

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INQUÉRITO SOROLÓGICO, MOLECULAR E FATORES DE
RISCO PARA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS CATIVOS,
PAPEL DOS ANIMAIS SINANTRÓPICOS PRESENTES NO LOCAL
E ASPECTOS DE SAÚDE PÚBLICA

LEILA SABRINA ULLMANN

Botucatu-SP

Fevereiro/2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INQUÉRITO SOROLÓGICO, MOLECULAR E FATORES DE RISCO PARA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS CATIVOS, PAPEL DOS ANIMAIS SINANTRÓPICOS PRESENTES NO LOCAL E ASPECTOS DE SAÚDE PÚBLICA

LEILA SABRINA ULLMANN

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Botucatu/SP

Fevereiro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ullmann, Leila Sabrina.

Inquérito sorológico, molecular e pesquisa de fatores de risco para leptospirose em mamíferos cativos, papel dos animais sinantrópicos capturados no local e aspectos de saúde pública/ Leila Sabrina Ullmann. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502034

1. Animais Selvagens - Doenças. 2. Leptospirose em animais – fatores de risco. 3. Botucatu (SP).

Palavras-chave: Animais Selvagens; Fatores de risco; *Leptospira* spp.; PCR; SAM; Zoológico.

Leila Sabrina Ullmann. Inquérito sorológico, molecular e pesquisa de fatores de risco para leptospirose em mamíferos cativos, papel dos animais sinantrópicos capturados no local e aspectos de saúde pública. Defesa: 17/02/2011. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Titular Jane Megid

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Assistente Dra. Márcia Marinho

Membro Titular

Departamento de Apoio Produção e Saúde Animal

Faculdade de Odontologia - UNESP - Araçatuba/SP

Profa. Assistente Dra. Simone Baldini Lucheis

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Alexander Welker Biondo

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Campus de Agrárias - UFPR - Curitiba/PR

DEDICATÓRIA

A Deus, pela bênção de eu poder cumprir mais uma etapa da minha formação, que faz parte dos meus planos para o futuro...

Dedico esta minha conquista ao meu pai, minha mãe e minha irmã pelo apoio incondicional e por entenderem que minha ausência apenas representa distância espacial, mas que estamos sempre juntos...

Dedico ainda, em especial, o cumprimento de mais esta etapa, a três pessoas que foram muito importantes na minha vida, mas que infelizmente não estão mais entre nós, três lindas flores que já se foram: meu querido primo Fábio, Vovô Álvaro e Vovó Calista Ullmann.

Usando as palavras do meu avô para expressar a gratidão, o amor e a saudade que sinto: “Para Deus, fazemos parte de um imenso jardim... E a cada dia, Ele colhe as flores mais bonitas para estarem junto Dele...” Vocês foram as três flores mais lindas que estiveram perto de mim neste jardim...

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer as muitas pessoas que, de alguma forma me ajudaram nesta caminhada...

“As pedras no caminho eu as recolho. Um dia montarei um castelo”.

Fernando Pessoa

Entendo esta frase como importante na vida de todos nós. Muito obrigada a todos que, de alguma forma, me ajudaram a recolher as pedras deste caminho... O castelo formado por estas pedras são as memórias que levarei comigo em outros caminhos a serem percorridos...

À minha família postíça, Seu Antônio, Dona Margarida, minha querida irmã Marianna e Claudinei, cunhado postíço, muito obrigada pelo apoio, incentivo e amizade de sempre...

Aos meus queridos amigos do Predinho, da época da faculdade, muito obrigada pela amizade, confiança, apoio e principalmente por vocês terem feito a diferença na minha vida a partir da graduação. Vocês são essenciais!

Algumas pessoas entram na nossa vida e temos a certeza de que elas serão companheiras sempre, independente do momento de nossas vidas... Essas pessoas: Marina, Gislaíne, Eduardo e Théo, muito obrigada mesmo!

Muito obrigada aos meus familiares por acreditarem em mim e entenderem que a minha ausência em reuniões familiares, as não visitas quando meus pais ainda moravam em Palotina e, principalmente agora, que eles não moram mais no Paraná, são

privações que preciso para completar esta etapa da minha vida. Tenham certeza que vocês fazem e sempre farão parte da minha vida, mesmo longe... A saudade é uma companheira aqui em São Paulo.

Ao professor, amigo e orientador de vida Dr. Alexander W. Biondo, muito obrigada pela paciência, apoio, amizade, dedicação, profissionalismo e por aguentar as minhas teimosias desde 2004! Saiba que você é um dos grandes exemplos da minha vida como um todo e um dos principais responsáveis pela profissional que sou.

Muito obrigada ao colega de residência Felipe Fornazari por ter ajudado com ideia do projeto de mestrado e com a manutenção das cepas de leptospira... Quanto trabalho! Muito obrigada ao prof. Carlinhos por facilitar o contato da equipe do Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" (PZMQB) e ir comigo ao zoológico para acertar o projeto.

Muito obrigada à amiga Lucilene "Dulce", minha querida R2 da residência. Encontrei uma frase para descrever como você faz a diferença: "Você faz do mundo um lugar melhor só por existir." Aceite esta frase como sua porque é exatamente assim que me sinto em relação a você. Companheira de todas as horas, uma pessoa que enxerga somente o bem nas outras, que está sempre pronta a ajudar os outros e que serve de exemplo de pós-graduanda.

As minhas colegas de casa Selene, Karen, Luciana e Pâmela, assim como a todos os estagiários que já passaram pela casa, muito obrigada por fazerem parte do Lar do Bríocko Seco, uma república com cara de casa de família!

Aos meus queridos colegas de pós-graduação da FMVZ e da área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar (SASPVSA), muito obrigada pela convivência destes quase cinco anos.

Muito obrigada a todos os amigos que perto ou mesmo longe me ajudaram seja profissionalmente seja pela amizade, e saibam que este é um dos principais valores que uma pessoa tem para mim. Muito obrigada Carlos (“Feliz”), Ulisses (“Petrel”), Rafael Haddad, Ludmila Moroz, Irina e toda equipe do LACEN-PR, por ajudar com protocolos de diagnóstico molecular de leptospirose.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP) e, em especial, ao técnico do laboratório de Zoonoses, Benedito D. Menozzi, muito obrigada pela ajuda! A Dona Ana e Adriana, que trabalham para manter nosso departamento limpo para podermos nos dedicar as nossas pesquisas, saibam que vocês são essenciais! Ao Diego (“Mogli”) que sempre nos ajuda com os materiais utilizados no laboratório e que todo dia está de bom humor e nos saúda com um bom dia e um largo sorriso, muito obrigada!

A todos os professores do DHVSP muito obrigada pelos ensinamentos em disciplinas e também no dia-a-dia... Em especial aos professores Paulo Francisco Domingues, Helio Langoni, Simone Baldini Lucheis, Jane Megid, Antônio Carlos Paes, João Pessoa de Araújo Filho, que ministraram disciplinas importantes para a minha formação.

Muito obrigada aos funcionários do PZMQB pelo apoio, acolhida e profissionalismo. Em especial, muito obrigada ao ex-estagiário, atualmente residente do zoo Ramiro Dias, pela amizade e por ter me ajudado muito durante a execução do

projeto, me avisando das datas de manejo, levando na rodoviária, trazendo amostras para Botucatu, etc. Ao diretor do zoo, ao Dr. Adauto V. Nunes e ao Médico Veterinário responsável pelo zoo Dr. Rodrigo Teixeira, muito obrigada pela receptividade e ajuda na execução do projeto. Gostei muito de ter trabalhado com vocês nestes dois últimos anos, acho que foi uma das melhores experiências da minha vida, pois vocês conseguem fazer do ambiente de trabalho um lugar onde as pessoas trabalham animadas!

Algumas pessoas além de companheiros de casa ou de trabalho se tornam verdadeiros amigos... Todos na mesma situação, longe da família, com muito trabalho e estresse na área acadêmica... Formamos uma família! Aos amigos Rodrigo Silva, Felipe Guimarães, Luísa ("Pão"), Selene, Pâmela, Virgínia, João Marcelo ("brother"), Marina, Carla Coiro, Igor, Mariana, Larissa, Aline, Ariani, Verônica e Jaqueline, muito obrigada!

A minha querida amiga Marília, muito obrigada por fazer parte da minha vida, aguentar minhas tagarelices e histórias. Você é muito especial e saiba que tenho muito orgulho da pessoa que você é! A amiga Simone Mangia sempre disposta e pronta para ajudar independente da hora, muito obrigada por também aguentar a minha tagarelíce, minhas histórias e por estar sempre perto nas horas mais difíceis. Vocês duas tem um espaço no meu coração cativado pela amizade e companheirismo.

Ao meu querido amigo Diego Nóbrega ("Toxa"), muito obrigada pela amizade construída neste último ano! Não imaginei que teria um amigo como você que eu pudesse chamar de irmão. Ah! E nunca imaginei que teria um amigo tão nerd como você... Hehehehe.

Gostaria de agradecer, em especial, uma amiga muito importante desde 2006, Ana Paula. Você provou no ano passado que com amor, confiança e fé conseguimos superar tudo o que acontece... Usando a frase que inicia os meus agradecimentos, você colheu várias pedras no ano passado que farão com que o seu castelo seja lindo! Hoje está de volta, terminando o doutorado e logo logo iniciará uma nova fase da sua vida, cheia de surpresas boas e conquistas, pode apostar!

Aos residentes da área de zoonoses passados e atuais, Carla, Mariana e Diego e a todos os residentes da área de infecciosas e planejamento.

Queridos amigos, saibam que a existência de vocês aqui em Botucatu é que faz com que eu consiga suportar a saudade da família que está longe. Vocês fazem da minha vida em Botucatu mais fácil!

Uma das partes mais difíceis para mim nesta dissertação foi escrever os agradecimentos... São muitas pessoas que me ajudaram e que infelizmente não poderei agradecer a todas especificamente aqui. Saibam que vocês são muito importantes. Muito obrigada!

Agradeço a FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, indispensável para minha manutenção em Botucatu e execução do projeto.

Por último, mas não por isso menos especial, ao meu orientador Prof. Titular Helio Langoni, muito obrigada! O senhor é um dos exemplos de profissional que um dia gostaria de ser. Agradeço do fundo do meu coração por acreditar na minha capacidade, pela oportunidade de ser sua orientada de residência e mestrado, por confiar em mim para ajudá-lo na Revista

Veterinária e Zootecnia e por permitir que eu fizesse um projeto de mestrado na área de animais selvagens e zoonoses, como sempre foi meu sonho.

Além disso, professor Helio, aprendi muito sobre família com o senhor. A dedicação que o senhor sempre teve à sua família, tanto nas horas boas como nas de tristeza; o amor, a preocupação, o carinho e o cuidado dedicados à Cidinha nos últimos anos, servem de inspiração e alerta para nós alunos de pós-graduação, que ainda estamos no início de nossas vidas.

Sinceramente.

"Depois de algum tempo, você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la, por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que se levam anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependará pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendermos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama, contudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.

Portanto... Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!"

William Shakespeare

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Histórico.....	5
2.2. Aspectos gerais da leptospirose	7
2.3. Epidemiologia	9
2.3.1 <i>Leptospira</i> spp.	11
2.3.2 Hospedeiros	13
2.3.4 Transmissão.....	14
2.3.5 Patogenia	14
2.3.6 Controle e profilaxia da leptospirose no ambiente de cativeiro.....	16
2.4. Leptospirose em animais selvagens	18
2.4.1 Animais de vida livre.....	18
2.4.2 Animais de cativeiro.....	23
2.5. Diagnóstico	25
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Delineamento Experimental.....	31
4.2. Contenção dos animais	34
4.3. Colheita de materiais	34
4.3.1. Colheita de sangue.....	34
4.3.2. Colheita de urina	35
4.3.3. Colheita de tecidos	35
4.4. Cepas de <i>Leptospira</i> spp.	35
4.5. Técnica de soroglutinação microscópica	36
4.5.1. Prova sorológica.....	37

4.6. Cultivo das amostras de urina	37
4.7. Procedimentos de biologia molecular	38
4.7.1. Extração do DNA de amostras de sangue total e urina.....	38
4.7.2 Reação em cadeia pela polimerase	38
4.7.3 Eletroforese	39
4.8 Questionário de investigação epidemiológica.....	39
4.9 Sistema de informação geográfica.....	40
4.10 Análise dos resultados.....	40
5. RESULTADOS.....	42
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9. ARTIGO CIENTÍFICO	72

ULLMANN, L.S. Inquérito sorológico, molecular e fatores de risco para leptospirose em mamíferos cativos, papel dos animais sinantrópicos presentes no local e aspectos de saúde pública. Botucatu, 2011. 108p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

Os zoológicos oferecem oportunidades ímpares para o estudo de animais selvagens em situações controladas podendo-se identificar novos agentes e/ou reservatórios, além da importância para estudos epidemiológicos que contribuam para o entendimento do papel destes animais na transmissão de enfermidades infecto-contagiosas emergentes ou re-emergentes. A leptospirose é considerada a zoonose de maior distribuição mundial. É causada por bactérias do gênero *Leptospira*, divididas em sorogrupos e sorovares patogênicos e não patogênicos. Assim, o presente estudo visa conhecer a epidemiologia da leptospirose nos mamíferos mantidos no Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”, localizado no município de Sorocaba, SP. Foram analisadas 229 amostras de soro pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), 35 amostras de sangue total, cinco amostras de urina e amostras de tecidos de quatro animais que morreram durante o período de estudo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A soroprevalência encontrada foi de 5,69% (13/229), considerada baixa. As amostras provieram de um bugio preto (*Alouatta caraya*), dois macacos aranha da testa branca (*Ateles marginatus*), dois cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), um lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), um macaco barrigudo (*Lagothrix lagothrica*), dois quatis (*Nasua nasua*) e uma anta (*Tapirus terrestris*). Nenhuma amostra no estudo molecular visando a pesquisa do DNA do agente foi positiva. Os resultados encontrados sugerem que há a circulação do agente no parque, mas pela baixa soroprevalência encontrada pode-se considerá-la normal, pois no ambiente de cativeiro diversas espécies selvagens de diferentes habitat são mantidas próximas, favorecendo a exposição a agentes infecciosos.

Palavras-chave: animais selvagens, cativeiro, leptospirose, SAM, zoonose.

ULLMANN, L.S. Serological, molecular inquiry and risk factors to leptospirosis in captive mammals, synantropical animals role and public health aspects. Botucatu, 2011. 108p. Dissertation (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Zoological parks offer impair opportunities to the study of wild animals in controlled situations allowing the identification of new agents and/or reservoirs besides the importance to epidemiological studies that contribute to the understanding of these animals role to the emergent and re-emergent infectious disease transmission. Leptospirosis is considered the most widespread zoonosis and is caused by bacterium from *Leptospira* gender, divided into serogroups and pathogenic and nonpathogenic serovars. The present study aims to know the epidemiology of leptospirosis in mammals kept at the “Quinzinho de Barros” Municipal Zoo Park, Sorocaba, SP. 229 serum samples were analyzed by microscopic agglutination test (MAT), 35 whole blood samples, five urine samples and tissue samples from four animals that died at the park during the studied period were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). Seroprevalence found was 5.69% (13/229), considered low. Samples were from one black howler monkey (*Alouatta caraya*), two white faced spider monkey (*Ateles marginatus*), two crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), one maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), one Woolly monkey (*Lagothrix lagotherica*), two coatis (*Nasua nasua*), one jaguarondi (*Puma yagouarondi*) and one tapir (*Tapirus terrestris*). None sample in molecular analysis looking for agent DNA was positive. Found results suggest that there is leptospire circulation at the park, but due to the low seroprevalence it can be considered normal, because in captive environment many wild species from different habitat are kept close favoring the exposition to infectious agents.

Key words: wild animals, captive, leptospirosis, MAT, zoonosis.

***I*NTRODUÇÃO**

1. INTRODUÇÃO

As coleções de animais selvagens em cativeiro tiveram sua origem na antiguidade para o lazer de governantes. Com o passar do tempo, houve a evolução dos parques zoológicos, concomitante com o crescimento das cidades. Atualmente, os esforços são voltados para a maior inserção dos zoológicos no contexto social. Especialistas tem se reunido para deliberar estratégias de conservação e monitoramento médico veterinário (THE WORLD ZOO ORGANIZATION AND THE CAPTIVE BREEDING SPECIALIST GROUP, 1993).

No Brasil há 127 parques zoológicos, dos quais 32 estão localizados no estado de São Paulo. Além do papel conservacionista, eles assumem importância quanto ao conhecimento dos animais selvagens nativos ou exóticos e outro aspecto relevante é a educação ambiental para a população visitante.

Aproximadamente 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos são zoonoses (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2008). A leptospirose é considerada a zoonose de maior distribuição mundial (ADLER e MOCTEZUMA, 2010), destacando-se entre as enfermidades consideradas emergentes e re-emergentes (BHARADWAJ, 2004).

O ambiente de cativeiro permite o aprimoramento de técnicas diagnósticas, além da importante fonte de informações que este ambiente representa tanto pela diversidade em espécies quanto pela menor dificuldade no manejo quando comparado a estudos a campo. O estudo de doenças infecciosas, especialmente as de caráter zoonótico, deve ser realizado objetivando-se conhecer a epidemiologia destas doenças no ambiente de criação dos animais, permitindo o estabelecimento de estratégias de controle.

Desta forma, o presente experimento objetivou primeiramente conhecer a situação da leptospirose no Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”, Sorocaba-SP, e secundariamente as possíveis fontes de infecção para os animais cativos, pela pesquisa do agente em animais sinantrópicos, como possíveis reservatórios para a infecção; além da avaliação dos fatores de risco relacionados à leptospirose nos animais selvagens cativos do parque, bem

como a infecção em trabalhadores do zoológico que mantém contato mais diretamente com os animais.

*R*evisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

No passado, acreditava-se que a leptospirose fosse causada por uma entidade ou espírito. A febre era associada com a estação do ano, a ocupação e a duração da doença, ou com a região. Uma vez identificado o seu agente etiológico e os reservatórios, no período entre 1920 e 1960, a associação da doença com as condições ambientais foi esclarecida, e estabeleceu-se como um fator de risco, as atividades laboriais em ambientes insalubres, além do risco intrínseco ocupacional, evidentemente relacionado às funções exercidas pelos trabalhadores, e o ambiente de trabalho (FAINE et al., 1999).

A leptospirose foi identificada pelo patologista alemão Adolf Weil em 1886, e em sua homenagem, a doença humana recebeu seu nome, ou seja, Síndrome de Weil, que é uma doença infecciosa acompanhada por esplenomegalia, icterícia e nefrite, causada pelo sorovar Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni da *Leptospira interrogans* (FAINE et al., 1999).

No século XIV eram observadas epidemias de icterícia e apesar de não se conhecer a causa específica, era feita a relação com tropas, banhistas, água, esgoto, ratos e os aspectos ocupacionais e estações do ano com surtos da doença de Weil. A primeira demonstração do agente na doença de Weil ocorreu somente em 1907. Desde então, várias leptospirosas foram identificadas como causa de diferentes síndromes e tipos, tanto no homem, como nos animais domésticos e selvagens (FAINE et al., 1999).

A demonstração inicial de um espiroquetídeo na doença de Weil foi um erro, que ao longo da história tornou-se uma curiosidade, pois em 1907, utilizando a técnica de Levaditi, para a coloração de espiroquetas em tecidos, Stimson visualizou micro-organismos em um paciente, acreditando tratar-se de febre amarela. Os rins continham agentes de forma espiral com final com ponto de interrogação ou gancho, denominado de “Spirochoeta interrogans”. O material preparado por Stimson foi fotografado e reproduzido por Noguchi em 1928, e atribuiu-se a morte do referido paciente à doença de Weil ou que estivesse na fase convalescente da doença, quando contraiu febre amarela, e morreu (FAINE et al., 1999).

