa e por via intramuscular, foram monitorados a cada 10 minutos os seguintes parâmetros: pulso, saturação de O<sub>2</sub>, frequência respiratória, temperatura retal, relaxamento muscular, analgesia, reflexos palpebral, corneal, interdigital e genital.

Além dos parâmetros acima mencionados foram avaliados: período de latência, tempos de indução, sedação e recuperação.

O Protocolo 3 não foi utilizado pois, o mesmo promoveu uma sedação muito prolongada, dificultando a soltura dos animais após a realização dos procedimentos.

### 5.5. Obtenção das amostras de sangue

Para obtenção das amostras de sangue, os animais foram colocados em caixa de contenção para facilitar o manejo e a contenção farmacológica posterior. A colheita foi realizada por meio de punção da artéria femoral utilizando-se de tubos tipo Vacutainer<sup>®</sup> e agulhas estéreis. A veia de escolha para colheita, bem como a quantidade de sangue a ser colhido e tamanho da agulha variou com a idade e massa corporal do animal.

Após a colheita de sangue os tubos Vacutainer<sup>®</sup> foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas para a dessora. Após este período o sangue foi enviado ao Laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV – Unesp – *Campus* de Jaboticabal, SP.

Os soros obtidos foram transferidos para tubos de plástico da marca Eppendorf<sup>®</sup> de 0,5 mL, identificados e mantidos em freezer a temperatura de -20°C até o momento do uso.



**Figura 5.** Coleta de sangue da veia femural de um Macaco Prego.

### 5.6. *Transponders*

Todos os animais foram microchipados com *transponders* (*microchips*). Os *transponders* foram introduzidos atrás da orelha do animal, ficando sob a pele, na região do processo mastóide do osso temporal. Esse local foi escolhido por dificultar a retirada dos microchips pelo animal e em seguida foi realizada a leitura com o aparelho da marca Animalltag®.



**Figura 6.** Aplicação do *transponder* (microchip) na região do processo mastóide.



### **5.7 Preparo dos antígenos de *Leptospira* spp.**

Os antígenos dos sorotipos das leptospiros foram repicados semanalmente, em meio líquido de EMJH (Difco), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear. Foram utilizados apenas antígenos puros, isentos de contaminação, livres de autoaglutinação e, por estimativa de densidade contendo cerca de 100 a 200 leptospiros por campo microscópico.

### **5.8 Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM)**

A presença de anticorpos contra *Leptospira spp* foi realizada pela prova de soroaglutinação microscópica (SAM). Para tanto, utilizou-se uma coleção de antígenos constituída por vinte sorovares de leptospiros patogênicos e dois sorovares de leptospiros apatogênicos (Quadro 1).

Para realização dessa técnica, foram empregados antígenos representados por culturas de leptospiros vivos em meio de EMJH, com sete a dez dias de crescimento. A diluição foi feita com solução salina a 8%, a triagem dos soros realizada foi de 1:20. O critério adotado para considerar-se um soro como reagente foi de 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiros aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. Os soros reagentes na triagem inicial foram reexaminados até seis diluições seriadas de razão dois, realizado numa placa de microtitulação. O título do soro foi considerado como a recíproca da sua maior diluição quando apresentasse 50% de aglutinação. Quando um animal apresentou reação cruzada de dois ou mais sorovares, foi considerado o sorovar que apresentou maior título. A leitura das reações foi realizada em microscópico de campo escuro após a incubação da mistura soro-antígeno por 50 minutos em temperatura de 28°C. Sua execução seguiu a metodologia preconizada por POSTIC et al. (2000).

## **5.10 Análise da bioquímica sérica**

A análise das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT), Creatinina, Fosfatase Alcalina (FA), Aspartato de aminotransferase (AST) e outros parâmetros como glicemia, uréia e albumina, foram realizados no soro dos animais nos dias das coletas de materiais.

O procedimento foi realizado num espectrofotômetro da Marca Drake<sup>®</sup>, seguindo a metodologia preconizada pelos fabricantes dos kits para cada parâmetro a serem analisados.

### **5.10.1 Determinação da glicemia**

A glicemia foi determinada utilizando um colorímetro Drake, segundo o método de KING e GARNER (1947).

### **5.10.2 Níveis de creatinina sérica**

Os níveis de creatinina sérica foram determinados segundo a técnica de FERREIRA NETO et al. (1978).

### **5.10.3 Níveis de uréia**

Os níveis de uréia sérica foram determinados utilizando um colorímetro Drake, segundo o método de FERREIRA NETO et al. (1978).

### **5.10.4 Níveis de Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Amino Transferase (AST)**

Níveis de Alanina Amino Transferase e Aspartato Amino Transferase (ALT e AST) foram determinados pelo método de REITMAN e FRANKEL (1957), utilizando-se kits comerciais, calculando-se as unidades enzimáticas através de uma curva padrão.

### **5.10.5 Níveis de albumina**

Os níveis de albumina foram determinados utilizando um colorímetro Drake, segundo o método de PETERS et al. (1982).

### **5.10.6 Níveis de Fosfatase alcalina**

Os níveis de fosfatase alcalina foram determinados utilizando um colorímetro Drake segundo o método de GORNALL et al. (1977).

## **5.11 Análise da urina pelo método da PCR**

### **5.11.1 Amostra**

As amostras de urina foram coletadas e mantidas no freezer até o momento da análise.