Outra observação importante de Stimson foi a primeira descrição das leptospiras nos túbulos renais, mas não em outros locais como vasos sanguíneos ou glomérulo o que ele denominou de estágio de “eliminação” (*shedder*) da infecção (FAINE et al., 1999).

Pesquisadores japoneses descobriram o papel dos ratos como reservatórios da leptospirose. Esta importante observação abriu o caminho para o entendimento dos aspectos epidemiológicos referentes à transmissão por animais carreadores, bem como para o controle, e para pesquisas futuras em outros animais potenciais reservatórios. Somente após vários anos outros animais domésticos e selvagens foram reconhecidos como fontes de infecção e as implicações da disseminação da leptospirose foram entendidas (FAINE et al., 1999).

A primeira publicação sistemática sobre a morfologia das leptospiras foi atribuída a Noguchi, após 1928 em uma série de publicações, descrevendo a fina estrutura das leptospiras, e comparando-as microscópica e sorologicamente com outras espiroquetas. A confusão entre a febre amarela e a doença de Weil foi reforçada quando Noguchi encontrou leptospiras em material hepático de um paciente cujo diagnóstico foi de febre amarela no Equador. O agente foi denominado *Spirochaeta icteróides* e Noguchi acreditou tratar-se do agente da febre amarela, mas este lembrava a espiroqueta da doença de Weil. Com a evolução das pesquisas, chegou-se a acreditar que o agente que causava as duas enfermidades era idêntico (FAINE et al., 1999).

O erro de Noguchi foi ter usado material proveniente de outros pesquisadores. Pacientes com hemorragia e icterícia com leptospirose severa são frequentemente confundidos com aqueles que apresentam febre amarela. As duas doenças ocorrem nas mesmas populações e no mesmo ambiente geográfico. A doença de Weil e a febre amarela eram facilmente confundidas porque as diferenças clínicas não eram tão óbvias, e não havia ainda testes laboratoriais específicos para ambas. O vírus da febre amarela e a história natural da doença só foram descobertos em 1929 (FAINE et al., 1999). Este fato retrata a importância dos estudos epidemiológicos em relação às enfermidades infecto-contagiosas, ressaltando a escassez de recursos tecnológicos para a pesquisa na época. Hoje, diversas técnicas podem ser utilizadas na identificação dos agentes infecciosos, mas as ferramentas

moleculares estão modificando o que se conhecia sobre as leptospirosas, além das técnicas sorológicas que caracterizam o sorovar envolvido, podendo-se identificar o provável reservatório.

Em meados da década de 20, boa parte do atual conhecimento sobre leptospirose e leptospirosas foi apresentada, incluindo: leptospirose anictérica, aglutinação e lise, imunização ativa, estado de portador nos animais, infecção em cães e a diferenciação sorológica dos tipos de leptospirosas, todas descritas nos primeiros sete anos. Gradualmente, surgiram as descrições do fenômeno de adesão, a distinção clara de *Leptospira icterohaemorrhagiae* da *Leptospira canicola*, do reconhecimento de outras leptospirosas, e de sua associação com as diferentes formas de manifestação da doença, e sua distribuição mundial (FAINE et al., 1999).

2.2. Aspectos gerais da leptospirose

A leptospirose é considerada uma zoonose de ampla distribuição mundial, presente em todos os continentes, exceto à Antártida (ADLER e MOCTEZUMA, 2010), destacando-se entre as enfermidades consideradas emergentes e re-emergentes (BHARADWAJ, 2004), com mais de 500 mil casos de leptospirose severa são reportados anualmente no mundo (BOURHY et al., 2010).

No Brasil, a leptospirose é endêmica (SVS, 2010) e considerada o maior problema de saúde pública (TASSINARI et al., 2008), tendo sido notificados 37.035 casos da enfermidade no período entre 1999 a 2009 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A taxa de mortalidade da doença de Weil (forma grave) e da síndrome hemorrágica pulmonar severa é de >10% e 74%, respectivamente (McBRIDE et al., 2005; GOUVEIA et al., 2008). Alguns estudos sugerem que a leptospirose pode representar entre 20-40% das doenças febris de origem desconhecida (ABELA-RIDDER et al., 2010). 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 (BOURHY et al., 2010).

Em um mundo globalizado, onde as fronteiras são continuamente cruzadas devido a atividades de turismo internacional, as doenças tropicais, como a leptospirose, tem emergido como significativa causa de morbidade e mortalidade. Para uma doença, em que ainda muito precisa ser aprendido, deve-se atentar para a epidemiologia e padrões de incidência global que podem reforçar práticas de prevenção. Isto é especialmente importante, pois surtos de leptospirose tem ocorrido em populações jovens saudáveis, incluindo atletas e militares, e a sua urbanização é uma preocupação crescente (PAPPAS et al., 2008).

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 (PAPPAS et al., 2008).

Atualmente, surtos de leptospirose foram associados ao turismo (BOURHY et al., 2010) e atividades recreacionais em ambiente silvestre. Desta forma, verifica-se a importância de estudos relacionados ao papel de espécies de animais selvagens como reservatórios tanto no ambiente silvestre como em cativeiro.

As influências como o 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 (FAINE et al., 1999). Destaca-se, entretanto, o papel do meio ambiente que favorece a manutenção do agente, e a relevância da geografia médica para poder se entender melhor os aspectos epidemiológicos da leptospirose tanto nos animais como no homem.

As condições que favorecem a propagação da leptospirose no ambiente dependem dos fatores climáticos (SENIOR, 2008). As alterações climáticas não somente levam as calamidades naturais, mas também podem ter impacto na emergência de doenças como a leptospirose. Em particular, a alta pluviosidade e enchentes em algumas regiões frequentemente levam a epidemias graves (ADELA-RIDDER et al., 2010). As condições sanitárias precárias e o sistema

de drenagem de água da chuva inadequado, juntamente com o acúmulo de lixo, favorecem o contato humano com excreções dos reservatórios (DIAS et al., 2007), assim como o contato de animais selvagens mantidos em cativeiro, com excreções de reservatórios.

Devido à sua ocorrência mundial, a leptospirose tem impacto significativo em populações vulneráveis. As favelas, ambientes com saneamento inadequado, são locais de alto risco. O ciclo de transmissão da enfermidade é mantido frequentemente porque as pessoas são continuamente expostas, e as medidas de controle e vigilância são escassas ou inexistentes (ABELA-RIDDER et al., 2010).

Ressalta-se, portanto, a epidemiologia dinâmica da leptospirose, que ocorre em situações diversas tanto no ambiente urbano e rural, no caso do homem e animais domésticos, como no ambiente de cativeiro e silvestre, no caso dos animais selvagens.

Novos grupos de risco podem ser formados como resultados de alterações nas práticas agrícola e social ou na população de animais reservatórios na área (SWAPNA et al., 2006). Devem ser incentivados os estudos voltados à ocorrência da leptospirose, seja pela manutenção no ambiente e em animais selvagens, seja pela exposição de hospedeiros susceptíveis, incluindo o homem e os animais domésticos e selvagens.

2.3. Epidemiologia

A leptospirose ocorre mundialmente onde quer que exista o risco de exposição direta ou indireta com a urina ou tecidos de animais infectados ou seus produtos (FAINE et al., 1999). O ponto central da epidemiologia desta enfermidade é o estado de portador renal, pois os reservatórios tem seus túbulos renais colonizados por leptospiros, que são excretadas pela urina, contaminando o ambiente (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Praticamente todos os mamíferos, incluindo os aquáticos e marsupiais, tem sido caracterizados como reservatório de leptospiros. A transmissão ocorre principalmente em condições ambientais com umidade e não pela ingestão de alimentos ou pela inalação de partículas. As fontes de infecção da leptospirose em climas temperados são principalmente os roedores e cães, e a infecção está

relacionada às atividades de lazer e viagens. Habitantes da área rural estão sempre sob maior risco, especialmente em condições de clima tropical onde estão em contato próximo com roedores domésticos ou silvestres potencialmente infectados, e animais domésticos em clima quente e úmido. Em locais de clima temperado os principais transmissores são suínos, bovinos e cães (FAINE et al., 1999).

Enquanto algumas exposições ocupacionais continuam a existir, situações relacionadas a viagens e atividades recreacionais (ecoturismo) e esportivas realizadas na água (natação, canoagem, rafting, canoagem e pesca) tem emergido como importantes na transmissão da leptospirose (JANSEN et al., 2005). Estas atividades favorecem a exposição ao agente provavelmente devido à presença de reservatórios selvagens no ambiente silvestre.

Os animais selvagens são relevantes na epidemiologia da leptospirose, pois algumas espécies, principalmente pequenos mamíferos, atuam como reservatórios de diversos sorovares (MILLÁN et al., 2009). Diversas técnicas podem ser empregadas no diagnóstico da leptospirose em animais selvagens, porém para se determinar se o animal sororreagente é de fato reservatório de leptospiras patogênicas, estudos moleculares e isolamento devem ser realizados.

A intensidade da chuva, a ocorrência de enchentes e desastres naturais podem influenciar na densidade da população murina de diferentes formas. Os roedores e outros animais sinantrópicos podem proliferar devido à presença de lixo, a deficiência no saneamento básico, como esgoto a céu aberto, presença de mato, que podem aumentar a disponibilidade de alimento. Por outro lado, as enchentes podem destruir o habitat destes animais, reduzindo sua quantidade, mas também podem aumentar o contato entre os animais e o homem, pelo fato dos animais serem levados de seu habitat, e as pessoas se deslocarem de suas casas (LAU et al., 2010). Deve-se considerar ainda a contaminação ambiental pelo carreamento de leptospiras presentes no ambiente para dentro dos domicílios.

2.3.1 *Leptospira* spp.

As leptospiras são micro-organismos finos, delgados e helicoidais sob microscopia de campo escuro, considerado o método padrão para sua visualização. Variam entre 10 a 20 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro, frequentemente com estrutura como uma interrogação em uma das extremidades (FAINE et al., 1999).

São aeróbias obrigatórias com temperatura ótima de crescimento de 28-30°C. Crescem em meio simples enriquecido com as vitaminas B1 e B12, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônia. O seu crescimento em meio contendo soro ou albumina em meios livres de proteína sintética tem sido reportados. Diversos meios líquidos enriquecidos com soro de coelho foram descritos no passado, mas atualmente o meio líquido mais utilizado é o EMJH, baseado em ácido oléico, albumina bovina sérica e polissorbato (Tween). Algumas cepas requerem a adição de piruvato ou soro de coelho para o isolamento inicial. O crescimento de contaminantes provenientes de amostras clínicas pode ser inibido pela adição de 5-fluorouracil, gentamicina, ácido nalidíxico ou rifampicina (FAINE et al., 1999).

O seu crescimento é frequentemente lento no isolamento primário, e as culturas devem ser mantidas por aproximadamente 13 semanas. Em meios semi-sólidos, o crescimento alcança a densidade máxima em uma zona discreta abaixo da superfície do meio, que se torna túrbida conforme o processo de incubação. Este crescimento é relacionado à tensão de oxigênio ótima, e conhecida como anel ou zona de Dinger. As culturas de leptospiras são mantidas por repetidas sub-culturas ou pela estocagem em meios semi-sólidos contendo hemoglobina. A estocagem por longos períodos em nitrogênio líquido também traz bons resultados e é o método de escolha para a estocagem e manutenção da virulência (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

A leptospirose é causada por bactérias da ordem *Spirochetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (LEVETT, 2001). Na reunião do Subcomitê de Taxonomia realizada em 2007 em Quito, Equador, as espécies de leptospiras 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. vanthiellii* e *L. wolbachii*) (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

As diferentes espécies são classificadas em sorogrupos compostos por mais de 200 sorovares patogênicos e 60 não patogênicos, baseando-se em características antigênicas (KO et al., 2009) pela expressão de epítomos expostos na superfície em um mosaico de antígenos LPS, enquanto a especificidade dos epítomos depende da composição e orientação de seus açúcares (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). A sorotipagem tem sido reconhecida como uma ferramenta essencial em investigações clínicas e epidemiológicas, e pode indicar o reservatório envolvido na transmissão da doença (KO et al., 2009).

Com as tecnologias biomoleculares disponíveis atualmente é possível a identificação da espécie de leptospira (patogênica ou saprófita), porém apenas pelas técnicas sorológicas como a soroaglutinação microscópica é possível a identificação do sorovar responsável pela infecção.

Possuem uma estrutura da membrana dupla típica, na qual a membrana citoplasmática e o peptidoglicano da parede celular estão intimamente associados e sobrepostos pela membrana externa. Na membrana externa, o lipopolissacarídeo (LPS) é o seu principal antígeno, imunologicamente similar ao LPS das bactérias Gram negativas, e relativamente não tóxico para células e animais. Juntamente com o LPS, proteínas estruturais e funcionais formam parte da membrana externa (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Grande proporção de tais proteínas são lipoproteínas com relativa abundância na superfície celular em concentrações diferentes: LipL32 > LipL21 > LipL41 (CULLEN et al., 2005). As proteínas integrais de membrana como a OmpL1 e a secretina GspD também se localizam na sua membrana externa e são antigênicas (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

O gene *lipL32* codifica uma lipoproteína da membrana externa que é considerada um fator de virulência presente nas leptospiros patogênicas (LipL32). Desta forma, foi desenvolvida uma técnica de PCR em tempo real utilizando *primers* específicos para este gene na tentativa de se diferenciar por esta técnica as leptospiros patogênicas e não patogênicas (STODDARD et al., 2009).

2.3.2 Hospedeiros

Quase todos os mamíferos jovens parecem ser susceptíveis a leptospirose, seja antes ou após o nascimento, demonstrando que não estão protegidos pela imunidade passiva transferida pela placenta ou colostro. A infecção pode ser evidente e grave, ou subclínica, mas em ambas as formas podem resultar em estado de portador renal, o que não pode ser estabelecido sem a infecção sistêmica prévia (FAINE et al., 1999).

Não se sabe se a associação geral e a sobreposição das espécies hospedeiras e do sorovar de *Leptospira* spp. é baseada nos fatores biológicos e imunológicos ou nas relações ecológicas ou numa combinação de fatores. O entendimento desta associação pode auxiliar para o conhecimento das fontes de leptospirose epidêmica ou endêmica. De outro lado, praticamente não se conhece sobre a aparente completa resistência de algumas espécies animais à infecção por alguns, ou pela maioria, dos sorovares de leptospiros, nem sobre a maior resistência em animais adultos, exceto que a taxa de desenvolvimento do sistema imunológico também exerce influência (FAINE et al., 1999).

O estado de portador renal é relevante na persistência e epidemiologia da leptospirose. O agente coloniza a superfície livre das células epiteliais dos túbulos proximais renais e podem persistir por períodos de semanas a anos, e frequentemente durante toda a vida do animal em algumas associações sorovar-hospedeiro. A excreção na urina pode ser intermitente ou contínua. As leptospiros não sobrevivem em urina ácida, mas permanecem viáveis em urina alcalina. Consequentemente, herbívoros e animais que produzem urina alcalina são relativamente mais importantes como disseminadores comparados àqueles com urina ácida (FAINE et al., 1999). Diferentes espécies de animais domésticos e selvagens se infectam, tornando-se portadores renais e potenciais disseminadores do agente no ambiente, pela urina (SHARMA et al., 2003). Evidências do estado de portador renal tem sido demonstrada em muitos mamíferos pesquisados (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

Embora alguns sorovares de leptospiros estejam associados a um determinado reservatório, todos os animais são susceptíveis a infecção por qualquer variante sorológica (BHARTI et al., 2003). Espécies selvagens são

susceptíveis à infecção por grande variedade de sorovares (FAINE et al., 1999; ULLMANN et al., 2007; SILVA et al., 2008; ZETUN et al., 2009; LANGONI et al., 2009; FORNAZARI et al., 2010).

2.3.4 Transmissão

A leptospirose pode ser transmitida diretamente pelo contato com sangue ou urina de animais infectados ou indiretamente pelo contato com água contaminada com urina de animais portadores (BHARTI et al., 2003). A doença não é transmitida pela ingestão de alimento ou pela inalação de partículas no ar (FAINE et al., 1999).

Indiretamente, a infecção pode ocorrer pelo contato com solo ou lama contaminada em ambiente úmido, ou pelo contato direto com urina, carcaças frescas ou órgãos contaminados. A infecção homem-homem tem sido relatada como extremamente rara e insignificante, pois os pacientes humanos convalescentes geralmente não eliminam o agente por longos períodos, e medidas de higiene básica previnem a infecção proveniente de sangue ou urina de pessoa infectada. Infecções subsequentes pelo mesmo sorovar são raras, mas podem ocorrer, por outros sorovares nas pessoas que se recuperaram de doença pregressa (FAINE et al., 1999).

2.3.5 Patogenia

O entendimento dos mecanismos de virulência, patogenia e imunidade é essencial para a compreensão dos aspectos clínicos, epidemiológicos e preventivos da leptospirose. O mecanismo da doença, em geral, é similar em todos os animais, independentemente da espécie ou do sorovar infectante. Entretanto, há diferenças inexplicadas com relação à especificidade dos sorovares. Alguns animais, como os ratos, que são carreadores crônicos dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni parecem não ser susceptíveis à infecção aguda por estes, e não susceptíveis a outros sorovares como Pomona e Hardjo. Outros animais como hamsters, porco da Índia e gerbils respondem à infecção experimental frente a vários sorovares (FAINE et al., 1999).

Na natureza, os animais são constantemente expostos a uma variedade de sorovares de leptospiros, desenvolvendo infecções subclínicas e baixos níveis de anticorpos, que tem seu papel na imunidade pouco entendido. Há ainda uma forte relação, de origem imunológica, entre a idade e a susceptibilidade à infecção (FAINE et al., 1999).

A porta de entrada são pequenos cortes ou abrasões, da pele com disseminação via corrente sanguínea ou linfática. Pode penetrar pela conjuntiva, trato genital em alguns animais, mucosa nasofaríngea, ou via transplacentária, ou pela pele íntegra úmida, em contato com água por longo período de tempo. Quase imediatamente após a entrada, o agente alcança a corrente sanguínea, circulando para todos os órgãos, caracterizando a fase de leptospiremia que se estende ao redor de sete dias (FAINE et al., 1999; ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

O tempo para o desenvolvimento das lesões depende do inóculo, e número de micro-organismos virulentos, da taxa de multiplicação no hospedeiro, toxicidade e do desenvolvimento de imunidade. Pequenas doses de inóculo resultam em maior período de incubação, que pode se estender a fase de resposta imune, produzindo infecções subclínicas ou leves, clinicamente quase insignificantes. Por outro lado, inóculos maiores podem matar pela toxicidade, em até 48 horas, e as doses baixas podem não levar a morte pelo desenvolvimento de imunidade antes dos níveis de toxicidade serem alcançados, o que ocorre em aproximadamente 8-10 dias. Animais jovens e imunologicamente imaturos podem se tornar imunocompetentes durante este período (FAINE et al., 1999).

Nos animais que não morrem na leptospirose aguda, as leptospiros persistem em pequeno número em alguns tecidos que são locais imunologicamente privilegiados, seguida do *clearance* na circulação sanguínea. Estes tecidos incluem, além dos túbulos renais, o cérebro, a câmara anterior do olho e o trato genital dos suínos, ovinos e provavelmente de outros animais. No rim, a multiplicação é contínua, exponencialmente atingindo pico entre 21-28 dias pós infecção. No túbulo renal, elas migram para o espaço intersticial e são excretadas pela urina, revestidas por anticorpos originados do extravasamento provocado pelos danos nos túbulos renais durante e logo após a infecção (FAINE et al., 1999).

Posteriormente, os anticorpos passam do glomérulo para os túbulos, onde se concentram. Nos portadores renais são revestidas com lipopolissacarídeos ou proteínas oriundas do hospedeiro, impedindo a aglutinação por anticorpos séricos aglutinantes. Esta característica é perdida após a sua passagem em meios de cultura. Os fetos de mamíferos parecem agir da mesma forma que os animais adultos, e se sobrevivem à infecção, podem se tornar carreadores congênitos (FAINE et al., 1999).

Qualquer tipo de fagócito fagocita leptospiros opsonizadas. As leptospiros patogênicas requerem a adição de imunoglobulinas específicas, de qualquer classe, que reagem com o antígeno LPS. A especificidade é associada ao sorovar e reações cruzadas ocorrem com sorovares quase que exclusivamente do mesmo sorogrupo (FAINE et al., 1999).

Após a carga bacteriana no sangue e tecidos alcançar nível crítico, e as lesões pela ação de suas toxinas ou componentes celulares tóxicos, se desenvolvem os sintomas. A primeira lesão ocorre no endotélio dos pequenos vasos sanguíneos levando à isquemia localizada nos órgãos, resultando em necrose tubular renal, lesão hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite. Hemorragias ocorrem nos casos severos assim como icterícia, e frequentemente, diminuição plaquetária. Há geralmente granulocitose leve e esplenomegalia (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

Os mecanismos pelos quais as leptospiros causam lesões nos tecidos do hospedeiro e doença, não são bem definidos. Em particular, as bases moleculares para a virulência permanecem desconhecidas, devido principalmente a ausência, até recentemente, de ferramentas genéticas para a manipulação do agente (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

2.3.6 Controle e profilaxia da leptospirose no ambiente de cativeiro

Animais selvagens no ambiente urbano se mantêm em alta densidade e agem como reservatório de vários agentes infecciosos. Devido ao fato da maioria dos parques zoológicos se localizarem no ambiente urbano, existe a possibilidade de disseminação de agentes infecciosos por animais selvagens de vida livre para os animais cativos (JUNGE et al., 2007).

A maior parte dos zoológicos possui recintos abertos para muitas das espécies mantidas em cativeiro, resultando na exposição dos animais a roedores e gambás, entre outros animais (FAINE et al., 1999).

Não existem dados na literatura sobre a prevenção da leptospirose no ambiente em cativeiro. Além da exposição a diferentes sorovares de leptospirosas, devido à co-habitação de espécies de diferentes locais, ocorre a exposição dos animais a animais sinantrópicos, como roedores e marsupiais, que encontram abrigo, água e alimento. Portanto, medidas para o controle dos animais sinantrópicos são importantes na prevenção da leptospirose no ambiente de cativeiro.

Pode ser realizada a captura de roedores e também a utilização de venenos, para o combate nos casos de alta infestação. Ainda, pode-se, após a captura, os animais podem ser testados sorologicamente, soltando os negativos, ou submetê-los à eutanásia para pesquisa do estado de portador renal.

Medidas relacionadas ao caráter ocupacional da leptospirose devem também ser implantadas, como a utilização de equipamentos de proteção individual como luvas e botas de borracha para a limpeza geral do parque ou para a limpeza de lagos existentes em alguns recintos, que podem servir de foco de contaminação para a infecção, e nos casos de acidentes envolvendo os animais sinantrópicos deve haver notificação para que medidas cabíveis sejam tomadas, e também se deve procurar assistência médica.

A confirmação laboratorial do diagnóstico da leptospirose é de grande importância, pois pode indicar a espécie de reservatório a partir da sorologia, de acordo com o sorovar reagente. Podem ser identificados portadores renais e reservatórios, contribuindo para o controle da leptospirose no ambiente.

Após a identificação do animal portador, este deve ser segregado do grupo que habita o mesmo recinto, para evitar a disseminação para outros espécimes, e dependendo do animal, proceder ao tratamento com antimicrobianos que atuem tanto na fase de leptospiremia como leptospirúria. Não há vacinas específicas contra leptospirose para animais selvagens.

A educação em saúde relacionada à leptospirose também é de grande relevância, principalmente para os funcionários que trabalham diretamente com os animais e para aqueles da limpeza. Claro que os médicos veterinários

responsáveis pelo local e que realizam o diagnóstico clínico nos animais, são formadores de opinião e devem estar capacitados para tal atividade.

Devido à enorme variedade de espécies mantidas em zoológico, dos diferentes tipos de recintos, da existência de mata no ambiente do parque, da epidemiologia dinâmica da leptospirose, das diversas espécies de reservatórios e também da possibilidade da infecção em animais assintomáticos, o controle da leptospirose no ambiente de cativeiro é uma tarefa árdua, podendo haver casos de surtos da doença.

2.4. Leptospirose em animais selvagens

Poucos são os estudos relacionados à leptospirose em animais selvagens, sendo a maior parte deles referentes somente à avaliação sorológica dos animais, não sendo possível a identificação de reservatórios, fato importante para se estabelecer os fatores de risco de infecção para os animais.

Capivaras foram inoculadas com o sorovar Pomona de leptospiros para se investigar a soroconversão, leptospiremia e o potencial de reservatório desses animais. A eliminação do agente na urina foi detectada por métodos moleculares como a PCR entre o 9° e 43° dias pós infecção. Devido à intermitência da eliminação das leptospiros na urina, o período de eliminação poderia ter sido maior. Desta forma, as capivaras podem servir como fontes de infecção para outros animais, bem como para o homem, no ambiente silvestre, habitat destes roedores (MARVULO et al., 2009).

2.4.1 Animais de vida livre

Rinocerontes brancos (*Ceratotherium simum*) e pretos (*Diceros bicornis*) de vida livre, capturados entre 1987 e 1997 na República da África do Sul, na Namíbia e no Quênia foram avaliados sorologicamente contra 16 agentes infecciosos, incluindo *Leptospira* spp. A prevalência variou entre 1,2 a 8,8% nas diferentes regiões e os sorovares encontrados foram Grippotyphosa, Tarassovi, Bratislava e Copenhageni (FISCHER-TENHAGEN et al., 2000).

Para se avaliar o potencial de reservatório de leptospiras patogênicas, mamíferos silvestres foram capturados nas proximidades da cidade de Iquitos, Peru, e amostras de tecido renal foram submetidas à PCR. Os resultados mostraram que 29% (40/136) apresentaram evidência de infecção renal por este agente, sendo 20% (13/64) roedores, 39% (20/51) marsupiais e 35% (7/20) morcegos. Os marsupiais e morcegos parecem ser os reservatórios mais importantes para os humanos (BUNNEL et al., 2000). Amostras de soro de 109 mamíferos silvestres peri-domiciliares foram avaliadas, encontrando-se anticorpos contra os sorovares Icterohaemorrhagiae, Gryppothiphosa e Canicola. Apenas amostras de soro de gambás foram negativas. Os dados mostram o potencial dos animais silvestres que se domicíliam, como possíveis reservatórios de leptospirose para o homem e cães (RICHARDSON e GAUTHIER, 2003).

Amostras de soro de 17 veados campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) do pantanal Matogrossense, Mato Grosso do Sul, e de 24 espécimes do Parque Nacional das Emas, Goiás, foram testadas para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. Todos os animais do Parque Nacional das Emas foram negativos, porém quatro (24%) dos animais capturados no Pantanal Matogrossense foram positivos para os sorovares Hardjo, Wolffii e Mini. A leptospirose não parece ser de grande importância para o estado sanitário destes animais, mas parece que eles podem agir como reservatórios em uma das áreas estudadas (MATHIAS et al., 1999). Sabe-se que apenas a sorologia não indica necessariamente que os animais sejam reservatórios da infecção, até porque os sorovares encontrados tem como reservatórios principalmente os bovinos, que compartilham o mesmo habitat.

Os tatus são usados como alimento principalmente em áreas rurais e pouco se sabe sobre seu potencial como fonte de infecção da leptospirose para o homem e outros animais. A soroprevalência desta zoonose foi estudada em 31 tatus-galinha (*Dasypus novemcinctus*), três tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*), dois tatus-de-cauda mole (*Cabassous tatouay*) e dois tatus-mulita (*D. hybridus*), mostrando-se positividade em 3/31 (9,68%) dos tatus-galinha e 1/3 (33,33%) dos tatus-peba, demonstrando os riscos de transmissão para o homem, principalmente devido ao hábito de ingestão da carne destes animais em áreas rurais (SILVA et al., 2008).

Javalis foram identificados como reservatórios da infecção em diversas áreas do Japão. Atenção especial deve ser dada ao risco de infecção para caçadores, magarefes e cães de caça no Japão (KOIZUMI et al., 2009). Deve-se levar em consideração o risco ocupacional de pessoas que caçam ou manuseiam material proveniente de animais silvestres. Sorologicamente, 63/308 (20,54%) dos javalis criados no estado de São Paulo foram positivos, para um ou mais sorovares de leptospiros, o que indica que estes animais mantidos em cativeiro podem representar fonte de infecção para o homem e outros animais (FORNAZARI, 2010).

A presença de anticorpos para *Leptospira* spp. foi detectada em cervídeos (*Cervus elaphus hispanicus* e *Dama dama*) e em javalis (*Sus scrofa*) em Asturias, norte da Espanha (ESPÍ et al., 2010), em javalis na Alemanha, com sorologia associada a nefrite intersticial crônica e detecção de leptospiros em tecido renal (JANSEN et al., 2007). O mesmo foi encontrado para cangurus cinzentos (*Macropus giganteus*) na Austrália, sendo que a importância destes animais como reservatórios ainda está em discussão (ROBERTS et al., 2010).

Amostras de 201 carnívoros silvestres e domésticos de áreas protegidas da Andalusia, Espanha, foram testadas para a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. com soroprevalência de 23,5% com títulos variados para diversos sorovares. Resultado similar foi encontrado entre os animais domésticos e silvestres. Os carnívoros podem ser utilizados como animais sentinelas para a leptospirose (MILLÁN et al., 2009), aspecto importante nas ações de vigilância epidemiológica.

Amostras de tecido renal e urina de morcegos pterópides (*Pteropus* spp.) foram analisadas por técnicas moleculares resultando em 11% (19/173) amostras renais positivas e 39% (18/46) amostras de urina, revelando que estes animais eliminam leptospiros no ambiente, na qualidade de reservatório (COX et al., 2005). Um caso de leptospirose humana foi descrito tendo como possível fonte de infecção um morcego (VASHI et al., 2009). Soroprevalência de 7,8% (16/204) foi encontrada em morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) na região de Botucatu, São Paulo, demonstrando a possibilidade destes animais atuarem como reservatórios da infecção (ZETUN et al., 2009).

Em estudo conduzido com 343 morcegos capturados em diferentes locais da megalópole São Paulo, apenas seis foram positivos na reação em

cadeia da polimerase para leptospiros patogênicas em amostras de tecido renal, sendo nenhum sororreagente (BESSA et al., 2010).

No *Campus* Universitário da FCAV, UNESP, Jaboticabal/SP, estudou-se a prevalência da leptospirose em animais domésticos (equinos, suínos, ovinos, bovinos e cães) e selvagens (gambás e cervídeos). As amostras foram coletadas em três momentos: outubro de 2007, março de 2008 e julho de 2008. Dos 25 gambás analisados, 11 (44%) foram reagentes para os sorovares Patoc, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae. Não se pode descartar a possível transmissão entre os gambás e os animais domésticos. Entre os equinos, suínos, caprinos, ovinos e bovinos, os sorovares mais encontrados foram Patoc na primavera, Autumnalis e Patoc no verão e Icterohaemorrhagiae no inverno, justamente os sorovares encontrados nos marsupiais. Os setores com maior população de marsupiais correspondem aos locais onde maior número de animais foi positivo, reforçando o papel dos gambás como reservatórios (SILVA et al., 2010b). Ressalta-se, entretanto, que não foram incluídos roedores na pesquisa, que são sabidamente importantes reservatórios do sorovar Icterohaemorrhagiae, e que foram estudadas apenas amostras de soro, não se podendo afirmar sobre a condição de reservatório dos gambás analisados.

Sorologia positiva contra diversos sorovares de *Leptospira* spp. foi encontrada em diversas espécies selvagens, incluindo: leão marinho (*Zalophus californianus*) de vida livre nos Estados Unidos (ACEVEDO-WHITEHOUSE et al., 2003; LLOYD-SMYTH et al., 2007), guaxinim (*Procyon lotor*) de vida livre nos Estados Unidos (JUNGE et al., 2007; DAVIS et al., 2008; JARDINE et al., 2010), ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) de vida livre da Austrália (LOEWENSTEIN, 2008), urso marrom (*Ursus arctos*) de vida livre da Croácia (SLAVICA et al., 2010) e queixada (*Tayassu pecari*) de vida livre do Brasil (FREITAS et al., 2010). Tal fato mostra a ampla distribuição da infecção leptospírica no ambiente.

No Japão, isolou-se leptospiros de amostras de tecido renal de 2/71 guaxinins em Kanagawa e 1/53 no parque zoológico de Nagasaki, que foram identificadas como *L. interrogans*. Por meio de eletroforese em campo pulsátil e teste de aglutinação com anti-soro específico de uma cepa proveniente de Kanagawa, foi identificada como Copenhageni/Icterohaemorrhagiae e uma cepa de cada região foi identificada como o sorovar Hebdomadis.

Sorologicamente foi encontrada prevalência de 12,9% (16/124) em Kanagawa e de 62,3% (33/53) no parque zoológico de Nagasaki. Embora não esteja claro se os animais já albergavam leptospirosas quando importados, não há dúvida que estes animais são considerados reservatórios do agente no Japão (KOIZUMI et al., 2009).

Estudos sobre leptospirose em leões marinhos na Califórnia estão disponíveis na literatura. A partir de grande mortalidade em 1970, os leões marinhos da costa da Califórnia e Oregon tem sido afetados por surtos de leptospirose, em intervalos regulares, e a leptospirose tem sido implicada como causa de nascimento precoce nestes animais. Os estudos avaliaram filhotes sorológica e molecularmente (ACEVEDO-WHITWHOUSE et al., 2003). Um surto ocorrido em 2004 teve os fatores de risco analisados juntamente com o diagnóstico. Houve associação positiva entre idade (os mais jovens), sexo (macho), estação do ano (verão e outono) e também proximidade com parques de cães e densidade humana. O número de casos de leptospirose na região estudada aumentou também em cães, gado, equinos e no homem após períodos de intensa chuva no verão e no outono (NORMAN et al., 2008).

Após este surto de 2004, os animais foram acompanhados até 2007, como atividade de vigilância, obtendo-se diversos isolados do sorovar Pomona e verificando-se que a incidência de novos casos de leptospirose entre os leões marinhos coincidiu com o movimento sazonal dos machos ao longo da costa, o que facilita a disseminação do agente em ampla região geográfica (ZUERNER et al., 2009). Estes dados concordam com os resultados obtidos por Norman et al. (2008), que encontram prevalência maior em machos, que possuem o hábito de se deslocar entre as ilhas, diferentemente das fêmeas, que permanecem com os filhotes, que são considerados mais sensíveis.

Apesar de não ter sido encontrada associação positiva entre a chuva intensa e o surto de leptospirose nesta espécie, deve-se lembrar que a água doce desemboca no mar, podendo contaminar, portanto, o habitat dos leões marinhos, facilitando a disseminação da doença para estes animais. Os animais infectados eram frequentemente encontrados perto de estuários de água doce, aumentando a probabilidade de transmissão da leptospirose para o homem, animais domésticos e selvagens terrestres. Os leões marinhos da

Califórnia infectados podem representar problema de saúde pública (ZUERNER et al., 2009).

Considerando-se os aspectos levantados depreende-se que a epidemiologia da leptospirose é dinâmica e a importância da relação entre os casos que ocorrem no ambiente terrestre e de água doce, influenciam a saúde da população marinha. Esta relação é de grande importância para a medicina da conservação não somente para a população de leões marinhos, mas para outras espécies que ali habitam.

Estudo sorológico sobre leptospirose e brucelose foi conduzido com 147 leões marinhos da Nova Zelândia (*Phocarctos hookeri*), fêmeas, adultas, de vida livre, resultando em apenas um animal fracamente positivo contra *Brucella* spp. pela técnica de ELISA e apenas um animal soropositivo para *Leptospira* spp. sorovar Pomona (ROE et al., 2010), o mesmo sorovar encontrado em leões marinhos da Califórnia (ZUERNER et al., 2009). Verificou-se, ainda, que estas duas zoonoses não interferem na dinâmica populacional desta espécie e que pela baixa soroprevalência encontrada, estes animais não são fontes de infecção para o homem e outros animais desta área (ROE et al., 2010).

Diversas espécies de animais selvagens habitam cada vez mais áreas urbanas, aumentando o contato com o homem e, conseqüentemente, a transmissão de doenças infecciosas para este e outros animais domésticos como cães e gatos, e ainda para animais selvagens mantidos em cativeiro em parques zoológicos. Desta forma, são relevantes os estudos de animais reservatórios tanto em animais sinantrópicos como selvagens para se evitar a ocorrência de surtos além da contribuir para o controle de diversas enfermidades.

2.4.2 Animais de cativeiro

Poucos estudos se referem à infecção leptospírica em populações cativas, reportando morte em primatas (SHIVE et al., 1969; SÁ et al., 1999), guanaco (HODGIN et al., 1984) e lontra gigante (FARIAS et al., 1999) e um caso de leptospirose em kudu menor (*Tragelaphus imberbis australis*) (FOGELBERG e FERRELL, 2010). No Brasil, a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. foi avaliada em diversas espécies de mamíferos selvagens,

resultando em prevalências variadas como 37,7% (26/77) encontrada no Zoológico do Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2002), 19,5% (59/302) na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (CORRÊA et al., 2004a), 45,9% (28/61) no Criadouro da Itaipu Binacional (GUERRA-NETO et al., 2004), 10,2% (17/166) no Zoológico Municipal de Uberaba (ESTEVEES et al., 2005), 12,5% (4/32) no Zoológico de Aracaju (PIMENTEL et al., 2009) e 26,5% (103/388) no Zoológico de Ribeirão Preto (SILVA et al., 2010a). Da mesma forma, prevalência de 52% (25/48) foi encontrada no Chapultepec Zoo, na Cidade do México (LUNA-ALVAREZ et al., 1996) e 25% (19/118) no Zoológico Municipal da Coréia (JUNG et al., 2007).

Em estudo realizado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo foram processadas amostras de soro de animais sinantrópicos, capturados no zoológico como ratos (*Rattus norvegicus*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) pela SAM, com positividade para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* em 42,8% dos ratos e 40% dos gambás. Dois ratos foram positivos na cultura bacteriana, e a classificação sorológica foi compatível com o sorovar Copenhageni (CORRÊA et al., 2004a). No caso de felídeos selvagens mantidos na mesma instituição a soroprevalência foi de 16,8% (17/101) (CORRÊA et al., 2004b).

No zoológico de Uberaba-MG, avaliou-se a presença de anticorpos em aves e gatos domésticos sendo todos negativos (ESTEVEES et al., 2005).

Uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e um gato maracajá (*Leopardus wiedii*) foram soropositivos para leptospirose entre 57 felídeos testados mantidos em cativeiro no Refúgio Biológico Bela Vista, Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, Paraná. A soroprevalência encontrada foi de 3,5% (2/57) (ULLMANN et al., 2007) e indica que os felinos neotropicais, assim como os gatos domésticos, não tem importância na cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose (LANGONI et al., 1998).

Pesquisou-se a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em quatis (*Nasua nasua*) mantidos em cativeiro e a soroprevalência encontrada foi de 52,94% (9/17), sendo os sorovares Copenhageni e Shermani os prevalentes (22,22%). Os resultados revelam a infecção em animais assintomáticos e reforçam que os animais silvestres em cativeiro podem se infectar com riscos de se tornarem reservatórios (LANGONI et al., 2009).

Os estudos sobre a soroprevalência da leptospirose em animais cativos citados anteriormente, assinalam a possibilidade de diferentes mecanismos de transmissão, entretanto não foram realizados estudos observacionais para identificar os fatores de risco associados à infecção dos animais.