### **5.11.2 Extração do DNA**

Segundo os protocolos realizados por MÉRIEN et al. (1992) e RICHTZENHAIN (2002) as amostras de urina foram centrifugadas a 13.000 xG por 10 minutos. Após a centrifugação foi adicionado 400µL de TE (10mM Tris – HCl, 1mM EDTA, com pH 8,0) ao sedimento e agitado por 10 segundos num vortex. A mistura foi centrifugada a 13.000 G por cinco minutos e, 200µL de TE foi adicionado ao sedimento. Para a extração com proteinase K, 300µL de lisozima (15µL de proteinase K 20mg/mL, 30µL de dodecil sulfato de sódio a 10%, 60µL TNE5X (50mM Tris, 500mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e 195µL de água ultra pura foi adicionado à suspensão. A mistura foi incubada por duas horas a 56 °C. A desproteinação foi feita adicionando fenol/saturado e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado e ressuspendido em 30µL de TE e mantido a -20°C. A

integridade do DNA foi visualizada pela eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µL de brometo de etídio.

### 5.11.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do DNA de *Leptospira* foi realizada segundo protocolo de MÉRIEN et al. (1992). Utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região 16S rRNA a partir da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola Lep 1: 5´ GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG 3´ e Lep 2: 3´ TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT 5´. Após o término das reações o volume final foi 50µL e os reagentes foram os seguintes: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 10 pmol de cada primer, 2.5 U *Taq* DNA polimerase e 50 ng da amostra de DNA extraído.

A mistura foi incubada num termociclador PTC-200. A amostra foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e então submetida a 29 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minutos a 63°C e 2 minutos a 72°C com extensão do ciclo por mais 10 minutos a 72°C. Foi utilizado *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e água como controles positivo e negativo respectivamente.

### 5.11.4 Análise do produto amplificado

A análise do produto amplificado (331 pb para 16S RNAr do gene de *Leptospira*) foi realizada em gel de agarose a 2% com tampão TBE 0,5 X (0,045 M Tris-borato e 1mM EDTA, pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio. Os tamanhos moleculares foram determinados baseando num marcador molecular de 100 pb. O software utilizado para a mensuração foi o Kodak® digital science ID image analysis.

**Quadro 1.** Relação dos sorovares\* de *Leptospira* empregadas como antígenos para a realização da técnica de soroaglutinação microscópica. Jaboticabal, 2007.

<b>Código</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Variante Sorológica</b>
1-A	Australis	Australis
1-B	Australis	Bratislava
2-A	Autumnalis	Autumnalis
2-B	Autumnalis	Butembo
2-C	Ballum	Castellonis
3	Bataviae	Bataviae
5	Canicola	Canicola
6	Celledoni	Whitcombi
7	Cynopteri	Cynopteri
8	Grippotyphosa	Grippotyphosa
9	Hebdomadis	Hebdomadis
10-A	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
10-B	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
11	Javanica	Javanica
12	Panama	Panama
13	Pomona	Pomona
14	Pyrogenes	Pyrogenes
15-A	Sejroe	Hardjo
15-B	Sejroe	Wolffi
16	Shermani	Shermani
17	Tarassovi	Tarassovi
18	Andamana	Andamana
20	Seramanga	Patoc
21	Mini	Mini
ST	Djasiman	Sentot

\* Gentilmente cedidas pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Silvio de Arruda Vasconcellos – FMVZ/ USP.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos a respeito da leptospirose em animais silvestres de vida livre suplantam os dados referentes aos animais mantidos em cativeiro (LUNA-ALVARES et al., 1996), uma vez que o conhecimento da dinâmica da leptospirose nos ambientes *in situ* é de importância singular para o estudo de surtos e posterior estabelecimento de medidas de vigilância. No entanto, poucos estudos evidenciam a presença da leptospirose acometendo populações cativas, relatando óbito em primatas (SHIVE et al., 1969; SÁ et al., 1999).

Embora a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp tenha sido descrita em primatas neotropicais em cativeiro, o presente estudo constitui um inédito levantamento sorológico em vida livre na Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP. Neste estudo foram analisados 55 soros de *Cebus apella nigrinus* pela prova de SAM para a pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos pela SAM nos soros sangüíneos de *C. apella* de vida livre pertencentes à mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP. Dos 55 soros, sangüíneos examinados, 33 (60,00%) foram reagentes contra três sorovares de leptospira patogênicas e nove sorovares de leptospira apatogênicas

**Tabela 1.** Número (N<sup>o</sup>) e porcentagem (%) de amostras de soro sanguíneo reagentes e não reagentes para leptospirose pela prova de SAM, na espécie de primatas *C. apella nigritus* de vida livre estudadas. Jaboticabal-SP. 2007.

ESPÉCIE	Reagentes		Não reagentes		TOTAL	
	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%
<i>Cebus apella</i>	33	60,00	22	40,00	55	100
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>-</b>	<b>22</b>	<b>-</b>	<b>55</b>	<b>-</b>

O número de animais soro-reagentes para leptospirose foi considerado alto (Tabela 1) já que a espécie estudada possui hábito arborícola, e contato com roedores e sua descida ao solo é pouco freqüente o que reduz a exposição a agentes contaminantes. Essa freqüência foi bem menor comparando o estudo realizado por BAULU et al. (1987) com os primatas (*Cercopithecus aethiops sebaeus*) de Barbados que possuem um hábito terrestre.

A dificuldade da coleta de urina dos *C. apella nigritus* em condições de vida livre e a ausência de energia elétrica para o uso de aparelhos de diagnóstico por imagem e geradores, que espantariam os animais pelo barulho, dentro da mata de Santa Teresa, impossibilitaram a coleta de urina dos animais por quaisquer métodos de diagnóstico por imagem.

Segundo BAULU et al. (1987) os roedores mostraram ser a fonte principal de infecções em Barbados, pois, os mesmos passam muito tempo no solo em grupos, explorando plantações, favorecendo a exposição à *Leptospira* spp.

A Tabela 2 demonstra os resultados sorológicos da SAM para leptospirose nos primatas *C. apella nigritus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, e os sorovares encontrados.