Surto de leptospirose em 52 macacos-prego (*Cebus*) recolhidos em casas e albergados em um centro de reabilitação de animais selvagens na Colômbia foi estudado. O diagnóstico foi realizado em duas fases: cultivo de sangue e PCR utilizando o gene *lipL32* para avaliar o caráter patogênico dos isolados. Dezesesseis casos foram confirmados e a necropsia revelou icterícia difusa e hemorragia pulmonar. A tipificação multi-loco revelou tratar-se de *L. interrogans*, indicando o rato como fonte de infecção, o que foi confirmado pela grande infestação de roedores. A leptospirose adquirida naturalmente não é comum em macacos. A manutenção de primatas em recintos inadequados pode criar novos reservatórios e vias de transmissão da leptospirose para efeitos de conservação, e problemas para a saúde pública (SZONYI et al., 2010).

2.5. Diagnóstico

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 (BRASIL, 1995; AHMAD et al., 2005).

A soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose (BRASIL, 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). 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 leptospiros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Trata-se de uma prova indireta, que não diferencia anticorpos resultantes de infecção ou vacinação (ADLER e MOCTEZUMA, 2010) e ainda a fase da doença, além dos níveis de anticorpos serem detectáveis somente entre sete e dez dias após o início da infecção, o que pode prejudicar o prognóstico do paciente. A interpretação dos resultados é

dificultada em animais previamente vacinados, infectados ou originários de áreas endêmicas (LUCCHESI et al., 2004).

A cultura é o diagnóstico definitivo da leptospirose, porém é limitada pelo crescimento lento, com longo período de incubação (até 13 semanas). Não é utilizada rotineiramente por demandar longo período para o resultado final, porém o isolamento é importante para a epidemiologia da leptospirose (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

A biologia molecular tem despontado como opção, pelas dificuldades e limitações das técnicas sorológicas e microbiológicas utilizadas no diagnóstico (SMYTHE et al., 2002; PALANIAPPAN et al., 2005). Os métodos moleculares são específicos, pois se pode estudar uma região do genoma exclusiva de determinado agente. A sensibilidade é assegurada pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), capaz de amplificar seqüencial e exponencialmente a região genômica de interesse (RIEDIGER, 2007). A PCR pode ser realizada com os seguintes materiais biológicos: sangue total (MÉRIEN et al., 1992; KOSITANONT et al., 2007), soro (GRAVEKAMP et al., 1993) e urina (VAN EYS et al., 1989; MÉRIEN et al., 1992; LUCCHESI et al., 2004).

A sensibilidade da PCR geralmente supre a necessidade do isolamento em cultura, tornando-a ideal para a detecção rápida de organismos envolvidos nas infecções agudas. Com a PCR em tempo real, é possível quantificar a carga bacteriana (SMYTHE et al., 2002). Desta forma, é possível avaliar os aspectos de patogenia e virulência dos sorovares envolvidos.

Recentemente, foram identificadas proteínas (Lig A e B) que codificam genes de fator de virulência das leptospiras. Estas proteínas são encontradas somente nas patogênicas. Utilizando os iniciadores para Lig A e Lig B, tanto a PCR convencional como a PCR em tempo real foram positivas desde o primeiro dia de infecção, utilizando-se rins e fígado de hamsters infectados. A sensibilidade e a especificidade dos iniciadores Lig nos métodos de PCR convencional e em tempo real provam ser uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce de leptospirose. Esta técnica pode também ser utilizada para identificar carreadores assintomáticos que eliminam o agente pela urina, reduzindo as chances de sua disseminação (PALANIAPPAN et al., 2005).

O gene *lipL32* presente nas leptospiras patogênicas codifica uma lipoproteína da membrana externa que é considerada um fator de virulência

não presente nas não patogênicas. Foi desenvolvida uma técnica de PCR em tempo real utilizando *primers* específicos para este gene na tentativa de se diferenciar por esta técnica as patogênicas e não patogênicas (STODDARD et al., 2009).

Alguns estudos demonstram que pela capacidade de se detectar a doença em estágios distintos, os métodos sorológicos e moleculares podem fornecer resultados discordantes, porém complementares (KEE et al., 1994; KOSITANONT et al., 2007).

*O*BJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Avaliar a soroprevalência e o estado de portador renal em mamíferos cativos de um parque zoológico.

2. Avaliar a participação dos animais sinantrópicos como fontes de infecção para os animais cativos e para os trabalhadores do parque zoológico.

3. Avaliar os fatores de risco de infecção para leptospirose aos quais os mamíferos selvagens cativos estão sendo expostos.

4. Avaliar o conhecimento dos funcionários do parque zoológico sobre leptospirose pela aplicação de um questionário.

*M*ATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas no projeto foram colhidas no Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” (PZMQB), localizado no município de Sorocaba, SP (S 23°30'19.36 e W 47°26'14.63)'.

O PZMQB foi fundado em 20 de outubro de 1968 e está inserido em uma área de 130.000 m², tendo em seu interior o Museu Histórico de Sorocaba, abrigando atualmente cerca de 1.200 espécimes.

Com a classificação “A”, o PZMQB é referência na América Latina no que se refere ao lazer, à pesquisa, à preservação e à educação ambiental, recebendo, em 2007, mais de um milhão de visitantes, dentre eles estudantes de 81 cidades do estado de São Paulo.

Os trabalhos laboratoriais referentes à sorologia, cultivo e isolamento e as técnicas moleculares foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, NUPEZO, localizados no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu/SP.

4.1. Delineamento Experimental

Foram analisadas 229 (Tabela 1) amostras de soro de mamíferos selvagens provenientes do banco de soro do PZMQB e animais sinantrópicos capturados no parque a partir de 2007 até agosto de 2010, incluindo amostras pareadas. Ainda foram processadas por PCR, 35 (Tabela 2) amostras de sangue e cinco (Tabela 3) amostras de urina dos animais que passaram por algum tipo de manejo na instituição durante o período do estudo, além de fragmentos de tecidos de quatro mamíferos (Tabela 4) do parque zoológico que morreram, pelas técnicas moleculares. Apenas uma amostra de urina de babuíno sagrado (*Papio hamadryias*) foi cultivada na tentativa de isolamento.

Tabela 1. Distribuição por espécie, número de espécimes (N) e número de amostras de soro (n) dos mamíferos selvagens e dos animais sinantrópicos (*) capturados no PZMQB utilizados no experimento. Botucatu-SP, 2010.

Espécie	Nome Comum	N	n
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio Preto	3	3
<i>Alouatta fusca</i>	Bugio	3	3
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco Aranha da Testa Branca	6	6
<i>Ateles chamek</i>	Macaco Aranha da Testa Preta	1	1
<i>Blastocerus dichotomus</i>	Cervo do Pantanal	1	2
<i>Brachytelis arachnoides</i>	Mono carvoeiro	5	10
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui de Tufo Branco	5	5
<i>Callithrix penicilata</i>	Sagui de Tufo Preto	1	1
<i>Cebus olivaceus</i>	Caiarara	1	2
<i>Cebus xanthosternos</i>	Macaco Prego do Peito Amarelo	2	2
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-Mato	11	15
<i>Cervus elaphus</i>	Cervo Nobre	2	9
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo Guará	3	17
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço	7	7
* <i>Didelphis albiventris</i>	Gambá de Orelha Branca	8	8
* <i>Didelphis aurita</i>	Gambá de Orelha Preta	9	9
<i>Eira barbara</i>	Irara	2	5
<i>Elaphus maximus</i>	Elefante Asiático	1	5
<i>Eritrocebus pata</i>	Macaco Pata	1	1
* <i>Felis catus</i>	Gato Doméstico	2	2
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Macaco Barrigudo	3	4
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	4	5
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-Mato-Pequeno	15	19
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato Maracajá	1	1
<i>Lutra longicaudis</i>	Lontra	2	3
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-Campo	7	7
<i>Macropus fuliginasus</i>	Canguru Cinzento	2	3
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	2	2
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado Catingueiro	1	1
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá Bandeira	9	12
<i>Nasua nasua</i>	Quati	6	12
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé	1	1
<i>Panthera leo</i>	Leão	3	8
<i>Panthera onca</i>	Onça Pintada	3	4
<i>Panthera tigris</i>	Tigre	1	3
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno Sagrado	6	7
<i>Procyon cancrivorus</i>	Mão Pelada	1	1
<i>Puma colocolo</i>	Gato Palheiro	1	2
<i>Puma concolor</i>	Suçuarana	3	4
<i>Puma yagouarondi</i>	Gato Mourisco	4	8
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá Mirim	1	2
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta	3	4
<i>Ursus americanus</i>	Urso Americano	1	3

Tabela 2. Distribuição por espécie das amostras de sangue total analisadas pela PCR. Botucatu-SP, 2010.

Espécie	Nome comum	N
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco Aranha	3
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	6
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	1
<i>Galictis cuja</i>	Furão	1
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	2
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	6
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	4
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno Sagrado	1
<i>Cebus xanthosternos</i>	Macaco Prego do Peito Amarelo	1
<i>Eira barbara</i>	Irara	1
<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	4
<i>Cervus elaphus</i>	Cervo nobre	2
<i>Blastocerus dichotomus</i>	Cervo do Pantanal	1
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo Guará	1
<i>Nasua nasua</i>	Quati	1
Total	-	35

Tabela 3. Distribuição por espécie das amostras de urina analisadas pela PCR. Botucatu, 2010.

Espécie	Nome comum	N
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo Guará	1
<i>Eira barbara</i>	Irara	1
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	2
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno Sagrado	1
Total	-	5

Tabela 4. Distribuição por espécie das amostras de tecido analisadas pela PCR.

Espécie	Nome comum	N
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	1
<i>Blastocerus dichotomus</i>	Cervo do Pantanal	1
<i>Cebuella pygmaea</i>	Sagui leãozinho	1
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	1
Total	-	4

4.2. Contenção dos animais

Considerando a idade e o tamanho dos animais realizou-se contenção física e química, procurando-se minimizar o estresse da captura. Neste caso, seguiu-se o protocolo adotado pela Divisão de Medicina Veterinária do PZMQB. Para a contenção física foram utilizadas luvas de couro, puçás, jaula de prensa e caixa de transporte. Na contenção química, foram priorizados anestésicos utilizados na rotina da Divisão de Medicina Veterinária do PZMQB, como cetamina e midazolan para a indução com a utilização de dardos e para a manutenção eram utilizadas cetamina e midazolan ou propofol. Um kit de emergência e de fuga estava à disposição caso algum animal apresentasse problemas na anestesia ou tentasse fugir.

4.3. Colheita de materiais

Durante os procedimentos de manejo realizados no PZMQB foram coletadas as amostras de sangue e urina por sondagem ou cistocentese.

4.3.1. Colheita de sangue

As amostras de sangue total foram colhidas por venopunção da veia cefálica ou safena. Uma alíquota de sangue total com EDTA foi acondicionada em microtubos de polipropileno e armazenada a -80°C para a realização das técnicas diagnósticas moleculares, e uma alíquota de sangue total sem anticoagulante foi centrifugada a 1600 g por 10 minutos para a obtenção do soro. O soro sanguíneo obtido foi transferido para microtubos de polipropileno identificados e mantidos a -20°C até o momento da realização das provas sorológicas.

Não há correspondência no momento da colheita das amostras de sangue total e soro, pois foram utilizadas amostras do banco de soro do parque zoológico coletadas previamente e as amostras de sangue total foram coletadas apenas para a realização do presente estudo.

4.3.2. Colheita de urina

As amostras de urina foram colhidas por cistocentese ou sondagem após a contenção química dos animais. O volume coletado foi de acordo com o porte da espécie. As amostras foram acondicionadas em tubo Falcon estéril com capacidade para 15 mL.

Imediatamente após a colheita, foi realizada a neutralização da urina com solução salina (PBS) 1X pH 7,2 estéril na proporção 1:1 (500µL de PBS 7,2 e 500µL da urina) em microtubo com capacidade para 1,5 mL. As amostras foram mantidas a 4°C por até no máximo 24 horas, sendo então centrifugadas a 11.000 g por 5 minutos (“spin”) para eliminar resíduos de urina, e a seguir, foram ressuspensas em 500 µL de PBS pH 7,2 estéril em microtubo com capacidade para 1,5 mL livre de RNase e DNase e congeladas a - 80 °C até o momento da realização das técnicas moleculares.

4.3.3. Colheita de tecidos

Foram colhidos fragmentos de órgãos como fígado, rim, baço e pulmão dos animais sinantrópicos, e os do plantel que morreram, acondicionando-se em microtubos de polipropileno de 1,5 mL de capacidade, mantendo-se a -80 °C até o momento da realização das técnicas moleculares.

4.4. Cepas de *Leptospira* spp.

Como antígenos para o exame sorológico, pela prova de soroaglutinação microscópica (SAM), foram utilizadas culturas vivas de 28 sorovares (Tabela 5) de *Leptospira* spp. com sete dias de crescimento em meio líquido de Ellinghausen - Mac Cullough – Johnson - Harris (Albumina bovina “Tween 80”) (EMJH).

Tabela 5. Sorovares mantidos em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina “Tween 80”, no NUPEZO/FMVZ/UNESP – Botucatu -SP, utilizados na prova de SAM, Botucatu-SP, 2010.

SOROGRUPO	SOROVAR
Australis	Australis
	Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
	Butembo
Ballum	Castellonis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Whitcombi
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
	Sentot
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae
Javanica	Javanica
Panama	Panama
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo
	Wolffi
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi
Seramanga	Patoc

4.5. Técnica de soroaglutinação microscópica

A SAM foi realizada segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995). As amostras séricas dos mamíferos mantidos no PZMQB, dos

animais sinantrópicos capturados e dos funcionários do parque foram testadas para 28 sorovares de *Leptospira* spp.

4.5.1. Prova sorológica

As amostras de soro foram diluídas inicialmente a 1:50, utilizando-se 100µL de soro e 4.900 µL de solução salina tamponada de fosfatos (SSTF) pH 7.2. Em microplacas distribuiu-se 50 µL do soro diluído e adicionou-se 50 µL dos sorovares, duplicando a diluição inicial (100). O mesmo procedimento foi realizado para uma amostra de controle negativo.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora e a leitura realizada em microscópio de campo escuro, considerando-se como reagente a reação com 50% ou mais de aglutinação em relação ao controle.

As amostras reagentes na primeira diluição (triagem) para determinado sorovar, foram novamente diluídas, sucessivamente, na razão dois (50, 100, 200, 400, 800) e examinadas, considerando-se como título final aquele em que ainda houvesse 50% ou mais de leptospiros aglutinadas. No caso de resposta a mais de um sorovar (co-aglutinação), considerou-se como responsável pela infecção, o de maior título. Estabeleceu-se como ponto de corte ou resultado positivo a partir da diluição 1:100.

4.6. Cultivo das amostras de urina

Imediatamente após a colheita da urina, 0,5mL foi inoculado em solução diluente contendo antimicrobianos, 1:5 (volume/volume), 0,5mL desta suspensão foi diluída em 4,5mL (10^{-1}), realizando-se diluições seriadas até 10^{-5} . Inoculou-se 0,5mL das três últimas diluições (10^{-3} a 10^{-5}) em tubos de meio de Fletcher contendo 5-fluorouracil (SANTA ROSA, 1970; OIE, 1996). Os tubos foram incubados por 60 dias a temperatura de 28°C, com observação do desenvolvimento bacteriano semanalmente, examinando-se 0,03 mL da parte superior dos tubos de cultura, microscopicamente entre lâmina e lamínula, em microscópio de campo escuro. Além da avaliação microscópica os tubos foram também examinados para a observação de formação de zona ou anel de Dinger.

4.7. Procedimentos de biologia molecular

4.7.1. Extração do DNA de amostras de sangue total e urina

A extração do DNA das amostras de sangue total, fragmentos de rins e fígado e urina foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular do NUPEZO. Para as amostras de sangue total e urina foi utilizado o kit Illustra blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e para as amostras de tecido utilizou-se o kit Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

4.7.2 Reação em cadeia pela polimerase

Para a amplificação do DNA utilizou-se um sistema com iniciadores específicos para amplificação de um fragmento do gene *lipL32* do genoma das espécies patogênicas de *Leptospira* spp. (STTODARD et al., 2009). Os iniciadores utilizados na reação de amplificação parcial do gene *lipL32* apresentavam as seguintes sequências nucleotídicas: LipL32-45F AAGCATTACCGCTTGTGGTG; LipL32-286R GAACTCCCATTTCAGCGATT.

Para a reação de PCR foi utilizado o termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf). A amplificação do DNA foi realizada em um volume final de 25 µL. A mistura de reação era constituída de 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada iniciador (LipL32-45F e LipL32-286R), 200 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1 U de *Taq Platinum* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O volume da mistura de reação foi corrigido com água ultrapura para 23 µL. A seguir foram adicionados 2 µL de DNA extraído (10ng).

O primeiro ciclo era constituído de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento dos iniciadores a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Os 30 ciclos seguintes consistiram de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 63°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma etapa final de 10 minutos a 72°C conferiu extensão completa aos iniciadores. Essa reação gerou produtos de PCR de 285 pb.

Todas as baterias de reação foram acompanhadas por um controle negativo de amplificação (5 µL de água ultrapura) e um controle positivo de amplificação (5 µL de DNA de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae cepa RGA).

4.7.3 Eletroforese

Os produtos de PCR obtidos (15 µL) e 6 ng de marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foram aplicados em gel de agarose tipo II eletroendosmose 0.09-0.13 mm (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 1,5% impregnado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), utilizando 2,5 µL de *Blue Loading Buffer* para o carregamento. Os produtos foram então separados por eletroforese horizontal usando TBE 1X como tampão de corrida, sob 160 V por 45 minutos. Em seguida, o gel de agarose foi exposto à luz ultravioleta em transiluminador para revelação dos fragmentos separados e comparação do tamanho dos fragmentos do produto da PCR com aqueles gerados pelo marcador de peso molecular. O gel foi fotografado e a imagem digitalizada em sistema de foto-documentação *Kodak Digital Science – Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak, Rochester, NY, USA). A definição de resultados positivos e negativos foi baseada na identificação visual das bandas no gel de agarose.

4.8 Questionário de investigação epidemiológica

Referente a cada animal foi aplicado um questionário de investigação epidemiológica para o estudo dos fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. As questões foram formuladas para se verificar as várias possibilidades de exposição dos animais em relação ao agente, levando-se em consideração as práticas de manutenção dos animais *ex situ* no PZMQB.

O questionário foi elaborado a partir da epidemiologia da leptospirose considerando-se a situação dos animais mantidos *ex situ*, as diferentes espécies mantidas no zoológico, os diferentes setores e recintos, a introdução de novos animais que podem ser reservatórios, a presença de animais

domésticos como cães e gatos, assim como a presença de sinantrópicos como roedores e gambás e a disponibilidade do alimento no zoo.

O nível de conhecimento dos profissionais do PZMPB sobre a leptospirose também foi avaliado pela aplicação de um questionário respondido por 41 funcionários, dentre eles tratadores, médicos veterinários, serviços gerais e responsáveis pela limpeza.

4.9 Sistema de informação geográfica

A exata localização geográfica de cada mamífero reagente nos diferentes setores do PZMQB foi estabelecida utilizando GPS (Global Positioning System) e as mesmas foram inseridas em um banco de dados digital utilizando interface georreferenciada do Google Earth (<http://earth.google.com>).

4.10 Análise dos resultados

Os dados epidemiológicos e resultados da prova sorológica foram tabulados em planilha Excel. A associação entre as variáveis epidemiológicas e os resultados de triagem sorológica foi analisada pelos testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, considerando-se $\alpha = 0,05$ (TRIOLA, 2005). Todos os testes foram realizados em programa EpiInfo™ v.3.5.1.

*R*esultados

5. RESULTADOS

Das 229 amostras de soro provenientes de 43 espécies de mamíferos mantidas no PZMQB, 13 (5,67%) foram positivas para um ou mais sorovares de leptospiros, com títulos variáveis de 100 a 1600 UI, considerando-se como ponto de corte ou título positivo a diluição 1:100. Os resultados com seus respectivos sorovares e títulos, assim como o número de espécimes por espécie, encontram-se na Tabela 6. Alguns animais tinham amostras de soro pareadas e estas foram incluídas no estudo.

Tabela 6. Resultados da sorologia para leptospirose (*Leptospira* spp.) em mamíferos selvagens mantidos em cativeiro no PZMQB. Botucatu-SP, 2010.

Espécie	Nome Comum	N	n	R	Sorovares (Título)
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio Preto	3	3	1/3	BUT (100)
<i>Alouatta fusca</i>	Bugio	3	3	NR	NR
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco Aranha Testa Branca	6	6	2/6	ICT (100), BUT (200)
<i>Ateles chamek</i>	Macaco Aranha Cara Preta	1	1	NR	NR
<i>Blastocercus dichotomus</i>	Cervo do Pantanal	1	2	NR	NR
<i>Brachytelis arachnoides</i>	Mono carvoeiro	4	10	1/9	BRA (100)
<i>Callithrix jacchus</i>	Sagui de Tufo Branco	5	5	NR	NR
<i>Callithrix penicilata</i>	Sagui de Tufo Preto	1	1	NR	NR
<i>Cebus olivaceus</i>	Caiarara	1	2	NR	NR
<i>Cebus xanthosternos</i>	Macaco Prego Peito Amarelo	2	2	NR	NR
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-Mato	11	15	2/15	SEN (100, 200)
<i>Cervus elaphus</i>	Cervo Nobre	2	9	NR	NR
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo Guará	3	17	1/17	CAN (100)
<i>Coendou prehensilis</i>	Ouriço	7	7	NR	NR
<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá de Orelha Branca	8	8	NR	NR
<i>Didelphis aurita</i>	Gambá de Orelha Preta	9	9	NR	NR
<i>Eira barbara</i>	Irara	2	5	NR	NR
<i>Elaphus maximus</i>	Elefante Asiático	1	5	NR	NR
<i>Eritrocebus pata</i>	Macaco Pata	1	1	NR	NR
<i>Felis catus</i>	Gato Doméstico	2	2	NR	NR
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Macaco Barrigudo	3	4	1/4	DJA (100), ICT (400), POM (100)
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaririca	4	5	NR	NR
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-Mato-Pequeno	15	20	NR	NR
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato Maracajá	1	1	NR	NR
<i>Lutra longicaudis</i>	Lontra	2	3	NR	NR
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-Campo	7	7	NR	NR

Continuação					
<i>Macropus fuliginasus</i>	Canguru Cinzento	2	3	NR	NR
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	2	2	NR	NR
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado Catingueiro	1	1	NR	NR
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá Bandeira	9	12	NR	NR
<i>Nasua nasua</i>	Quati	8	12	2/12	CAN (100), COP (100)
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé	1	1	NR	NR
<i>Panthera leo</i>	Leão	3	8	NR	NR
<i>Panthera onca</i>	Onça Pintada	3	4	NR	NR
<i>Panthera tigris</i>	Tigre	1	3	NR	NR
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno Sagrado	6	7	NR	NR
<i>Procyon cancrivorus</i>	Mão Pelada	1	1	NR	NR
<i>Puma colocolo</i>	Gato Palheiro	1	2	NR	NR
<i>Puma concolor</i>	Suçuarana	3	4	NR	NR
<i>Puma yagouarondi</i>	Gato Mourisco	4	8	1/8	SEN (100)
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá Mirim	1	2	NR	NR
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta	3	4	2/4	POM (400; 1600), ICT (400; 1600)
<i>Ursus americanus</i>	Urso Americano	1	3	NR	NR

N= Número de espécimes; n=Número de amostras; R= Amostras reagentes; NR= Amostras não reagentes. BUT= Butembo; BRA= Bratislava; CAN= Canicola; COP= Copenhageni; DJA= Djasiman; ICT= Icterohaemorrhagiae; POM= Pomona; SEN= Sentot.

Das 14 espécies de primatas não-humanos analisadas, espécimes de quatro espécies foram positivas, incluindo: um bugio preto macho, adulto de vida livre; dois macacos aranha da testa branca sendo uma fêmea e um macho, ambos adultos e nascidos em cativeiro; um monocarvoeiro macho de vida livre, que foi sorologicamente positivo para o sorovar Bratislava, em 2007 e após 2,5 anos, em 2009, mostrou-se negativo, e um macaco barrigudo macho, jovem de vida livre.

Entre os carnívoros, um cachorro-do-mato fêmea adulta de vida livre apresentou inicialmente título 200 para o sorovar Sentot e após dois meses de 100 para o mesmo sorovar. Ainda, um lobo guará fêmea, adulta de vida livre, apresentou título 100 para o sorovar Canicola, um quati macho adulto nascido em cativeiro apresentou título 100 para o sorovar Canicola e um quati macho adulto de vida livre apresentou título 100 para o sorovar Copenhageni e um gato mourisco fêmea, adulta de vida livre apresentou título 100 para o sorovar Sentot.

Entre os perissodáctilas, uma anta fêmea adulta nascida em cativeiro apresentou título de 1600 para os sorovares Pomona e Icterohaemorrhagiae em 2007 e na sorologia pareada em 2009, o título para o sorovar Icterohamorrhagiae e Pomona havia caído para 400 e 100, respectivamente.

As amostras de sangue total, de urina e de tecido submetidas à PCR, foram negativas para leptospiros. Da mesma forma, a amostra de urina submetida ao isolamento em meio de Fletcher foi negativa.

A pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. nas amostras séricas de 30 funcionários do parque zoológico, lograram-se negativas para todos os sorovares testados.

As atividades desempenhadas por estes servidores, que participaram da pesquisa, incluem limpeza e serviços gerais, tratadores de diferentes setores do parque, caixa da bilheteria do parque, biólogos, médicos veterinários, além de um guarda municipal.

Quanto ao grau de conhecimento de 41 servidores, sobre a leptospirose, pode ser considerado como médio, de acordo com a Figura 1, que mostra para os diferentes itens as respostas obtidas, com relação ao agente etiológico, modo de transmissão, conceito de reservatório, existência de vacina para o homem e animais, sintomatologia (quando suspeitar) e sobre fatores de risco.

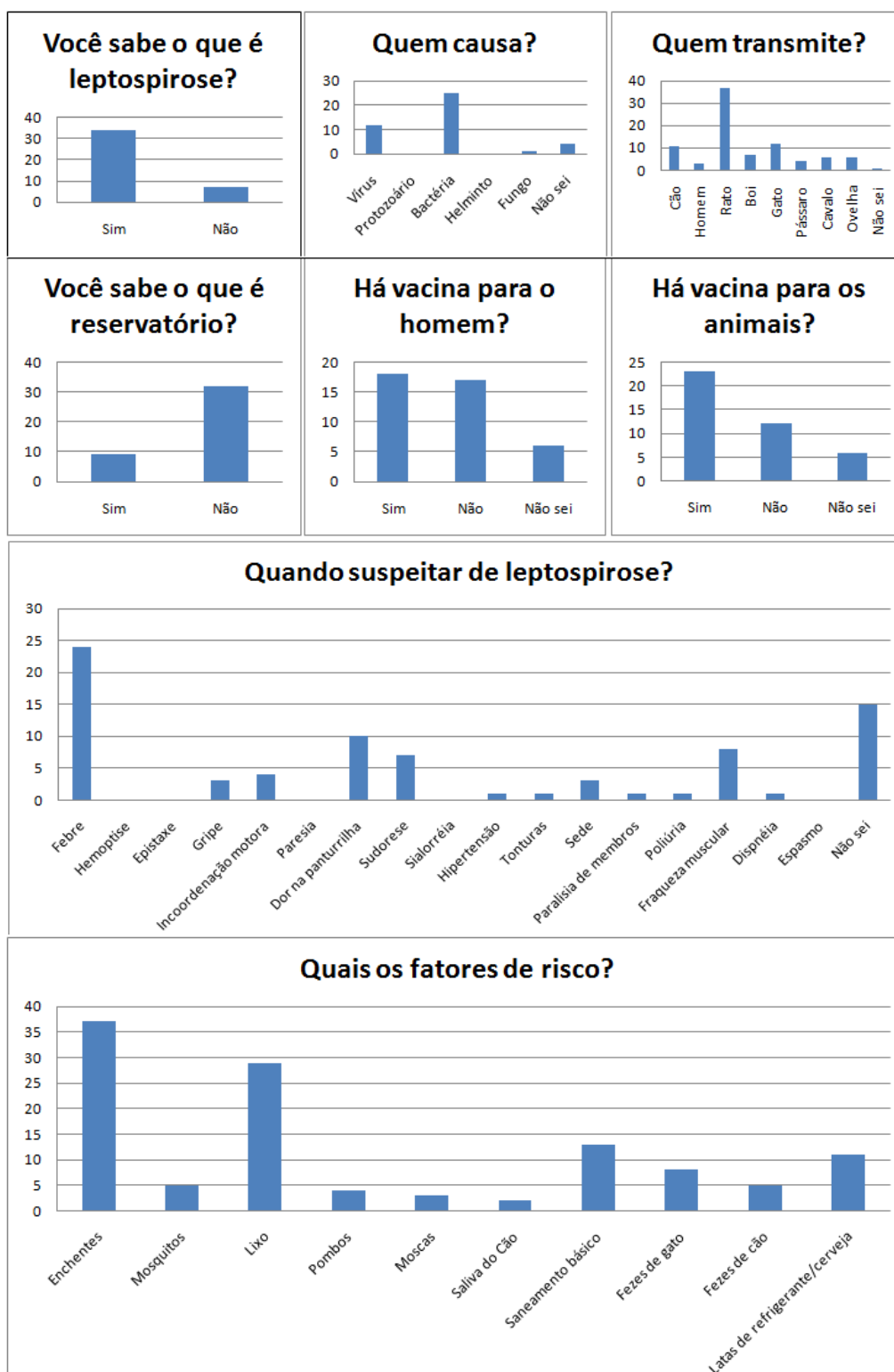


Figura 1. Grau de conhecimento sobre leptospirose dos servidores do PZMQB. Botucatu-SP, 2010.

A maioria, 34 (82,93%) dos entrevistados respondeu saber o que é leptospirose, caracterizando-a como “doença transmitida pelo rato” ou “doença do rato”. 25 (60,97%) responderam que a doença é causada por uma bactéria e 12 (29,23%) responderam ser um vírus. O rato foi incriminado como o principal transmissor da leptospirose por 37 (90,24%), seguido pelo gato 12 (29,27%) e o cão por 11 (26,83%) dos servidores. Apenas nove (21,95%) dos entrevistados souberam responder o que é reservatório. Os principais sintomas assinalados como associados à leptospirose foram febre 24 (58,54%), dor na panturrilha 10 (24,39%), fraqueza muscular 8 (19,51%) e sudorese 7 (17,03%). Quanto aos fatores de risco associados à ocorrência de infecção, as enchentes 37 (90,24%) e o acúmulo de lixo 29 (70,73%) foram os mais assinalados, seguidos pela falta de saneamento básico 13 (31,71%) e latas de cerveja/refrigerante 11 (26,83%).

A figura 2 traz a localização dos animais reagentes na área geográfica do PZMQB.



Figura 2. Imagem de satélite do PZMQB, destacando a localização dos recintos dos animais positivos para leptospirose. Botucatu-SP, 2010.

A tabela 7 apresenta a associação entre os dados epidemiológicos e os resultados dos exames sorológicos.

Tabela 7. Associação das variáveis epidemiológicas estudadas com o resultado da pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. nos animais avaliados. Botucatu-SP, 2010.

Variável		N	SAM ^a	Variável (%); IC95% ^b	OR (IC95%) ^c	P ^d
Presença de Animais Domésticos	Sim	20	1	5,0; 1,2–23,8	0,9 (0,1–7,1)	0,69 ^e
	Não	211	12	5,7; 3,3–9,6		
Disponibilidade do Alimento	Durante o dia	151	9	6,0; 9,6–30,3	-	0,76 ^f
	Durante a noite	1	0	0,0; 1,2–8,4		
	Todo tempo	63	4	6,3%; 2,5-15,2		
Origem	Vida Livre	137	7	5,1; 9,5–34,3	1,07 (0,33-3,51)	0,56 ^e
	Cativeiro	91	5	5,5; 2,4–12,2		
Presença de Animais Sinantrópicos	Sim	64	6	9,4; 4,4-19,0	2,36 (0,7-7,3)	0,11 ^e
	Não	167	7	4,2; 2,0-8,3		
Espécies de Animais Sinantrópicos	Aves	59	4	6,8; 2,7-16,2	-	0,83 ^f
	Aves e Macacos	4	2	50; 14,6-85,3		
	Rato	1	0	0,0; 1,2-84,2		

^a Título ≥ 100

^b Frequência de animais positivos baseada nas variáveis estudadas (intervalo de confiança = 95%)

^c OR: Odds ratio

^d P: valor de P para $\alpha = 5$

^e Teste Exato de Fisher

^f Teste de Qui-Quadrado

*D*iscussão

6. DISCUSSÃO

Embora os esforços dos profissionais na manutenção de um manejo sanitário rigoroso, o ambiente de zoológico é favorável à disseminação de várias doenças, incluindo-se as zoonoses (FOWLER, 1993). A leptospirose tem re-emergido em diversas regiões do mundo, principalmente em países de clima tropical, como o Brasil, onde se apresenta de forma endêmica (SVS, 2010). Este fato, aliado a grande diversidade biológica deve estimular a realização de estudos sobre a leptospirose em animais selvagens, uma vez que pouco se sabe sobre o papel destes animais na epidemiologia desta enfermidade.

A prevalência de leptospirose encontrada nos mamíferos do PZMQB foi de 5,67%, podendo-se considerá-la baixa ao se comparar a encontrada por outros pesquisadores no Brasil, como de 37,7% no Zoológico do Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2002), 19,5% no Zoológico de São Paulo (CORRÊA et al., 2004a), 45,9% no Criadouro da Itaipu (GUERRA-NETO et al., 2004), de 10,2% no Zoológico Municipal de Uberaba (ESTEVES et al., 2005), 12,5% no Zoológico de Aracaju (PIMENTEL et al., 2009) e 26,5% no Zoológico de Ribeirão Preto (SILVA et al., 2010a). Prevalências de 52% e 25% foram encontradas no Chapultepec Zoo no México (LUNA-ALVAREZ et al., 1996) e no Zoológico Municipal da Coréia (JUNG et al., 2007), respectivamente.

O sorovar de maior ocorrência foi o Icterohaemorrhagiae, encontrado em 25% dos casos, diferente do observado no Zoológico do Rio de Janeiro, onde das 29 amostras positivas, 27 foram para o sorovar Copenhageni e apenas uma para o sorovar Icterohaemorrhagiae, ambos do mesmo sorogrupo (LILENBAUM et al., 2002). Na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, dos 59 animais reagentes, 15 foram positivos para o sorovar Copenhageni, 13 para o Pomona e 10 para o Castellonis (CORRÊA et al., 2004a). Os sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae pertencem ao mesmo sorogrupo, Icterohaemorrhagiae, e são os mais prevalentes em centros urbanos brasileiros (PEREIRA et al., 2000). Os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Andamana foram os mais frequentes no Zoológico Municipal de Uberaba, Minas Gerais (ESTEVES et al., 2005) e os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Panama, assim como o sorovar Patoc (não patogênico) foram os mais frequentes no Zoológico de Ribeirão Preto (SILVA et al., 2010a).

Em todos os estudos houve a participação dos sorovares que tem como reservatórios os roedores, destacando-se a importância do controle de roedores nos parques zoológicos, que em sua maioria estão inseridos em centros urbanos, locais onde os roedores estão abundantemente disseminados.

Dentre as amostras provenientes de 43 espécies de mamíferos analisadas no PZMQB, nove (20,45%) apresentaram algum espécime positivo para um ou mais dos sorovares de leptospira testados.

Dois macacos aranha da testa branca, três macacos aranha da testa vermelha (*Ateles paniscus paniscus*), um macaco japonês (*Macaca fuscata*) e um babuíno chacma (*Papio ursinus*) foram positivos dentre as 18 espécies de primatas do Zoológico do Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2002), semelhante ao resultado do presente estudo, pois das 14 espécies de primatas não-humanos analisadas, quatro delas foram positivas: bugio preto, macaco aranha da testa branca, monocarvoeiro, macaco barrigudo e macaco aranha da testa branca. No estudo realizado no Zoológico Municipal de Uberaba, MG, nenhum dos primatas das três espécies analisadas mostrou-se positivo (ESTEVES et al., 2005). No Zoológico de Sergipe, um dos 14 macacos-prego (*Cebus libinosus*) e um dos quatro macacos-prego-do-peito-amarelo (*Cebus xanthosternus*) foi positivo (PIMENTEL et al., 2009).

São variáveis os resultados da soroprevalência entre os diferentes parques zoológicos, bem como entre as diferentes espécies de animais das coleções de cada um deles, mesmo sendo da mesma espécie ou espécimes. A múltipla etiologia das leptospiroses, o papel desempenhado pelos reservatórios, bem como pelo ambiente, contribui para tal fato, tornando os estudos soroepidemiológicos importantes para se entender a etioepidemiologia das leptospiroses.

Apenas um espécime de lobo guará dos dois analisados reagiu para o sorovar Canicola no PZMQB, sendo que outras amostras pareadas analisadas durante o período de estudo mostraram-se negativas, indicando apenas contato com leptospiroses, provavelmente a partir do ambiente. No Zoológico Municipal de Uberaba, MG, o único exemplar de lobo guará examinado reagiu para o sorovar Grippotyphosa (ESTEVES et al., 2005) e três de quatro lobos

guará do Zoológico do Rio de Janeiro foram positivos (LILENBAUM et al., 2002).

Dois dos 10 cachorros-do-mato testados no PZMQB foram positivos para o sorovar Sentot, quatro entre cinco no Zoológico do Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2002), um de dois do Zoológico Municipal de Uberaba, MG, para o sorovar *Gryppotyphosa* (ESTEVES et al., 2005) e o único exemplar do Zoológico de Sergipe para o sorovar *Copenhageni* (PIMENTEL et al., 2009).

Entre os cinco quatis do PZMQB, dois foram positivos, um para o sorovar *Canicola* e outro para o *Copenhageni*, semelhante ao encontrado no Zoológico do Rio de Janeiro, onde três de sete foram positivos (LILENBAUM et al., 2002). Em pesquisa realizada com quatis de cativeiro encontrou-se oito entre 13 quatis provenientes de Sorocaba e em um animal de São José dos Campos positivos sendo os sorovares *Wolfii*, *Copenhageni* e *Shermani* os mais encontrados nos animais provenientes de Sorocaba e o sorovar *Pyrogenes* no animal de São José dos Campos. Três animais provenientes de Botucatu mostraram-se negativos (LANGONI et al., 2009). Dos dois quatis analisados, no zoológico de Sergipe, ambos foram negativos (PIMENTEL et al., 2009).

Um dos quatro gatos mourisco do PZMQB foi positivo. Felídeos foram examinados sorologicamente contra leptospirose no Zoológico do Rio de Janeiro após a ocorrência de um caso de leptospirose em uma suçuarana, e um dos dois gatos mouriscos foi reagente (LILENBAUM et al., 2004). O estudo realizado com 359 felídeos neotropicais de 41 cidades dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, revelou 46 positivos. Entretanto, nenhum espécime de gato mourisco fez parte do estudo (GUERRA-NETO, 2006).