**Tabela 2.** Resultados da prova de SAM para diagnóstico da leptospirose em *Cebus apella nigritus*, quanto ao número de animais reagentes e os sorovares encontrados. Jaboticabal-SP. 2007.

Sorovares encontrados	Número de animais reagentes	%
Shermani	11	33,33%
Andamana	8	24,24%
Pyrogenes	4	12,12%
Grippotyphosa	2	6,06%
Australis	1	3,03%
Canicola	1	3,03%
Castelonis	1	3,03%
Copenhageni	1	3,03%
Hardjo	1	3,03%
Hebdomadis	1	3,03%
Pomona	1	3,03%
Wolffi	1	3,03%
<b>Sub Total reagentes</b>	<b>33</b>	<b>100,00</b>

Dos 33 soros de *C. apella* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, que foram reagentes, em 11 (33,33%) foi encontrado o sorovar Shermani, em 8 (24,24%) para o sorovar Andamana, em 4 (12,12%) para o sorovar Pyrogenes, em 2 (6,06%) para o sorovar Grippotyphosa e em 1 (3,03%) para os sorovares, Australis, Canicola, Castelonis, Copenhageni, Hardjo, Hebdomadis, Pomona e Wolffi.

A análise geral dos dados mostra que 33 animais (60,00%) foram reagentes à prova de SAM (Tabela 2) com títulos que variaram de 20 a 160.

Os títulos sorológicos variaram entre 20 e 160, sendo que 19 animais apresentaram títulos de aglutininas de 20, 6 animais apresentaram títulos de aglutininas de 40, 6 animais apresentaram títulos de aglutininas de 80 e 1 animal apresentou título de aglutininas de 160 (Tabela 3).

Nas amostras reagentes (Tabela 3) os sorovares encontrados foram: Shermani (11/33: 30,30%), Andamana (8/33: 27,27%), Pyrogenes (4/33: 12,12%), Grippotyphosa (2/33: 6,06%), Australis (1/33: 3,03%), Canicola (1/33: 3,03%), Castelonis (1/33: 3,03%),



Copenhageni (1/33: 3,03%), Hardjo (1/33: 3,03%), Hebdomadis (1/33: 3,03%), Pomona (1/33: 3,03%), Wolffi (1/33: 3,03%) (Tabela 2).

Em um estudo realizado por BAULU et al. (1987) na Ilha de Barbados mostrou que dos 646 primatas capturados, 184 (28,48%) foram soro-reatores. E os sorovares encontrados foram Ballum (61%), Icterohaemorrhagiae (16%), Autumnalis (15%), Pyrogenes (3%), Panama (2%), Pomona (1%), Tarassovi (1%) e Canicola (1%)

Em um estudo semelhante realizado por STASILEVICH et al. (2000) em Sochi, Rússia, das 351 amostras de soro sangüíneo de primatas de vida livre daquela região, 79 animais (22,50%) foram reagentes a prova de SAM.

CORRÊA et al. (2004) na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, coletaram 111 amostras foram de primatas (neotropicais e exóticos); e destas, 25 (22,5%) foram reagentes para SAM. Nestes animais, os sorovares encontrados com maior frequência foram: Copenhageni (13/25: 52%), Castellonis (5/25: 20%), Grippytyphosa (2/25: 8%) condizendo com os resultados encontrados no presente estudo.

Os trabalhos acima mencionados demonstraram que reação sorológica é um indicativo de que a *Leptospira* spp pode ser detectada em praticamente todos os ambientes nos quais as investigações sorológicas são realizadas, conforme demonstrado por PANDEY (1994).

Segundo BAULU et al. (1987) a associação de roedores selvagens com a sorologia contra leptospirose é bem conhecida. Entretanto, a captura sistemática desses animais em ambientes selvagens não é realizada. Assim como na Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, por ser uma região endêmica para Hantavirose e essa captura é realizada somente por Órgãos de Saúde Oficiais.

**Tabela 3.** Distribuição de soros sangüíneos de *Cebus apella nigrinus*, examinados pela prova de SAM, em relação ao sexo e idade. Jaboticabal – SP. 2007.

<b>Animais reagentes</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Total reagentes (%)</b>
Jovens	4	6	10 (18,18%)
Adultos	5	18	23 (41,82%)
<b>Total reagentes</b>	<b>9</b>	<b>24</b>	<b>33 (60,00%)</b>

O número de animais soro-reagentes (60,00%) em relação ao sexo foi de nove fêmeas (16,36%) e 24 machos (43,64%) num total de 55 animais capturados (100%).

Em relação à freqüência de soro-reação o número de primatas capturados foi maior de machos do que em fêmeas. BAULU et al. (1987) também observaram uma freqüência de soro-reação em Macacos Verde Africano (*C. aethiops sabaesus*) mais alta em machos do que em fêmeas (Tabela 3). Isso ocorre devido ao comportamento como, por exemplo, percorrer grandes distâncias para migrar para outros grupos para se reproduzirem, assim como ocorre a diferença entre faixas etárias, os adultos são mais susceptíveis do que os jovens.

O número de animais soro-reagentes em relação à idade foi de 10 jovens (18,18%) e 23 machos (41,82%) num total de 33 animais reagentes (60,00%).

Essas espécies que convivem no mesmo *habitat*, devido à ação antrópica, sofrem um risco de contrair outras enfermidades trazidas pelos seres humanos.

Um episódio ocorrido no Parque Nacional Banff no Canadá em 1994, a população de cervo da cauda preta (*Odocoileus hemionus*) apresentaram altos títulos de anticorpos para *Herpesvirus* bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina (BVD), língua azul, Leptospirose e vírus do sincício respiratório devido ao contato com bovinos domésticos de propriedades circunvizinhas do parque (WILSON, 2002).