Os felídeos selvagens não são geralmente incluídos na rotina de diagnóstico e prevenção da leptospirose, pois os médicos veterinários acreditam serem eles refratários à doença (LILENBAUM et al., 2004). Porém, os felídeos podem se infectar e soroconverter, apesar de raramente apresentarem a forma clínica da enfermidade (LANGONI et al., 1998). Os felídeos devem ser incluídos no programa de prevenção da leptospirose pela possível manutenção de local apropriado para reservatórios nas proximidades dos recintos, como uma das medidas de controle de roedores.

Destaca-se o resultado sorológico das antas (*Tapirus terrestris*), pois as duas amostras reagentes pertencem ao mesmo animal, coletadas com

intervalo de 2,5 anos. Nenhuma outra anta que habita o mesmo recinto foi positiva, o que indica que o animal positivo não deve servir como reservatório da infecção neste ambiente. Os títulos encontrados na segunda amostra podem ser residuais ou novas exposições ao agente ocorreram entre a obtenção da primeira e segunda amostra de soro. Nos animais domésticos os títulos de anticorpos declinam e muitas vezes desaparecem ao redor de seis meses, e este animal manteve os títulos, apesar de mais baixos, por mais de dois anos. Não há estudos em relação à titulação de anticorpos anti-leptospíricos e a manutenção dos títulos em animais selvagens para se discutir mais profundamente o assunto. No Zoológico do Rio de Janeiro, o único espécime de anta analisado não reagiu aos vários sorovares testados (LILENBAUM et al., 2002).

Além do macaco barrigudo (*Lagothrix lagothrica*), que apresentou título 400 para o sorovar *Icterohaemorrhagiae*, os outros animais do grupo dos primatas e carnívoros reagentes apresentaram títulos baixos o que indica contato com o agente infeccioso, o que se considera normal em um ambiente de cativeiro onde várias espécies de áreas diferentes co-habitam, podendo facilitar a transmissão de agentes infecto-contagiosos entre as espécies mantidas cativas. Este fato mostra a importância das ações de vigilância, incluindo-se a quarentena para animais que serão introduzidos no parque.

Os cervídeos e ouriços que são manejados de forma diferente não tiveram espécimes reagentes o que indica o êxito do controle de animais sinantrópicos como os roedores e gambás no parque zoológico, contribuindo para a menor ocorrência de animais reagentes à leptospirose.

Ao se confrontar os poucos estudos disponíveis na literatura, verifica-se a dificuldade em se avaliar os resultados obtidos por outros autores, pois o número de espécies e espécimes não são constantes nos diferentes locais, e a resposta aos sorovares além de variável, mostra também resultados díspares aos títulos obtidos. Sabe-se que a resposta sorológica não significa necessariamente doença e, muitas vezes, somente contato prévio com o agente infectante. De qualquer forma, os resultados do presente estudo mostram que de alguma forma a infecção ocorreu nestes animais, sem, entretanto, poder-se assegurar a importância destes animais enquanto reservatórios da infecção leptospírica no ambiente. Estes resultados intrigam

para a continuidade de estudos incluindo a pesquisa de DNA bacteriano em excreções como a urina dos animais, o que pode ser impraticável nas condições de animais cativos em zoológicos.

A correlação da análise epidemiológica com os resultados sorológicos obtidos não mostrou diferença estatística significativa, exceto para a presença de animais selvagens sinantrópicos, em recintos onde além de aves, havia primatas de vida livre. Apesar da menor importância das aves na epidemiologia da leptospirose, estudos recentes mostram soropositividade em aves mantidas em cativeiro no Zoológico Municipal de Ribeirão Preto (SILVA et al., 2010a). No entanto, apesar da diferença significativa, acredita-se que houve coincidência do recinto onde foram observados aves e primatas de vida livre, ser o recinto das antas, e apenas uma delas foi positiva para leptospirose.

A SAM é o teste de referência no diagnóstico laboratorial da leptospirose (BRASIL, 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003) e, apesar disso apresenta desvantagens por detectar resposta sorológica, que não diferencia anticorpos resultantes de infecção ou vacinação (ADLER e MOCTEZUMA, 2010) e ainda a fase da doença, além dos níveis de anticorpos serem detectáveis somente entre sete e dez dias após o início da infecção (LUCCHESI et al., 2004).

O isolamento de espiroquetas em amostras biológicas como a urina é complexo pelo crescimento lento, presença de agentes contaminantes, pela fase da doença e pela intermitência da eliminação do agente pela urina (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Assim, embora apenas uma amostra de urina tenha sido cultivada, com resultado negativo, aliando-se baixa prevalência da doença no parque, sugere-se que os animais não devam ser considerados como fontes de infecção no local estudado.

O protocolo utilizado no exame das cinco amostras de urina objetivou diminuir a ação de inibidores da PCR. Devido a este fato obteve-se um número pequeno de amostras, pois a urina tinha de ser processada em até 24 horas e os equipamentos necessários para a realização de parte do procedimento não estavam disponíveis no PZMQB, onde foi realizada a colheita das amostras.

As técnicas moleculares permitem a detecção do ácido nucléico das leptospirosas, além de poder diferenciar entre espécies patogênicas e não patogênicas, de acordo com os *primers* utilizados. Esta é uma grande

vantagem da PCR em relação ao cultivo, que além do longo período de incubação exigido, pode-se concluir somente que a amostra é positiva para espiroquetas, necessitando-se estudos posteriores para a caracterização e isolamento.

Alguns estudos demonstram que pela capacidade de se detectar a doença em estágios distintos, os métodos sorológicos e moleculares podem fornecer resultados discordantes, porém complementares (KEE et al., 1994; KOSITANONT et al., 2007). Desta forma, no presente estudo foram utilizadas a SAM aliada a PCR na tentativa de se melhorar o diagnóstico da leptospirose nos animais selvagens cativos.

Todos os funcionários do PZMQB que participaram da pesquisa foram negativos à infecção leptospírica, resultado igual ao encontrado nas 36 amostras de soro pertencentes aos funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba (ESTEVES et al., 2005) e nos 15 funcionários do Zoológico Municipal de Ribeirão Preto (SILVA et al., 2010a). Este fato assinala para a provável resistência dos animais selvagens, que não devem desempenhar o papel de portadores renais, o que colocaria em risco os servidores que desenvolvem atividades nos recintos onde estes animais estão alojados. Contribui para esta assertiva o fato da pesquisa do DNA de leptospiros ter logrado negativa tanto nas amostras de urina como de tecidos de animais avaliados nesta pesquisa. Entendemos que o número de amostras não é suficiente para esta afirmação, e desta forma acreditamos ser fundamental a pesquisa de portadores renais entre as coleções de animais em parques zoológicos.

Com relação ao questionário epidemiológico aplicado aos servidores do parque zoológico, o rato foi incriminado como o principal transmissor, o que condiz com a literatura (FAINE et al., 1999). O gato, por outro lado, foi assinalado por 12 entrevistados (29,27%), e esta espécie é considerada refratária à leptospirose (LANGONI et al., 1998). Apesar da ampla divulgação sobre a leptospirose pelos meios de comunicação, principalmente na época de maior índice pluviométrico e, conseqüentemente, enchentes, 36,58% dos entrevistados não conhecem os principais sintomas que os fariam suspeitar de leptospirose.

As fezes de gato, fezes de cães e os mosquitos foram assinalados como fatores de risco de infecção por leptospiros por, 19,51%, 12,19% e 12,19% dos

entrevistados, respectivamente. As fezes não são consideradas como via de eliminação importante, contrariamente à urina, que é a principal via de eliminação das leptospiros. A transmissão da leptospirose não ocorre pela picada de mosquitos, diferentemente da dengue, causada por vírus, outra doença amplamente divulgada na mídia, que ocorre em formas de surtos principalmente na época de maior índice pluviométrico, da mesma forma que a leptospirose. Ressalta-se que a maior parte dos servidores entrevistados tem apenas o primeiro grau de escolaridade, fato que pode justificar o menor grau de conhecimento de alguns aspectos referentes à epidemiologia da leptospirose.

Poucos são os estudos sobre leptospirose no ambiente de cativeiro onde o manejo dos animais é menos trabalhoso que a campo e onde se tem a possibilidade de aprimorar as técnicas diagnósticas que poderiam facilitar o estudo da epidemiologia das doenças infecto-contagiosas em animais de vida livre, contribuindo para a medicina da conservação e saúde pública.

Assim, novos estudos devem ser incentivados e conduzidos, tanto com animais de cativeiro como nos de vida livre, não somente em relação à leptospirose, mas também para outras doenças infecto-contagiosas, como sua epidemiologia, avaliação de técnicas e interpretação de resultados, contribuindo para a medicina da conservação.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir:

1. A infecção leptospírica está presente nos animais do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”, porém com baixa soroprevalência.

2. De acordo com a análise molecular a partir de PCR tanto em amostras de urina como em tecidos de animais mantidos em cativeiro e dos sinantrópicos capturados nos recintos, não foi possível estabelecer o estado de portador renal de leptospiros.

3. Os animais selvagens mantidos em cativeiro e os sinantrópicos não representaram risco de infecção para os servidores do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”, pois entre os avaliados nenhum revelou anticorpos anti-leptospiros para todos os sorovares testados.

4. O nível de conhecimento dos funcionários do parque zoológico foi considerado médio de acordo com o questionário aplicado.

*R*eferências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELA-RIDDER, B.; SIKKEMA, R.; HARTSKEER, R.A. Estimating the burden of human leptospirosis. *Intern. J. Antimicrob. Agents*, v.36, s.1, p.S5-S7, 2010.

ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; DE LA CUEVA, H.; GULLAND, F.M.D.; AURIOLES-GAMBOA, D.; ARELLANO-CARBAJAL, F.; SUAREZ-GUEMES. Evidence of *Leptospira interrogans* infection in California sea lion pups from the Gulf of California. *J. Wildl. Dis.*, v.39, n.1, p.145-151, 2003.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.DE LA PEÑA. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, v.140, p.287-296, 2010.

AHMAD, S.N.; SHAH, S.; AHMAD, F.M.H. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J. Postgrad. Med.* v.51, n.3, p.195-200, 2005.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. One health: A new Professional Imperative. One Health Initiative Task Force: Final Report. One Health World – World Health Through Collaboration. 2008. 76p.

BESSA, T.A.F.; SPICHLER, A.; CHAPOLA, E.G.B.; HUSCH, A.C.; ALMEIDA, M.F.; SODRÉ, M.M.; MOURIZ-SAVANI, E.S.M., VEIGA-SACRAMENTO, D.R.; VINETZ, J.M. The contribution of bats to leptospirosis transmission in São Paulo City, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, n.2, p.315-317, 2010.

BHARADWAJ, R. Leptospirosis – a reemerging disease? *Indian J. Med. Res.*, v.120, p.136-138, 2004.

BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICARDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; VINETZ, J.M.; PERU-UNITED STATES CONSORTIUM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet: Infect. Dis.*, v.3, n.12, p.757-771, 2003.

BOURHY, P.; COLLET, L.; CLÉMENT, S.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRY, C.; PETTINELLI, F.; PICARDEAU, M. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.4, n.6, p.e724.

BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de Leptospirose. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98p.

BUNNEL, J.E.; HICE, C.L.; WATTS, D.M.; MONTRUEIL, V.; TESH, R.B.; VINETZ, J.M. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.63, n.5, 6, p.255–258, 2000.

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. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.41, p.189-193, 2004a.

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. 2004. Epidemiologia da leptospirose em felinos silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *In VIII Congresso e XIII Encontro da ABRAVAS*, 2004. Jaboticabal. *Anais do VIII e XIII Encontro da ABRAVAS*, p.15, 2004b.

COX, T.E.; SMYTHE, L.D.; LEUNG, L.K.-P. Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* species. *J. Wildl. Dis.*, v.41, n.4, p.753-757, 2005.

CULLEN, P.A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A.I.; HAAKE, D.A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection Immunity*, v.73, p.4853-4863, 2005.

DAVIS, M.A.; EVERMANN, J.F.; PETERSEN, C.R.; VANDERSHALIE, J.; BESSER, T.E.; HUCKABEE, J.; DANIELS, J.B.; HANCOCK, D.D.; LESLIE, M.; BAER, R. Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington State. *Zoonoses Public Health*, v.55, p.436-442, 2008.

DIAS, J.P.; TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; MENDES, C.M.C.; GUIMARÃES, P.; REIS, M.G.; KO, A.I.; BARRETO, M.L. Factors associated with *Leptospira* sp. infection in a large urban Center in Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.40, n.5, p.499-504, 2007.

ESPÍ, A.; PRIETO, J.M.; ALZAGA, V. Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. *Vet. J.*, v.183, p.226-227, 2010.

ESTEVES, F.M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R.J.da S.; SILVA-VERGARA, M.L.; CARVALHO, A.C. de F.B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.3, p.283-288, 2005.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOEIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2.ed., MedSci, Melbourne, Austrália, 1999.

FARIAS, T. M.; SILVA, L. H. R.; PIMENTEL, T. L. Incidence of leptospirosis in giant otters at the FUNPEB (Brasilia Pole Ecological Foundation - Brazil). Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, 23. The society of Marine Mammology, Wailea, Maui, Hawaii, v.55, 1999.

FISCHER-TENHAGEN, C.; HAMBLIN, C.; QUANDT, S.; FROLICH, K. Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. *J. Wildl. Dis.*, v.36, n.2, p.316-323, 2000.

FOGELBERG, K. e FERRELL, S.T. Vasculitis secondary to presumptive leptospirosis treated with long-term corticosteroids in captive lesser kudu (*Tragelaphus imerbis australis*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v.41, n.3, p.542-544, 2010.

FORNAZARI, F.; CAMOSSO, L.G.; SILVA, R.C.; GUAZELLI, A.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Leptospiral antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis., 2010 (in press).

FOWLER, M.E. (Ed.) Zoo & wild animal medicine. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. 617p.

FREITAS, T.P.T.; KEUROGHLIAN, A.; EATON, D.P.; FREITAS, E.B.; FIGUEIREDO, A.; NAKAZATO, L.; OLIVEIRA, J.M.; MIRANDA F.; PAES, R.C.S.; MONTEIRO, L.A.R.C.; LIMA, J.V.B.; NETO, A.A.C.; DUTRA, V.; FREITAS, J.C. Prevalence of *Leptospira interrogans* antibodies in free-ranging *Tayassu pecari* of the Southern Pantanal, Brazil, an ecosystem where wildlife and cattle interact. Trop. Anim. Health Prod., v.42, p.1695-1703, 2010.

GOUVEIA, E.L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A.L.F.; AIRES, T.S.F.; VILLALOBOS-BISNETO, J.C.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO, K.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhage syndrome, Salvador, Brazil. Emerg. Infect. Dis., v.14, p.505–508, 2008.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G.J.; VAN EYS, G.J.; EVERARD, C.O.; HARTSKEERL, R.A.; TERPSTRA, W.J.. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol. v. 139, n. 8, p.1691-1700, 1993.

GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R.J.S.; ANDRADE, T.M.; KOPROSKI, L.P.; MORAES, W.; SANTOS, L.C. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais pertencentes ao Criadouro de Animais Silvestres a Itaipu Binacional e ao zoológico municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, Estado do Paraná. ARS Veterinária. v.20, p.75-80, 2004.

GUERRA-NETO, G. Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil. Dissertação de Mestrado –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, *Campus* de Jaboticabal. 2006, 62p.

HODGIN, C.; SCHILLORN, W.T.; FAYER, R.; RICHTER, N. Leptospirosis and coccidial infection in a guanaco. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.185, p.1442-1444, 1984.

JANSEN, A.; SCHÖNEBERG, I.; FRANK, C.; ALPERS, K.; SCHNEIDER, T.; STARK, K. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, p.1048-1054, 2005.

JANSEN, A.; LUGE, E.; GUERRA, B.; WITTSCHEN, P.; GRUBER, A.D.; LODDENKEMPER, C.; SCHNEIDER, T.; LIERZ, M.; EHLERT, D.; APPEL B.; STARK, K.; NÖCKLER, K. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, v.13, n.5, p.739-742, 2007.

JARDINE, C.; LINDSAY, L.R.; NICHOLSON, V.M.; OJKIC, D.; PRESCOTT, J.F. Longitudinal study on the seroprevalence of Avian Influenza, Leptospirosis, and Tularemia in an urban population of raccoons (*Procyon lotor*) in Ontario, Canada. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, v.10, p.1-6, 2010.

JUNG, B.Y.; CHOI, J.S.; KIM, K.T.; SONG, Y.K.; LEE, S.H.; LEE, K.W.; KIM, J.Y.; MOON, O.K. Seroprevalence of Leptospirosis in Korean Municipal Zoo Animals. *J. Vet. Med. Sci.* v.69, n.8, p.861-867, 2007.

JUNGE, R.E.; BAUMAN, K.; KING, M.; GOMPPER, M.E. A serologic assessment of exposure to viral pathogens and *Leptospira* in an urban raccoon (*Procyon lotor*) population inhabiting a large zoological park. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.38, n.1, p.18-26, 2007.

KEE, S.H.; KIM, I.S.; CHOI, M.S.; CHANG, W.H. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Ver. Microbiol.*, v.7, p.736-747, 2009.

KOIZUMI, N.; MUTO, M.; YAMADA, A.; WATANABE, H. Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v.71, n.6, p.797-799, 2009.

KOSITANONT, U.; RUGSASUK, S.; LEELAPORN, A.; PHULSUKSOMBATI, D. TANTITANAWAT, S.; NAIGOWIT, P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.* v. 57, n. 2, p. 117-122, 2007.

LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; KRONFLY, C.S. Pesquisa de aglutininas anti-leptospíricas em gatos. *Clin. Vet.*, n.17, p.20-28, 1998.

LANGONI, H.; KAWAGUCHI, M.F.; OSHIKA, J.C.; DA SILVA, R.C.; TEIXEIRA, C.R. *Leptospira* spp. antibodies in captive coatis (*Nasua nasua* Storr, 1780) (Carnivora: Procyonidae). *J. Venom. Anim. Toxins Inclu. Trop. Dis.*, v.15, n.4, p.762-767, 2009.

LAU, C.L.; SMYTHE, L.D.; CRAIG, S.B.; WEINSTEIN, P. Climate change, flooding, urbanization and leptospirosis: fuelling the fire? *Transact Royal Soc Trop Med Hyg.*, v.104, p.631-638, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington D. C., v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LILENBAUM, W.; MONTEIRO, R.V.; RISTOW, P.; FRAGUAS, P.; CARDOSO, V.S.; FEDULLO, L.P.L. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Res. Vet. Sci.*, v.73, p.319-321, 2002.

LILENBAUM, W.; MONTEIRO, R.V.; ALBUQUERQUE, C.E.; RISTOW P. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Vet. J.*, v.168, p.191-193, 2004.

LLOYD-SMITH, J.O.; GREIG, D.J.; HIETA, S.; GHNEIM, G.S.; PALMER, L.; LEGER, J.S.; GRENFELL, B.T.; GULLAND, F.M.D. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease is one host species? *BMC Infect. Dis.*, v.7, p.125, 2007.

LOEWENSTEIN, L.; MCLAGHLAN-TROUP, T.; HARTLEY, M.; ENGLISH, A. Serological survey for evidence of *Leptospira interrogans* in free-living platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*). *Aust. Vet. J.*, v.86, p.242-245, 2008.

LUCCHESI, P.M.A.; ARROYO, G.H.; ETCHEVERRÍA, A.I.; PARMA, A.E.; SEIJO, A.C. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v.37, n.2, p.131-134, 2004.

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 México*. v.27, n.3, p.229-34, 1996.

MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; FERREIRA, P.M.; MORAIS, Z.M.; MORENO, A.M.; DOTO, D.S.; PAIXÃO, R.; BACCARO, M.R.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA-NETO J.S. Experimental leptospirosis in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) infected with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.40, n.4, p.726-730, 2009.