Diante de alguns episódios da transmissão de enfermidades entre seres humanos e animais, temos um relato de ALEXANDER et al. (2002) num parque da África do Sul onde houve a transmissão de tuberculose para grupos de suricatas (*Suricata suricatta*)

e mangustos (*Mungos mungo*) que vieram à óbito por um meio de transmissão ainda não esclarecido.

**Tabela 4.** Resultados da prova de SAM para o diagnóstico da leptospirose de *Cebus apella nigritus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, pela prova de SAM para o diagnóstico de leptospirose segundo o sorovar reagente e o título\* obtido e a frequência de positividade. Jaboticabal-SP. 2007.

SOROVAR	Título				TOTAL	1
	20	40	80	160		
Shermani	8	1	2	-	11	33,33
Andamana	3	1	3	1	8	24,24
Pyrogenes	4	-	-	-	4	12,12
Grippotyphosa	2	-	-	-	2	6,06
Australis	1	-	-	-	1	3,03
Canicola	-	1	-	-	1	3,03
Castelonis	-	-	1	-	1	3,03
Copenhageni	-	1	-	-	1	3,03
Hardjo	1	-	-	-	1	3,03
Hebdomadis	1	-	-	-	1	3,03
Pomona	-	1	-	-	1	3,03
Wolffi	-	1	-	-	1	3,03
TOTAL	20	6	6	1	33	100,00

\* = Recíproca da maior diluição do soro com 50% de aglutinação.

1= Frequência entre o total de animais reagentes.

No Parque Ecológico de Ribeirão Preto, Mata de Santa Teresa, nunca foi realizado uma captura sistemática da fauna co-habitante com os Macacos Prego. Porém durante a captura foi observado a presença de sagüis do tufo preto (*Callithrix penicilatta*), Cotias (*Cavia aperea*), Paca (*Agouti paca*), Jibóia (*Boa constrictor*) e outros roedores

selvagens. Portanto, não se sabe o papel desses animais como reservatório de *Leptospira* spp.

O *grooming* (catação) é um hábito freqüente entre os primatas, isso pode favorecer também a transmissão da leptospirose entre os indivíduos, pois os mesmos vivem em bandos.

O Centro de Primatologia de Barbados capturou mais de 3.000 animais desde 1979 e de acordo com as pesquisas realizadas nesse período os primatas debelam a infecção aos poucos, corroborando com os achados de FAINE (1982).

BAULU et al (1987) ainda relataram que a leptospirose é um achado incomum, porém a enfermidade mostrou ser transmissível entre os animais.

Segundo FAINE (1999) o diagnóstico da leptospirose em primatas é mais difícil do que em outras espécies. Isso ocorre, pois os sinais clínicos e lesões são menos evidentes e a resposta de anticorpos só é detectada por curtos períodos de tempo.

A bioquímica sérica é uma ferramenta de extrema importância para auxiliar o diagnóstico de enfermidades. Os resultados demonstraram que somente alguns animais tiveram os parâmetros alterados em alguns exames.

Segundo RIVIELLO e WIRZ (2001) num estudo realizado na Itália em 36 Macacos Prego (*Cebus apella*) houve diferença significativa entre machos e fêmeas para os parâmetros de AST, creatinina e glicose.

Os níveis de glicose (Tabela 5) estavam aumentados, evidenciando uma ação antrópica dentro da Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, provavelmente à alimentação imprópria levada pelos visitantes principalmente aos finais de semana. Vale ressaltar que, foi comum durante o período do experimento, a observação de pessoas oferecendo guloseimas e bebidas aos bandos de primatas ali residentes. A constante presença de restos alimentares funcionou como atrativo para os indivíduos e outras espécies que conviviam no mesmo *habitat*.

Foram coletadas oito amostras de urina de oito animais (14,54%; 8/55) e em nenhum indivíduo houve a detecção da proteína da *Leptospira* spp pela técnica de PCR.

A PCR é uma importante ferramenta para o diagnóstico da leptospirose em primatas não humanos. Um estudo feito por SCARCELLI et al. (2003) mostrou que a

técnica possui uma sensibilidade e especificidade muito alta, principalmente por que os sinais e lesões são menos evidentes e a presença de anticorpos é detectado por curtos períodos de tempo (FAINE et al., 1999). Amostras de urina e fragmentos de tecidos autolisados foram colhidos de um macaco prego (*C. apella*) de cativeiro veio à óbito e foi encontrado morto após 24 horas e então, permitindo a detecção de *Leptospira* em amostras autolisadas e congeladas ou mal conservadas que prejudicam o isolamento e a inoculação experimental. Detectando-se pela PCR um fragmento de DNA de 300 pb correspondente ao gênero *Leptospira*.

Em nosso estudo, não foi possível detectar o fragmento de DNA da *Leptospira* pela PCR da urina dos primatas capturados, podendo concluir que esses animais não foram portadores renais, naquele momento.

**Tabela 5.** Distribuição de soros sanguíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de glicose Jaboticabal-SP. 2007.

<b>Glicose</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Acima de 35	55	100
1,5 a 35	-	-
Abaixo de 1,5	-	-
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

Valores de Referência (ISIS, 2002)

Glicemia: 1,5 a 35 mg/dl

Média: 142 mg/dl

O valor médio de glicose sérica nos primatas capturados foi de 142 mg/dl. Sugerindo um quadro de diabetes mellitus segundo relatos de HOWARD (1982), cujos níveis séricos encontram-se acima de 140mg/dl.

Com relação aos níveis de uréia, em sete (12,73%) dos indivíduos capturados o nível estava aumentado (Tabela 6). A uréia é um parâmetro importante para o monitoramento de doenças renais, dietas hiperproteicas e diabetes mellitus.