MATHIAS, L.A.; GIRIO, R.J.S.; DUARTE, J.M.B. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas deer from Brazil. *J. Wildl. Dis.*, v.35, n.1, p.112-114, 1999.

McBRIDE, A.J.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. Leptospirosis. *Curr Opin. Infect. Dis.*, v.18, p.376–386, 2005.

MÉRIEN, F., AMOURIAUX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G., SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* v.30, p.2219–2224, 1992.

MILLÁN, J.; CANDELA, M.G.; LÓPEZ-BAO, J.V.; PEREIRA, M.; JIMÉNEZ, M.A.; LEÓN-VISCAÍNO, L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural áreas in Andalusia, Spain. *Vector-Borne Zoonot. Dis.*, v.9, n.5, p.549-554, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2009. SINAN/SVS/MS. 2010.

NORMAN, S.A.; DiGIACOMO, R.F.; GULLAND, F.M.D.; MESCHKE, J.S.; LOWRY, M.S. Risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) in California, 2004. *J. Wildl. Dis.*, v.44, n.4, p.837-844, 2008.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DÉS EPIZOOTIES. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Lists A and B diseases of mammals, birds and bees. 3ed. Paris: 1996. p.98-206.

PALANIAPPAN, R.U.M.; CHANG, Y.F.; CHANG, C.F.; PAN-M.J.; YANG, C.W.; HARPEDING, P.; McDONOUGH, S.P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of *lig*-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol. Cell. Probes.* v.19, p.111-117, 2005.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Inter. J. Infect. Dis.* v.12, p.351-357, 2008.

PEREIRA, M.M.; MATSUO, M.G.S.; BAUAB, A.R., VASCONCELOS, S.A.; MORAES, Z.M.; BARANTON, G.; GIRONS, I. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, p.450-452, 2000.

PIMENTEL, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; MARVULO, M.F.V.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; SILVA, J.C.R.; NETO, J.E. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesq. Vet. Bras.*, v.29, n.12, p.1009-1014, 2009.

RICHARDSON, D.J.; GAUTHIER, J.L. A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. *Vector-borne Zoonot. Dis.*, v.3, n.4, p.187-193, 2003.

RIEDIGER, I.N. Comparação dos diagnósticos sorológico e molecular da leptospirose humana na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Dissertação apresentada à obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2007.

ROBERTS, M.W.; SMYTHE, L.; DOHNT, M.; SYMONDS, M.; SLACK, A. Serologic-based investigation of leptospirosis in a population of free-ranging Eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) indicating the presence of *Leptospira weilii* serovar Topaz. *J. Wildl. Dis.*, v.46, n.2, p.563-569, 2010.

ROE, W.D.; ROGERS, L.E.; GARTRELL, B.D.; CHILVERS B.L.; DUIGNAN, P.J. Serologic evaluation of New Zealand sea lions for exposure to *Brucella* and *Leptospira* spp. *J. Wildl. Med.*, v.46, n.4, p.1295-1299, 2010.

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. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. Revista de Microbiologia, v.1, n.2, p.97-109, 1970.

SENIOR, K. Climate change and infectious disease: a dangerous liaison. Lancet Infect. Dis., v.2, p.92-93, 2008.

SHARMA, S.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SEHGAL, S.C. Leptospiral carrier state and seroprevalence among animal population – a cross-sectional sample survey in Andamana and Nicobar Islands. Epidemiol. Infect., v.131, p.985-989, 2003.

SHIVE, R. J.; GREEN, S. S.; EVANS, B. S.; GARNER, F. M. Leptospirosis in barbary apes. J. Am. Vet. Med. Assoc. v.155, n.7, p.1776-1778, 1969.

SILVA, R.C.; ZETUN, C.B.; BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E.; ROSA, P.S.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. Vet. Par., n.157, p.291-293, 2008.

SILVA, C.S.; GÍRIO, R.J.J.; GUERRA-NETO, G.; BRICH, M.; SANTANA, L.A.S.; AMÂNCIO, F.H.; MARIANI, J.R.; WESSORT, P.M.F. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil. Braz. J. Vet. Anim. Sci., v.47, n.3, p.237-242, 2010a.

SILVA, F.J.; MATHIAS, L.A.; MAGAJEVSKI, F.S.; WERTHER, K.; ASSIS, N.A.; GIRIO, R.J.S. Anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais domésticos e silvestres presentes no Campus Universitário da FCAV, UNESP, Jaboticabal/SP. ARS Vet., v.26, n.1, p.17-25, 2010b.

SLAVICA, A.; KONJEVIC, D.; HUBER, D.; MILAS, Z.; TURK, N.; SINDICIC, M.; SEVERIN, K.; DEZDEK, D.; MASEK, T. Serologic evidence of *Leptospira* spp. serovars in brown bears (*Ursus arctos*) from Croatia. J. Wildl. Dis., v.46, n.1, p.251-256, 2010.

SMYTHE, L.D.; SMITH, I.L.; SMITH, G.A.; DOHNT, M.F.; SYMONDS, M.L.; BARNETT, L.J.; MCKAY, D.B. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect. Dis. v.2, 2002.

STODARD, R.A.; GEE, J.E.; WILKINS, P.P.; McCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v.64, p.247-255, 2009.

SVS. Leptospirose. Guia de Vigilância em Saúde – Caderno 8. Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. 2010.

SWAPNA, R.N.; TUTEJA, U.; NAIR, L.; SUDARSANA, J. Seroprevalence of leptospirosis in high risk groups in Calicut, North Kerala, India. Indian J. Medical Microbiol., v.24, n.4, 2006.

SZONYI, B.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; RAMÍREZ, M.; MORENO, N.; KO, A.I. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. Vet. Journal. 2010 (no prelo).

TASSINARI, W.S.; PELLEGRINI, D.C.P.; SÁ, C.B.P.; REIS, R.B.; KO, A.I.; CARVALHO, M.S. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. Trop. Med. Internat. Health. V.13, n.4, p.503-512, 2008.

THE WORLD ZOO ORGANIZATION – IUDZG. THE CAPTIVE BREEDING SPECIALIST GROUP (IUCN/SSC). The world zoo conservation strategy – The role of the zoos and aquaria of the world in global conservation. Illinois: Chicago Zoological Society, 1993. 79p.

TRIOLA, M.F. Introdução à estatística. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC. 2005, 682p.

ULLMANN, L.S.; HOFFMANN, J.; MORES, W.; CUBAS, Z.S.; SANTOS, L.C.; SILVA, R.C.; CAMOSSO, L.G.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A.M.S.; MONTAÑO, P.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W. Prevalence of *Leptospira*

interrogans antibodies in captive wildcats of Southwestern Brazil. In: XXXI Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil, XIV Congresso da Associação Latinoamericana de Parques Zoológicos e Aquários e do XVI Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, São Paulo, 2007.

VAN EYS, G.J.; GRAVEKAMP, C.; GERRISTSEN, M.J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M.T.; SCHEGGET, J.T.; TERPSTRA, W.J. Detection of leptospires in urine by polimerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. v. 27, n. 10, p. 2258-2262, 1989.

VASHI, N.A.; REDDY, P.; WAYNE, D.B.; SABIN, B. Bat-associated leptospirosis. J. Gen. Intern. Med., v.25, n.2, p.162-164, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta, 2003.

ZETUN, C.B.; HOFFMANN, J.L.; SILVA, R.C.; LANGONI, H. *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis., v.15, n.3, p.546-552, 2009.

ZUERNER, R.L.; CAMERON, C.E.; RAVERTY, S.; ROBINSON, J.; COLEGROVE K.M.; NORMAN, S.A.; LAMBOURN, D.; JEFFRIES, S.; ALT, D.P.; GULLAND, F. Geographical dissemination of *Leptospira interrogans* serovar Pomona during seasonal migration of California sea lions. Vet. Microbio., v.137, p.105-110, 2009.

Artigo científico

1 **9. ARTIGO CIENTÍFICO**
2

3 O artigo está de acordo com as normas da revista "Research in Veterinary Science".
4

5 **Epidemiological survey of leptospirosis in captive and synantropic mammals**
6 **at a City Zoo of Southeastern Brazil**
7

8 ULLMANN, L.S.^a; DIAS NETO, R. N.^b; TEIXEIRA, R.H.F.^b; NUNES, A.L.V.^b; SILVA,
9 R.C.^a, PEREIRA-RICHINI, V.B.^a; LANGONI, H^a
10

11 ^a Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina
12 Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista – UNESP, *Campus*
13 de Botucatu, São Paulo, Brazil.

14 ^b Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros", Sorocaba, São Paulo, Brazil.
15

16 **Abstract**

17 Leptospirosis is considered a wide worldwide zoonosis, caused by leptospira spp.
18 bacterium. Many wild animals are reservoir for leptospirosis. The aim of the present
19 study was to know the epidemiology of leptospirosis at the Sorocaba Zoo, Sorocaba-
20 SP, Brazil. Serum from wild mammals kept in captive and zoological staff was
21 analyzed by microscopic agglutination test. Whole blood, urine and tissue samples

22 from wild mammals and synantropic animals were analyzed by polymerase chain
23 reaction. An epidemiological inquiry to verify risk factors of infection and other to zoo
24 staff to evaluate the level of leptospirosis knowledge were applied. Out of 229 serum
25 samples from wild mammals analyzed, 13 (5.64%) revealed antibody against
26 leptospirosis. Molecular analysis with animals samples, and serology from staff were
27 all negative. Results indicate that the leptospiral infection occurs at the PZMQB but
28 wild animals probably do not act as reservoir and source of infection of leptospirosis
29 to other animals and humans.

30 **Key words:** wild animals, leptospirosis, MAT, zoonosis.

31

32 **Introduction**

33 About 75% of emerging infectious diseases in humans are zoonosis. The
34 raise of human-animal and its products interdependence might be the most critical
35 risk factor to human health and well-being in relation to infectious diseases
36 (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2008). Parallel to ecological
37 alterations caused by human in the environment there is the exponential increase of
38 the conflict human x wild animal taking to exposition to new infectious agents
39 (AGUIRRE and TABOR, 2008).

40 Leptospirosis is considered a wide worldwide zoonosis, present in all
41 continents, except Antarctic (ADLER and MOCTEZUMA, 2010) highlighting among
42 emerging and re-emerging diseases (LANGONI, 1999; BHARADWAJ, 2004). More
43 than 500 thousand cases of severe leptospirosis are reported annually (BOURHY et
44 al., 2010).

45 The disease is caused by *Spirochetales* order bacterium, *Leptospiraceae*
46 family, *Leptospira* gender (LEVETT, 2001). In 2007, taxonomy was reformulated and
47 leptospiras species were divided into 13 pathogenic species (*L. alexanderi*, *L.*
48 *alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L.*
49 *licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. wielli* e *L. wolffii*) and six
50 saprophytic (*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L.*
51 *wolbachii*) (ADLER and MOCTEZUMA, 2010).

52 Pathogenic species are classified in serogroup composed of more than 200
53 serovars, based on antigenic characteristics through microscopic agglutination.
54 Serotyping has been recognized as an essential tool in clinic and epidemiological
55 investigations and it can indicate the reservoir involved in the disease transmission
56 (KO et al., 2009).

57 Leptospirosis can be transmitted directly through the contact with secretions,
58 blood or urine of infected animals or indirectly through the contact with water
59 contaminated mainly with urine of carriers (BHARTI et al., 2003). Many domestic and
60 wild animals get infected becoming renal carriers and potential shedders of the agent
61 in the environment by the urine (SHARMA et al., 2003). Evidence of the state of
62 *Leptospira* spp. renal carrier has been demonstrated in all researched mammals,
63 and this fact is a central component on the persistence and epidemiology of
64 leptospirosis (ADLER and MOCTEZUMA, 2010).

65 Although some serovars are associated to a determined serovar, all animals
66 are susceptible to infection by any serovar (BHARTI et al., 2003). Wild animals are
67 susceptible to a range variety of serovars of *Leptospira* spp. (FAINE et al., 1999;

68 ULLMANN et al., 2007; SILVA et al., 2008; ZETUN et al., 2009; LANGONI et al.,
69 2009; FORNAZARI et al., 2010).

70 Leptospirosis diagnosis is complex and can be done directly through
71 visualization under dark field microscopy, isolation in culture medium or biological
72 models, staining and molecular techniques, and indirectly by serologic tests as
73 microscopic agglutination test (MAT), considered the gold standard test and
74 immunoenzymatic test (ELISA) (FAINE et al., 1999).

75 There are 127 zoo parks in Brazil with 32 in São Paulo State. Besides
76 conservationist role, they assume importance in environmental and education and
77 the knowledge of the native and exotic species.

78 Captive environment allows improving diagnosis techniques and they are
79 important source of information due to the wide species variety and the facilities on
80 animal handling comparing to field studies. Infectious diseases studies, especially
81 zoonotic ones must be performed in captive to know the epidemiology of these
82 diseases in such places improving control and prevention measures.

83 Almost all young mammals and marsupials are susceptible to leptospirosis.
84 Leptospiral seroprevalence studies were performed in some zoos in Brazil including
85 Rio de Janeiro Zoo (LILENBAUM et al., 2002), São Paulo Zoo Park Foundation
86 (CORRÊA et al., 2004a), Bela Vista Sanctuary (GUERRA-NETO et al., 2004),
87 Uberaba Zoo (ESTEVES et al., 2005), Aracaju Zoo (PIMENTEL et al., 2009),
88 Ribeirão Preto Zoo (SILVA et al., 2010) and at Korean Municipal Zoo (JUNG et al.,
89 2007) and Chapultec Zoo (LUNA-ALVAREZ et al., 1996).

90 Only one experimental study was performed with capybaras (*Hydrochaeris*
91 *hydrochaeris*) revealing this rodent as reservoir of leptospire (MARVULO et al.,
92 2009).

93 The aim of the present study was to evaluate the situation of leptospirosis at
94 the “Quinzinho de Barros” Municipal Zoo Park, known as Sorocaba Zoo, analyzing
95 serum, blood, urine and tissues samples from captive mammals and synantropic
96 animals caught at the park through different diagnosis methods. Besides anti-
97 *Leptospira* spp. antibodies were researched in samples from zoo staff and an
98 epidemiological inquiry was performed to evaluate infection risk factors.

99

100 **Material and Methods**

101 Sampling was performed during veterinary routine at Sorocaba Zoo,
102 Sorocaba, São Paulo State, in the period from 2007 to August 2010 totalizing 229
103 serum samples from 43 species of captive mammals, 35 total blood samples from 15
104 species of captive mammals, five urine samples from four species of captive
105 mammals and tissue samples from four wild animals that died at the zoo. Thirty
106 serum samples from zoo staff were also collected and tested against the presence of
107 antibodies to *Leptospira* spp.

108 Blood samples were collected by venipuncture (jugular or femoral vein),
109 centrifuged at 1600 G for 10 minutes, and the sera were kept at -20°C until
110 serological tests were performed. Urine samples were collected by cystocentesis
111 and immediately 0,5mL were inoculated in dilution solution with antimicrobial, at
112 proportion 1:5 and 0,5mL of this suspension was diluted in 4,5mL (10^{-1}) of buffered

113 solution pH7.2 and serial dilutions were made until 10^{-5} and 0,5mL of the three last
114 dilutions were inoculated in Fletcher semisolid medium. Tubes were evaluated
115 macroscopically to verify the presence of Dinger ring and microscopically to verify
116 the presence of spirochaetes weekly for two months. Still, 0,5mL were neutralized
117 with buffered saline pH7.2 at proportion 1:1 in microtube. Samples were kept at 4°C
118 until being centrifuged at 11000g for 5 minutes to eliminate residuals, and then,
119 were resuspended in RNAsis and DNAsis free microtube kept at -80°C until DNA
120 extraction be performed.

121 Extraction of blood and urine samples were performed using kit Illustra blood
122 genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and from tissue
123 samples kit Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare,
124 Buckinghamshire, UK) was used. To DNA amplification specific primers to a
125 fragment of *lipL32* gene from pathogenic species genome (STTODARD et al.,
126 2009) were used and their nucleotidic sequences were: LipL32-45F
127 AAGCATTACCGCTTGTGGTG; LipL32-286R GAACTCCCATTTTCAGCGATT.

128 Amplification were made in MasterCycler gradient (Eppendorf). Final volume
129 of reaction was 25 µL. Reaction mix was included 50 mM of KCl, 10 mM of Tris-HCl
130 (pH 8,0), 1.5 mM of MgCl₂, 1 µM of each primer (LipL32-45F e LipL32-286R), 200
131 µM of each dNTP (dATP, dTTP, dCTP and dGTP) and 1 U of *Taq Platinum* DNA
132 Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Mix volume was corrected with ultra-
133 pure water to a final volume of 23 µL and then 2 µL of extracted DNA (10ng) was
134 added. The first cycle was denaturation at 94°C for 3 minutes, primers annealing at a
135 63°C for 1minute and extension at 72°C for 2 minutes. The 30 following cycles were:
136 denaturation at 94°C for 1 minute, primers annealing at 63°C by 1minute and

137 extension at 72 °C for 2 minutes. One final step at 72 °C for 10 minutes resulted in full
138 primers extension. This reaction generated PCR products of 285bp. All reactions
139 were followed by negative and positive controls. Eletroforesis was performed to
140 identify positive and negative samples.

141 Leptospirosis serology was performed using the gold-standard serological test
142 microscopic agglutination test (MAT) using 29 live antigens for antibody detection.
143 Antigens were maintained in EMJH (Ellinghausen-MacCullough-Johnson-Harris)
144 medium supplemented with filtered and inactivated rabbit serum and used in about
145 14 days of culture. It was considered reagent samples with titer equal or superior to
146 100.

147 An epidemiological inquiry was performed to evaluate the risk factors of
148 infection including characteristics as animal origin (free-ranging or captive), gender,
149 age, presence of domestic and synantropic animals in cages and kind and
150 availability of feeding. The association between epidemiological variables and
151 serological results were analyzed by Chi-square and Fischer`s exact tests,
152 considering $\alpha = 0,05$ (TRIOLA, 2005). All tests were performed in EpiInfoTM v.3.5.1
153 program.

154

155 **Results**

156 Out of 229 serum samples from 43 mammals species kept in captive at
157 Sorocaba Zoo, 13 (5.67%) were positive to one or more leptospire serovars, with
158 titer ranging from 100 to 1600 IU, considering as cut-off titer 100. Positive animals
159 with their respective serovars and titers, as the number of specimens by species are

160 in Table 1. Some of animals had more than one sample and they were included in
161 the study.

162 Out of 14 non-human primates species analyzed, individuals from four
163 species were reagent including: one adult, free-ranging black howler monkey; two
164 white faced spider monkey, one female and other male, both adult and free-ranging;
165 one male, free-ranging Woolly spider monkey, serologically positive to serovar
166 Bratislava in 2007, and after 2.5 years, in 2009, was negative; and one male,
167 juvenile Woolly monkey.

168 Among carnivores, one female, adult, free-ranging crab-eating fox had titer
169 200 to serovar Sentot and after two months titer to the same serovar was 100; one
170 adult, female, free-ranging maned wolf had titer 100 to serovar Canicola, one male,
171 adult, born in captive coati had titer 100 to serovar Canicola and other male, adult,
172 free-ranging coati had titer 100 to serovar Copenhageni; and one female, adult, free-
173 ranging jaguarundi had titer 100 to serovar Sentot.

174 Among Peryssodactyla, one female, adult, captive born tapir showed titer
175 1600 to Pomona and Icterohaemorrhagiae serovars in 2007 sampling and in paired
176 serology performed in 2009, titers to the same serovars were 100 and 400,
177 respectively.

178 Whole blood, urine and tissue samples submitted to PCR were negative to
179 leptospire. The same way the only urine sample cultivated in Fletcher medium was
180 negative.