**Tabela 6.** Distribuição de soros sanguíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Uréia Jaboticabal-SP. 2007.

Uréia	Nº	%
Acima de 59	7	12,73
9-59	48	87,27
Abaixo de 9	-	-
Total	55	100

Valores de Referência (ISIS, 2002)

Uréia: 9 a 59 mg/dl

Média: 41,02 mg/dl

A média de uréia sérica foi de 41,02 mg/dl. Os níveis séricos de uréia conjuntamente com a creatinina sugerem uma doença renal.

A enzima Alanina Amino Transferase (ALT) foi analisada durante o experimento. Dos 55 soros analisados, todos os indivíduos (100%) estavam dentro dos parâmetros de normalidade.

Segundo KIM et al. (2004) a utilização de cloridrato de cetamina como protocolo anestésico em Macacos verde africano (*Cercopithecus aethiops*) aumenta a atividade sérica do ALT e reduzem as concentrações séricas de glicose.

Os altos níveis de ALT no soro indicam lesão hepática de natureza inflamatória, tóxica e degenerativa. Sendo que, a sua elevação está na dependência do grau e duração da lesão, obtendo-se concentrações maiores em casos agudos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Distribuição de soros sangüíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Alanina Amino Transferase (ALT) Jaboticabal-SP. 2007.

<b>ALT</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Acima de 235	-	-
11-235	55	100
Abaixo de 11	-	-
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

Valores de Referência (ISIS, 2002)

ALT: 11-235 U/l

Média: 57,33 U/l

As enzimas no soro ou no plasma, como ALT e AST, bem como as enzimas que aumentam a atividade quando há colestase ou indução por droga FERREIRA NETO et al., 1978).

Um outro parâmetro avaliado foi a creatinina sérica, seis animais (10,90%) estavam com os níveis aumentados e permite avaliar a função renal, principalmente da filtração glomerular (Tabela 8).

**Tabela 8.** Distribuição de soros sangüíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de creatinina Jaboticabal-SP. 2007.

<b>Creatinina</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Acima de 0,23	6	10,90
0,036-0,23	49	89,10
Abaixo de 0,23	-	-
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

Valores de Referência (ISIS, 2002)

Creatinina: 0,036-0,23 U/l

Média: 0,95 U/l

A fosfatase alcalina foi outra enzima dosada e três animais (5,45%) estavam com os níveis alterados. Essa enzima é produzida em muitos tecidos dos organismos como ossos, fígado, intestinos e placenta e é excretada pela bile (ALENCAR FILHO et al., 1994) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Distribuição de soros sangüíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Fosfatase Alcalina, Jaboticabal-SP. 2007.

<b>Fosfatase Alcalina</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Acima de 358	3	5,45
0-358	52	94,55
Abaixo de 0	-	-
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

Valores de Referência (ISIS, 2002)

Fosfatase Alcalina: 0 a 358 U/l

Média: 140,69 U/l



O AST dosado no soro dos animais capturados é fisiologicamente encontrado em alta concentração no coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. Em 48 (87,27%) dos animais os níveis estavam normais e em sete (12,73%) os níveis estavam abaixo dos valores de referência (Tabela 10).

**Tabela 10.** Distribuição de soros sangüíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de Aspartato de Amino Transferase (AST), Jaboticabal-SP. 2007.

AST	Nº	%
Acima de 163	-	-
20 a 163	48	87,27
Abaixo de 20	7	12,73
Total	55	100

Valores de Referência (ISIS, 2002)

Aspartato de Amino Transferase: 20 a 163 U/l

Média: 47,07 U/l

Os níveis de albumina foram avaliados em 55 amostras de soro sangüíneo de *C. apella*. As 55 amostras (100%) estavam dentro dos parâmetros de normalidade (Tabela 10).

Segundo THRALL (2007) o uso de cloridrato de cetamina para contenção química em primatas não interfere nos valores séricos de AST.

A albumina é uma proteína do soro e sua síntese ocorre quase que totalmente pelo fígado. Todos os indivíduos capturados (100%) estavam com os níveis dentro dos parâmetros de normalidade (Tabela 11).

**Tabela 11.** Distribuição de soros sangüíneos de *Cebus apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, examinados para os níveis de albumina, Jaboticabal-SP. 2007.

<b>Albumina</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Acima de 76	-	-
15 a 76		-
Abaixo de 15	55	100
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100</b>

Valores de Referência (ISIS, 2002)

Albumina: 15 a 76 g/l

Média: 3,13 g/l

A média aritmética dos níveis de albumina encontrada nos macacos prego, foram considerados abaixo do limite normal para a espécie. Segundo relatos de BENNETT et al., (1992) e KIM et al. (2004) ocorre a diminuição significativa na concentração sérica de proteína total e de albumina quando se utiliza cloridrato de cetamina como anestésico para contenção durante a coleta desse sangue. Essa diminuição se deve ao aumento de volume plasmático ou à perda de proteína no compartimento vascular.

**Tabela 12.** Distribuição de idade e sexo de *Cebus apella nigrinus* capturados na Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP, Jaboticabal-SP. 2007.

	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Total capturados</b>
Jovens	9	22	31
Adultos	16	8	24
<b>Total capturados</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>55</b>

Em relação à idade dos animais capturados, dos 55 animais, 31 (54,36%) foram jovens e 24 (43,64%) adultos. Em relação ao sexo, foram capturados 25 fêmeas (45,45%) e 30 machos (54,55%), num total de 55 primatas.

## 8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo pode ser inferido o que se segue.

1. Ocorreu a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp em primatas de vida livre da Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP.
2. Os sorovares de maior frequência foram o Shermani e Andamana nos *C. apella nigrinus* pertencentes à Mata de Santa Teresa, Ribeirão Preto, SP.
3. Não foi possível detectar a presença da proteína da *Leptospira* spp na urina dos primatas capturados quando analisado pela PCR.
4. A bioquímica sérica dos animais capturados (glicose, uréia, ALT, creatinina, fosfatase alcalina, AST e albumina) não foi elucidativa, pois, quase todos os parâmetros estavam normais, não indicando nenhuma alteração renal ou hepática. Exceto a glicemia, que de todos os indivíduos estavam aumentados sugerindo que, os animais eram alimentados de forma errônea pelos visitantes da mata.

## 9. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Organización Panamericana de la Salud, p.112-20, 1986.

AL SAAD, M.; POST, G. Rodent leptospirosis in Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**. Kansas, v.12, p.315-21, 1976.

ALENCAR FILHO, R.A.; SERVAER, C.B. **Guia para diagnóstico em Medicina Veterinária**. São Paulo: Nobel, 1994, p. 143-160.

ALEXANDER, K.A.; PLEYDELL, E.; WILLIAMS, M.C.; LANE, E.P.; NYANGE, J.F.C.; MICHEL, A.L. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. **Emerging infectious diseases**. Atlanta, v.8, n.6, 2002.

ALVARES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; CAMARGO, C.R.A.; MORAIS, Z.A. Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para leptospirose em cinco centros de criação do estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.63, n.2, p.11-8, 1996.

ARGENTINA. Instituto Panamericano De Protección de Alimentos y Zoonosis. INPPAZ. **Análisis del proyecto de presupuesto por programas del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis para 1998-1999 y 2000-2001**. Disponível em: <[www.inppaz.org.ar/menupal/infinstr/rimsa10/dogres.htm](http://www.inppaz.org.ar/menupal/infinstr/rimsa10/dogres.htm)>. Acesso em: 06 set 2006.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995, 168p.

BARANTON, G. **DNA relatedness of serovars**. Prepublication list. Unité de Bacteriologie Moléculaire et Médicale, Institut Pasteur. *Leptospira Molecular Biology*. 1998. Disponível em: <[www.pasteur.fr/bio/leptospira](http://www.pasteur.fr/bio/leptospira)>. Acesso em 15 novembro de 2005.

BAULU, J., EVERARD, C.O., EVERARD, J.D. Leptospire in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops Sabaeus*) on Barbados. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n.1, p. 60-66, 1987.

BENNETT, J.S.; GOSSETT, K.A.; Mc CARTHY, M.P. Effects of ketamine hydrochloride on serum biochemical and hematologic variables in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.2, n.1, p. 15-18, 1992.

BRACK, M. Agents transmissible from simians to man. New York: Springer-Verlag. (Book Reviews: Primate Eye, n. 36, p. 23-25); **American Journal of Primatology**, v. 17, p. 251-252, 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais. Programa nacional de leptospirose. **Manual de leptospirose**. 2. ed. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Seleção de doenças de notificação compulsória**: critérios e recomendações para as três esferas de governo. Documento preliminar. Disponível em: <[www.fns.gov.br/notifcom.htm](http://www.fns.gov.br/notifcom.htm)> Acesso em: 30 jun 1998.

BUSH, B.M. **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians**. London: Blackwell Scientific Publications, p. 200-209, 1991.

CALDAS, E.M.; FEHRINGER, W.T.; SAMPAIO, M.B. Aglutininas anti-leptospiras em *Rattus norvegicus* e *Didelphis marsupialis*, em Salvador-Bahia. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária-Universidade da Bahia**, Salvador, v.15. n.1, p.43-50, 1992.

CAMPBELL, B. **Human Evolution: An Introduction to man's Adaptations**. Aldine Publishing Co, Chicago, 1974, 453p.

CIRONE, S.M.; RIEMANN, H.P.; RUPANER, R.; BEHIMER, D.E.; FRANTI, C.E. Evaluation of the hemagglutination test for epidemiologic studies of leptospiral antibodies in wild mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.14, n.2, p.193-202, 1978.

CORDEIRO, F.; SULZER, C.R.; RAMOS, A.A. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in Southeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.19-29, 1981.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 219-232.

CORRÊA, S.H.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A.A.; DIAS, R.A.; GUIMARÃES, M.A.B.V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, n.3, p.189-193, 2004.

DAY, T.D.; WASS, J.R.; O'CONNOR, C.E.; CAREY, P.W.; MATTHEUS, L.R.; PEARSON, A.J. Leptospirosis in bushtail possums: is *Leptospira interrogans* serovar Balcanica environmentally transmitted? **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.33, n.2, p.254-60, 1997.

DAY, T.D.; O'CONNOR, C.E.; WASS, J.R.; PEARSON, A.J.; MATTHEUS, L.R. Transmission of *Leptospira interrogans* serovar Balcanica infection among socially housed bushtail opossums in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.34, n.3, p. 576-81, 1998.

DI BITETTI, M. S. Evidence for an Important Social Role of Allogrooming in a Platyrrhine Primate. **Animal Behavior**, v. 54, p.199-211, 1997.

DIESCH, S.L.; ELLINGHAUSEN, H.C. Leptospirosis. In: HERBERT, W.T. et al. (Ed) **Diseases transmitted from animals to man**. 6. ed. New York: C.C. Thomas, p. 56-60, 1975.

DiGIACOMO, R.F.; McDONASH, B.F.; GIBBS, C.J. The progression and evaluation of hematologic and serum biochemical values in the chimpanzee. **Journal of Medical Primatology**, v.4, p.188-203, 1975.