181 Antibodies against *Leptospira* spp. research in zoo staff serum samples were
182 negative to all tested serovars. This staff plays different kind of work at the zoo

183 including cleaning and general services, keepers from different park sections,
184 biologists, veterinary doctors and a municipal police.

185 The level of knowledge of leptospirosis was evaluated by an inquiry applied to
186 41 of them and it can be considered medium. They answered questions related to
187 etiological agent that causes the disease, transmission way, reservoir concept,
188 human and animal vaccine availability, symptomatology and risk factors to infection.

189

190 **Discussion**

191 Although professional efforts to keep a rigorous health management
192 zoological environment is propitious to many agents spread including zoonotic ones
193 (FOWLER, 1993). Leptospirosis has re-emerged in many world regions mainly in
194 tropical countries, as Brazil. This fact added the high Brazilian biological diversity
195 must encourage studies about leptospirosis in wild animals, once few is known
196 about the role of these animals in the epidemiology of this disease.

197 Leptospirosis prevalence in mammals from Sorocaba Zoo was 5.67%
198 considered low when compared to those found in other Brazilian zoological parks as
199 37.7% at the Rio de Janeiro Zoo (LILENBAUM et al., 2002), 19.5% at the São Paulo
200 Zoo (CORRÊA et al., 2004), 49.5% at Bela Vista Sanctuary (GUERRA-NETO et al.,
201 2004), 10.2% at the Uberaba Zoo (ESTEVEZ et al., 2005), 12.5 at the Aracaju Zoo
202 (PIMENTEL et al., 2009) and 26.5% at the Ribeirão Preto Zoo (SILVA et al., 2010a).
203 Prevalences of 52% and 25% were found at the Chapultepec Zoo in Mexico (LUNA-
204 ALVAREZ et al., 1996) and at the Korean Municipal Zoo (JUNG et al., 2007),
205 respectively.

206 The most common serovar was *Icterohaemorrhagiae*, found in 25% of the
207 seropositive animals, different from observed at the Rio de Janeiro Zoo, where from
208 29 positive samples, 27 reacted to serovar *Copenhageni* and only one to serovar
209 *Icterohaemorrhagiae*, both from the same serogroup (LILENBAUM et al., 2002). At
210 the São Paulo Zoo, from 59 positive animals, 15 reacted to serovar *Copenhageni*, 13
211 to *Pomona* and 10 to *Castellonis* (CORRÊA et al., 2004). *Copenhageni* and
212 *Icterohaemorrhagiae* serovars belong to the same serogroup, *Icterohaemorrhagiae*,
213 and they are the most prevalent serovars in Brazilian urban centers (PEREIRA et al.,
214 2000). *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* and *Andamana* serovars were the most
215 frequent at Uberaba Zoo (ESTEVEES et al., 2005) and *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*
216 and *Panama*, as well as *Patoc* (non pathogenic) serovars were the most frequent at
217 Ribeirão Preto Zoo (SILVA et al., 2010). In all studies there were reagent animals to
218 serovars that have rodents as reservoirs, highlighting the importance of rodent
219 control in zoo parks, inserted mostly in urban centers, where rodents are abundantly
220 spread.

221 Among samples from 43 mammal species analyzed at the Sorocaba Zoo,
222 nine (20.45%) showed some positive specimen to one or more leptospire serovars
223 tested. Specimens from four of 18 non-human primate species were positive at the
224 Rio de Janeiro Zoo (LILENBAUM et al., 2002), similar to the present study results
225 where specimens of four out of 14 species analyzed were positive. In the study
226 performed at the Uberaba Zoo, none out of three species analyzed was positive
227 (ESTEVEES et al., 2005). At the Sergipe Zoo, specimens from two species were
228 positive (PIMENTEL et al., 2009).

229 Seroprevalence results are variable among different zoological parks, as well
230 as among different animal species of zoo squad, even from the same species or
231 specimen. The multiple etiology of leptospirosis, the reservoirs role and environment
232 contributes to that making seroepidemiological studies important to understand the
233 etioepidemiology of leptospirosis.

234 Only one specimen of maned wolf out of two analyzed were positive to
235 *Canicola* serovar at the Sorocaba Zoo and other paired samples analyzed during the
236 period of study were negative, only indicating contact with leptospires, probably from
237 the environment. At the Uberaba Zoo, the unique maned wolf analyzed was positive
238 to *Grippothyphosa* serovar (ESTEVEES et al., 2005) and three out of four specimens
239 analyzed at the Rio de Janeiro Zoo were positive (LILENBAUM et al., 2002).

240 Two out of 10 crab-eating foxes were seropositive to *Sentot* serovar from
241 PZMQB, 4/5 from Rio de Janeiro Zoo (LILENBAUM et al., 2002), 1/2 to
242 *Gryppotyphosa* serovar from Uberaba Zoo (ESTEVEES et al., 2005) and the unique
243 specimen from Sergipe Zoo was positive to *Copenhageni* serovar (PIMENTEL et al.,
244 2009).

245 Two of five coatis from Sorocaba Zoo were positive, similar to Rio de Janeiro
246 Zoo results, where 3/7 was positive (ESTEVEES et al., 2005) and different from two
247 negative coatis at the Sergipe Zoo (PIMENTEL et al., 2009).

248 One of four jaguarundis from Sorocaba Zoo was positive. Felids were
249 serologically analyzed against *Leptospira* spp. antibodies at the Rio de Janeiro Zoo
250 after the occurrence of one clinical case in a puma (*Puma concolor*), and 1/2
251 jaguarundi was positive (LILENBAUM et al., 2004). The performed study with 359

252 felids from 41 cities from São Paulo, Minas Gerais and Rio de Janeiro states showed
253 46 positives. However none jaguarundi was analyzed (GUERRA-NETO, 2006).

254 Wild felids usually are not included at the diagnosis and prevent routine of
255 leptospirosis because veterinary doctors assume they are refractory (LILENBAUM et
256 al., 2004). Nevertheless felids can be infected and seroconvert besides they rarely
257 show clinical form of the disease (LANGONI et al., 1998).

258 Serological results found in tapirs must be highlighted because the positive
259 samples belong to the same animal, collected in an interval of 2.5 years. None tapir
260 that inhabit the same enclosure was positive what indicates that the positive animal
261 must not act as reservoir in this environment. Titers found in the second sample can
262 be residual or new expositions to the agent occurred among the obtaining the first
263 and second sample. In domestic animals antibodies titers decrease and many times
264 disappear around six months, and this animal kept titer, although in lower levels for
265 more than two years. There is no study in relation to anti-leptospiric antibodies
266 titration and titers maintenance in wild animals to a deeply discussion. At the Rio de
267 Janeiro Zoo the unique tapir specimen analyzed was negative to tested serovars
268 (LILENBAUM et al., 2002).

269 Besides the Woolly monkey that had titer 400 to *Icterohaemorrhagiae* serovar,
270 other non-human primates and carnivores analyzed showed low titers what indicates
271 contact with infectious agent, considered normal in captive environment where many
272 species from different areas cohabituate facilitating infectious diseases transmission
273 among captive animals. This evidences the importance of surveillance actions
274 including quarantine to animals that will be introduced at the park.

275 Epidemiological analysis correlation with serological obtained results was not
276 statistically significant with exception to synantropic wild animals in the enclosures,
277 where free-ranging birds and non-human primates were seen. Besides the few bird
278 importance to leptospirosis, recent studies demonstrate seropositivity in birds kept in
279 captive at the Ribeirão Preto Zoo (SILVA et al., 2010). However besides the
280 significant statistic difference authors believe that there was a coincidence.

281 Spiroquete isolation from urine is complex by the low growing, presence of
282 contaminant agents, disease phase and due to the intermittence of leptospire
283 shedding (ADLER and MOCTEZUMA, 2010). Although only one urine sample had
284 been cultivated resulting negative added the low seroprevalence found at the
285 Sorocaba Zoo it is suggested that wild mammals do not act as source of infection in
286 the studied place. Due to the protocol used to urine samples to PCR analysis a small
287 number of samples was obtained. Primers used to molecular study were specific to
288 pathogenic leptospira species and they amplified a fragment of *lipL32* gene
289 (STTODARD et al., 2009).

290 In the present study serologic, microbiologic and molecular methods were
291 combined to attempt of know the epidemiology of leptospirosis at the zoological park,
292 what is recommended due to the complementarity of techniques (KEE et al., 1994;
293 KOSITANONT et al., 2007).

294 All serum samples from Sorocaba Zoo staff were negative at MAT, equal
295 result found at the Uberaba Zoo staff (ESTEVEES et al., 2005) and Ribeirão Preto
296 Municipal Park staff (SILVA et al., 2010), what can occurred due to the fact of
297 captive wild animals do not act as reservoirs and implemented preventive measures

298 used by them to prevent transmission besides activities developed in animals
299 enclosures.

300 In relation to the epidemiologic inquiry applied to zoo staff, rat was
301 incriminated as the main transmissor, what is according to literature (FAINE et al.,
302 1999). Cat, on the other hand, was assigned by 12 staff (29.27%) and this species is
303 considered refractory to leptospirosis (LANGONI et al., 1998). Besides the wide
304 propagation about leptospirosis by media, 36.58% of interviewed do not know the
305 main symptoms of leptospirosis.

306 Cats and dogs feces and mosquitoes were assigned as risk factors for
307 leptospiral infection by 19.51%, 12.19% and 12.19% of interviewed, respectively.
308 Feces are not considered as important shedding route, contrary to urine.
309 Leptospirosis transmission is not transmitted by mosquitos' bite, different from
310 dengue, other widely released disease that occur n outbreaks in rainfall season
311 similar to leptospirosis. Most part of interviewed has just elementary education what
312 can justify the lesser knowledge level.

313 New studies must be encouraged and performed both with captive as free-
314 ranging wild animals, not only about leptospirosis but also to other infectious
315 diseases.

316

317 **Conclusion**

318 Leptospirosis occurs in captive environment at different levels in many
319 species as observed in the present study. Low seroprevalence found in captive
320 mammals, negative results from urine and blood samples at PCR, seronegativity

321 found in zoo staff suggest that besides leptospire are present at the park wild
322 mammals do not act as source of infection to other wild animals and Sorocaba Zoo
323 staff.

324

325 **ACKNOWLEDGMENTS**

326 We would like to thank State of São Paulo Research Foundation (FAPESP). Studies
327 were conducted in partnership with Sorocaba Zoo and at Zoonosis Research
328 Nucleous (NUPEZO), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.
329 We kindly thank the help given by PZMQB personal for the sample collection and
330 storage. An especial thank to Ramiro das Neves Dias Neto, Dr. Rodrigo H. F.
331 Teixeira and Dr. Aduino Veloso Nunes.

332

333

334 **References**

335 ADLER, B. and MOCTEZUMA, A. P., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary*
336 *Microbiology* 140, 287-296.

337 AGUIRRE, A.A. and TABOR, G.M., 2008. Global factors driving emerging infectious
338 diseases. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases* 1149, 1-3.

339 AMERICAN VETRINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2008. One health: A new
340 Professional Imperative. One Health Initiative Task Force: Final Report. One Health
341 World – World Health Through Collaboration, 76p.

- 342 BHARADWAJ, R. 2004. Leptospirosis – a reemerging disease? Indian Journal of
343 Medical Research 120, 136-138.
- 344 BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICARDI, J.N., MATTHIAS, M.A., DIAZ, M.M., LOVETT,
345 M.A., LEVETT, P.N., GILMAN, R.H., WILLIG, M.R., VINETZ, J.M., PERU-UNITED
346 STATES CONSORTIUM, 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global
347 importance. The Lancet: Infectious Diseases 3(12), 757-771.
- 348 BOURHY, P., COLLET, L., CLÉMENT, S., HUERRE, M., AVE, P., GIRY, C.,
349 PETTINELLI, F., PICARDEAU, M., 2010. Isolation and characterization of new
350 *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). PLoS Neglected
351 Tropical Diseases 4(6), e724.
- 352 CORRÊA, S.H.R., VASCONCELLOS, S.A., MORAIS, Z., TEIXEIRA, A.A., DIAS,
353 R.A., GUIMARÃES, M.A.B.V., FERREIRA, F., FERREIRA-NETO, J.S., 2004a.
354 Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico
355 de São Paulo. Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science 41, 189-
356 193.
- 357 ESTEVES, F.M. GUERRA-NETO, G. GIRIO, R.J. da S., SILVA-VERGARA, M.L.,
358 CARVALHO, A.C. de F.B., 2005. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em
359 animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. Arquivos do
360 Instituto Biológico 72(3), 283-288.
- 361 FAINE, S., ADLER, B., BOEIN, C., PEROLAT, P., 1999. *Leptospira* and
362 Leptospirosis. 2.ed., MedSci, Melbourne, Austrália.
- 363 FORNAZARI, F., CAMOSSI, L.G., SILVA, R.C., GUAZELLI, A., RIBEIRO, M.G.,
364 LANGONI, H., 2010. Leptospiral antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) bred in Brazil.
365 Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (in press).

- 366 FOWLER, M.E., 1993. Zoo & wild animal medicine. 3. ed. Philadelphia: W. B.
367 Saunders, 617p.
- 368 GUERRA-NETO, G., GIRIO, R.J.S., ANDRADE, T.M., KOPROSKI, L.P., MORAES,
369 W., SANTOS, L.C., 2004. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em
370 felídeos neotropicais pertencentes ao Criadouro de Animais Silvestres a Itaipu
371 Binacional e ao zoológico municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, Estado do
372 Paraná. ARS Veterinária 20, 75-80.
- 373 JUNG, B.Y., CHOI, J.S., KIM, K.T., SONG, Y.K., LEE, S.H., LEE, K.W., KIM, J.Y.,
374 MOON, O.K., 2007. Seroprevalence of Leptospirosis in Korean Municipal Zoo
375 Animals. The Journal of Veterinary Medicine Science 69(8), 861-867.
- 376 KO, A.I., GOARANT, C., PICARDEAU, M., 2009. *Leptospira*: the dawn of the
377 molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature Review:
378 Microbiology 7, 736-747.
- 379 LANGONI, H., CABRAL, K.G., KRONFLY, C.S., 1998. Pesquisa de aglutininas anti-
380 leptospíricas em gatos. Clínica Veterinária 17, 20-28.
- 381 LANGONI, H., KAWAGUCHI, M.F., OSHIKA, J.C., DA SILVA, R.C., TEIXEIRA, C.R.,
382 2009. *Leptospira* spp. antibodies in captive coatis (*Nasua nasua* Storr, 1780)
383 (Carnivora: Procyonidae). Journal of Venomous Animals Toxins Including Tropical
384 Diseases 15(4), 762-767.
- 385 LEVETT, P. N., 2001. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 14(2), 296-326.
- 386 LILENBAUM, W., MONTEIRO, R.V., RISTOW, P., FRAGUAS, P., CARDOSO, V.S.,
387 FEDULLO, L.P.L., 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro
388 Zoo, Brazil. Research in Veterinary Science 73, 319-321.

- 389 LILENBAUM, W., MONTEIRO, R.V., ALBUQUERQUE, C.E., RISTOW P., 2004.
390 Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. The Veterinary
391 Journal 168, 191-193.
- 392 LUNA-ALVARES, M.A., MOLES-CERVANTES, L.P., TORRES-BARRANCA, J.I.,
393 GUALL-SILL, F., 1996. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre
394 mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México.
395 Veterinaria México 27(3), 229-34.
- 396 MARVULO, M.F.V., SILVA, J.C.R., FERREIRA, P.M., MORAIS, Z.M., MORENO,
397 A.M., DOTO, D.S., PAIXÃO, R., BACCARO, M.R., VASCONCELLOS, S.A.,
398 FERREIRA-NETO J.S., 2009. Experimental leptospirosis in capybaras
399 (*Hydrochaeris hydrochaeris*) infected with *Leptospira interrogans* serovar Pomona.
400 Journal of Zoo and Wildlife Medicine 40(4), 726-730.
- 401 PIMENTEL, J.S., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., MARVULO, M.F.V.,
402 VASCONCELLOS, S.A., MORAIS, Z.M., SILVA, J.C.R., NETO, J.E., 2009. Inquérito
403 sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais
404 do Zoológico de Aracaju, Sergipe. Pesquisa Veterinária Brasileira 29(12), 1009-
405 1014.
- 406 SHARMA, S., VIJAYACHARI, P., SUGUNAN, A.P., SEHGAL, S.C., 2003.
407 Leptospiral carrier state and seroprevalence among animal population – a cross-
408 sectional sample survey in Andamana and Nicobar Islands. Epidemiology and
409 Infection 131, 985-989.
- 410 SILVA, C.S., GÍRIO, R.J.J., GUERRA-NETO, G., BRICH, M., SANTANA, L.A.S.,
411 AMÂNCIO, F.H., MARIANI, J.R., WESSORT, P.M.F., 2010a. Anticorpos anti-
412 *Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto,

413 estado de São Paulo, Brasil. Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science,
414 47(3), 237-242.

415 SILVA, R.C., ZETUN, C.B., BOSCO, S.M.G., BAGAGLI, E., ROSA, P.S., LANGONI,
416 H., 2008. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging
417 armadillos. Veterinary Parasitology 157(3-4), 291-293.

418 STTODARD, R.A., GEE, J.E., WILKINS, P.P., McCAUSTLAND, K., HOFFMASTER,
419 A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. though TaMan polymerase
420 chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagnostic Microbiology and Infectious
421 Diseases v.64, p.247-255, 2009.

422 TRIOLA, M.F., 2005. Introdução à estatística. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC., 682p.

423 ULLMANN, L.S., HOFFMANN, J., MORES, W., CUBAS, Z.S., SANTOS, L.C.,
424 SILVA, R.C., CAMOSSO, L.G., MOREIRA, N., GUIMARAES, A.M.S., MONTAÑO, P.,
425 LANGONI, H., BIONDO, A.W., 2007. Prevalence of *Leptospira interrogans*
426 antibodies in captive wildcats of Southwestern Brazil. In: XXXI Congresso da
427 Sociedade de Zoológicos do Brasil, XIV Congresso da Associação Latinoamericana
428 de Parques Zoológicos e Aquários e do XVI Encontro da Associação Brasileira de
429 Veterinários de Animais Selvagens, São Paulo.

430 ZETUN, C.B., HOFFMANN, J.L., SILVA, R.C., LANGONI, H., 2009. *Leptospira* spp.
431 and *Toxoplasma gondii* antibodies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu
432 region, SP, Brazil. Journal of Venomous Animals Toxins Including Tropical Diseases
433 15(3), 546-552.

434

435 Table 1. Leptospirosis serology results in captive mammals from PZMQB. Botucatu, SP,
436 2010.

Species	Common Name	N	n	R	Serovars (Titer)
<i>Alouatta caraya</i>	Black howler monkey	3	3	1/3	BUT (1)
<i>Ateles marginatus</i>	White faced spider monkey	6	6	2/6	ICT (1); COP (2)
<i>Brachytelis arachnoides</i>	Woolly spider monkey	5	9	1/9	BRA (1)
<i>Cerdocyon thous</i>	Crab-eating fox	10	14	2/14	SEN (1, 2)
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Maned Wolf	2	16	1/16	CAN (1)
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Woolly monkey	3	4	1/4	DJA (1), ICT (4), POM (1)
<i>Nasua nasua</i>	Coati	5	11	2/11	CAN (1), COP (1)
<i>Puma yagouarondi</i>	Jaguarundi	4	8	1/8	SEN (1)
<i>Tapirus terrestris</i>	Tapir	3	4	2/4	POM (4; 16), ICT (4; 16)

437 N= Specimens number; n= Samples number; R= Reagent Samples/Samples number. BUT=
438 Butembo; BRA= Bratislava; CAN= Canicola; COP= Copenhageni; DJA= Djasiman; ICT=
439 Icterohaemorrhagiae; POM= Pomona; SEN= Sentot. Titer expressed in 1×10^2 .