DUHAMEL, G.E.; GANLEY, L.; BARR, B.C.; WHIPPLE, J.P.; MATHIESEN, M.R.; NORDHAUSEN, R.W.; WALKER, R.L.; BARGAR, T.W.; VAN KRUININGEN, H.J. Intestinal spirochetosis of north american opossums (*Didelphis virginianus*): a potencial biologic vetor for pathogenic spirochete. **Proceedings AAZV and AAWV – Joint Conference**, p.83-88, 1998.

EVERARD, C.O.R.; FRASER-CHANPONG, G.M.; BHAGWANDIN, L.J.; RACE, M.W.; JAMES, A.C. Leptospirosis in wildlife from Trinidad and Grenada **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.19, n.3, p.192-9, 1983.

FAINE, S. **Guidelines for Control of Leptospirosis**. Geneva: W.H.O., 1982. 171p.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne: Medsci, 2 ed. 1999, p. 121.

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. **Patologia Clínica Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, 1978. 279p.

FRAGASZY, D. M., VISALBERGHI, E. e ROBINSON, J. G. Variability and Adaptability in the Genus *Cebus*. **Folia Primatologica**, v. 54, p.114-118, 1990.

FREESE, C.H., OPPENHEIMER, J. R. The Capuchin Monkey, Genus *Cebus*. In: Coimbra-Filho, J. I., Mittermeier, R. A. (eds.). **Ecology and Behavior of Neotropical Primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 331-391p, 1981.

GENOVEZ, M.E. Avaliação da eficiência de estirpes de *Leptospira biflexa* no diagnóstico sorológico de triagem de leptospirose animal. 1985. 59f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1985.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of biological chemistry**, v.1977, p.751-766, 1949.

GREGORY, W.K. **Evolution Emerging: A Survey of Changing Patterns from Primeval Life to Man**. New York,: William King Gregory Publisher, 1951, 150p.

HARTSKEERL, R.A.; TERPSTRA, W.J. Leptospirosis in wild animals. **The Veterinary Quarterly**, v.18, supplement.3, p.149-50, 1996.

HATHAWAY, S.C.; MARSHALL, R.B.; BLACKMORE, D.K. The serologic and cultural prevalence of *Leptospira interrogans* serovar balcanica in opossums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.14, p.345-50, 1978.



HATHAWAY, S.C.; BLACKMORE, D.K.; MARSHALL, R.B. Leptospirosis in free-living species in New Zealand **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.7, n.4, p.489-96, 1981.

HERSHKOVITZ, P. **Living New World Monkeys (Platyrrhini): with an Introduction to Primates**, University of Chicago Press, Chicago, v.1, 1977, 1210p.

HOWARD, C.F. Non-human primates as models for the study of human diabetes mellitus. **Diabetes**, v.31, p. 37-42, 1982.

ISIS. International Species Information System. **Reference Ranges for Physiological Values in Wildlife**. Teare, J.A. 2002. CD ROM.

KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic press, 1989, 698p.

KESSLER, M.J.; RAWLINS, R.G.; LONDON, W.T. The hemogram, serum biochemistry, and electrolyte profile of aged rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v.12, p.184-191, 1983.

KIM, C. Y.; HYUN, S.L.; SU-CHEOL, H.; JEONG-DOO, H.; MYUNG-SANG, K.; CHANG-SU, H.; SANG-SEOP, H. Hematological and serum biochemical values in cynomolgus monkeys anesthetized with ketamine hydrochloride. **Journal of Medical Primatology**, v.34, n.2, p. 96-100, 2004.

KING, E.J.; GARNER, R.J. Colorimetric determination of glucose. **Journal of Chemistry Pathology**, v.1, p. 30-33, 1947.

KOCH, M. Wildlife, people and development. **Tropical Animal Health Production**, v.28, p. 68-80, 1996.

KMETY, E.; DIKKEN, H. Classification of species of the *Leptospira interrogans* and history of its serovars. In: **International Leptospirosis**. Leptospira classification with history of serovars. 1992. Disponível em: <[www.vet.bg.ac.yu/ils/leptoclassif/serolis.htm](http://www.vet.bg.ac.yu/ils/leptoclassif/serolis.htm)>. Acesso em: 13 nov 1997.

LUNA-ALVARES, M. A.; MOLES-CERVANTES, L., P.; TORRES-BARRANCA, J. I.; GUALL-SILL, F. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México. **Veterinaria Mexico**, v.27, n.3, p.229-34, 1996.

McCAUGHEY, W.J.; FAIRLEI, J.S. Leptospirosis in Irish wildlife. **Veterinary Record**, v.89, n.16, p.447, 1971.

McCLURE, H.N.; KEELING, M.E.; GUILLOUD, N.B. Hematologic and blood chemistry data for the chimpanzee (*Pan troglodytes*). **Folia primatologica**, v.18, p.444-462, 1972.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; SAINT-GIRONS, T. Polimerase chain reaction goes detection of *Leptospira spp* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p. 2219-2224, 1992.

MICHNA, S.W.; CAMPBEL, R.S.F. Leptospirosis in wild animals. **Journal of Comparative Pathology**, v.8, p.101-6, 1970.

MIKAELIAN, I.; HIGGINS, R.; LEQUIENT, M.; MAJOR, M.; LEFEBURE, F.; MARTINEAU, D. Leptospirosis in raccoons in Quebec: 2 case reports and seroprevalence in a recreational area. **Canadian Veterinary**, v.38, n.7, p.440-2, 1997.

MITCHELL, M.A.; HUNGERFORD, L.L.; NIXON, C.; ESKE, T.; SULLIVA, J.; KOERKENMEIER, R.; DUBEY, J.P. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.35, n.2, p.347-55, 1999.

PANDEY, R. **Microbiologia veterinária: perspectivas clínicas e moleculares**. São Paulo: Roca, p. 170-193, 1994.

PEROLAT P., POINGT J.P., VIE J.C., JOUANEAU C., BARANTON G., GYSIN J. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 538-545, 1992.

PESTANA DE CASTRO, A.F.; SANTA ROSA, C.A.; TROISE, C. Preás (*Cavia aperea azarae*, Lichi.)-(Rodentia: Cavidae) como reservatório de *Leptospira* em São Paulo. Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.28, p.219-23, 1961.

PETERS, T.; BIAMONT, G.T.; DOUMAS, B.T. Albumin in serum. **Selected Methods of Clinical Chemistry**, Washington: AACC Press, v.9, p. 319, 1982.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.1, p.1265-1266. 2000.

POSTIC, D.; MERIEN, F.; PEROLAT, P.; BARANTON, G. **Diagnostic biologique Leptospirose – Borreliose de lyme**. Paris: Institut Pasteur. 2000, 247p.

REID H.A.; HERRON A.J.; HINES M.E.; ORCHARD E.A.; ALTMAN N.H. Leptospirosis in a white-lipped tamarin (*Saguinus labiatus*). **Laboratory of Animal Science**, Jun; v.43, n.3, p.:258-9, 1993.

REILLY, J.R.; FERRIS, D.H.; HANSON, L.E. Experimental demonstration of the enteric route of infection with *Leptospira grippotyphosa* in wild carnivores. **American Journal of Veterinary Research**, v.29, n.9, p.1849-54, 1968.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases **American Journal of Clinical Pathology**, v.28, p.56, 1957.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SOARES, R.M.; SAKAMOTO, S.M.; VASCONCELLOS, S.A.; HIGA, Z.M.M. SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E. The multiplex PCR goes the detection of *Brucella spp* and *Leptospira spp* DNA from aborted fetuses. **Veterinary Microbiology**, v.87, p. 139-147, 2002.

RIM, B.M.; RIM, C.W.; CHANG, W.H.; KAKOMA, I. Leptospirosis serology in korean wild animals. **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.29, n.4, p.602-603, 1993.

RIVIELLO, M.C.; WIRZ, A. Haematology and blood biochemistry of *Cebus apella* in relation to sex and age. **Journal of Medical Primatology**, v. 30, n.6, p. 308-312, 2001.

ROBINSON, J.G., Demography and Group Structure in Wedge-Capped Capuchin Monkeys, *Cebus olivaceus*. **Behaviour**, v. 04, p.202-232. 1988.

SÁ, L.R.M.; TEIXEIRA, R.H.F.; LORETO, C.; CATÃO-DIAS, J.L. Leptospirose em primatas neotropicais. **III Congresso e VIII Encontro da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Animais Selvagens**, São Pedro, São Paulo, p.7,1999.

SANTA ROSA, C.A.; SULZER, C.R.; GIORGI, W.; SILVA, A.S.; YANAGUITA, R.M.; LOBAO, A.O. Leptospirosis in wildlife in Brazil; isolation of a new serotype in the pyrogenes group. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n. 9, p.1363-1365, 1975.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; FEDULLO, J.D.; SIMON, F.; CARDOSO, M.V.; CASTRO, V.; MIYASHIRO, S.; GENOVEZ, M. E. *Leptospira spp.* detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 143-146, 2003.

SIEMERS, B. M. Seasonal Variation in Food Resource and Forest Strata Use by Brown Capuchin Monkeys (*Cebus apella*) in a Disturbed Forest Fragment. **Folia Primatologica**, v.71, p.181-184, 2000.

SILVA, I. A new leptospiral serotype isolated Salvador, Bahia state. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.7, n.2, p. 35-7, 1976.

SHIMIZU, M.M. Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, Island of Hawaii. **International Journal of Zoonosis**, v.11, p.173-88, 1984.

SHIVE, R.J.; GREEN, S.S.; EVANS, B.S.; GARNER, F.M. Leptospirosis in barbary apes. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.155, n.7, p.1776-1778, 1969.

SOSA, G.; SANTOS, O.; DUARTE, C.L.; HERNANDEZ, D.; DELGADO, L. Investigación sorológica y bacteriológica de leptospirosis realizada en fauna exótica. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 19, n.3, p.219-26, 1988.

STASILEVICH, Z.K.; DZHIKIDZE, E.K.; ANISIMOVA, T.A.; KRYLOVA, R.I. Serological investigations in monkeys of the adler monkey colony. **Baltic Journal of laboratory Animal Science**, v.10, n.1, 2000.

SULZER, C.R.; JONES, W.L. **Leptospirosis: method in laboratory diagnosis.** Atlanta: Center for Diseases Control, U.S., Dept. Health Education and Welfare, 40p. 1980.

SZYFRES, B. Leptospirosis an animal and public health problem in Latin America and the Caribbean Area. **Panamerican Health Organization Bulletin**, Washington, v.10, p. 110-25, 1976.

TABOR, G.M.; OSTFELD, R.S.; POSS, M.; DOBSON, A.P.; AGUIRRE, A.A. Conservation biology and the health sciences: defining the research priorities of conservation medicine. In: SOULÉ, M.E.; ORIAN, G.H. **Research priorities in conservation biology.** Island Press: Washington, D.C. 2 ed., p.155-173, 2001.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária,** São Paulo: Roca, 2007, 582p.

VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção das leptospirosas na natureza. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, n.1, p.17-24, 1987.

WILSON, M.E. **A world guide to infections: diseases, distribution, diagnosis.** New York: Oxford University Press, 1991, 225p.

WILSON, M.E. In: AGUIRRE, A. **Conservation Medicine.** New York: Oxford University Press, 407p., 2002.