UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

AGLUTININAS CONTRA *Leptospira* spp EM CERVOS-DO-PANTANAL *(Blastocerus dichotomus)* NA ÁREA AFETADA PELA CONSTRUÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA SÉRGIO MOTTA

Gian Riccardo Ortunho Galli
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

AGLUTININAS CONTRA *Leptospira* spp EM CERVOS-DO-PANTANAL *(Blastocerus dichotomus)* NA ÁREA AFETADA PELA CONSTRUÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA SÉRGIO MOTTA

Gian Riccardo Ortunho Galli

Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Gírio

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2011

Galli, Gian Riccardo Ortunho
G168a Aglutininas contra *Leptospira* spp em cervos-do-pantanal *(Blastocerus dichotomus*) na área afetada pela construção da usina hidrelétrica Sérgio Motta / Gian Riccardo Ortunho Galli. – Jaboticabal, 2011
xiv, 40 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Raul José Silva Girio
Banca examinadora: José M. Barbanti Duarte, Fernanda S. Magajevsky
Bibliografia

1. *Leptospira* spp. 2. Cervo-do-pantanal. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:639.111.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GIAN RICCARDO ORTUNHO GALLI – Nascido em 05 de novembro de 1982, no Município de São Paulo – SP, filho de Guido Galli e Lucimary Correa Ortunho. Residiu até os 18 anos de idade na Itália, aonde curso o ensino médio, ao retornar ao Brasil ingressou em fevereiro de 2004 no Curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário de São José do Rio Preto, onde permaneceu até a transferência para a Universidade de Santo Amaro (UNISA), em janeiro de 2007, concluindo o curso em dezembro de 2007. Exerceu atividade profissional como autônomo, durante 6 meses no atendimento Clínico de Animais Selvagens; em novembro de 2008, ingressou no programa de *treinee* da Empresa Sertanejo Alimentos S.A., desligando-se em fevereiro de 2009. Em agosto de 2009, passou a ser aluno regular do Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" no Câmpus de Jaboticabal (SP).

Exaltação aos Professores

Antônio Onias Neto

Quer faça frio e chova a cântaros,
quer faça sol e calor,
de cantar parem os pássaros.

Nesta sua diária labuta,
o seu viver cotidiano
é na vigília e na luta
de nos ver já diplomados.

Porque então nós estudantes,
aos Mestres não ajudamos ?
Mostremo-nos incessantes

Nos estudos, varonis,
e provar que bem lutamos
ao bem de nosso Brasil!

(Paulicéia, Outubro, 1953).

AGRADECIMENTOS

Sou grato a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho:

Agradeço em primeiro lugar a minha Mãe por me apoiar nos momentos de dificuldades técnicas e psicológicas, e também ao Sr. Alcimar Soares, obrigado por estarem presentes em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Raul José Silva Gírio pela orientação, paciência, incentivo e pela confiança em mim depositada e principalmente pela compreensão em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauricio Barbanti Duarte, pela doação das amostras de soros dos animais, pela indispensável ajuda na identificação das mostras e pelas dicas sobre o trabalho.

A Dra. Fernanda Senter Magajevski, pala orientação, amizade, incentivo e paciência durante todo o período do mestrado. Obrigado por transmitir com muita sabedoria os ensinamentos que servirão de base para a minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Mathias por me permitir absorver uma ínfima parte de seu incrível conhecimento em epidemiologia e da língua portuguesa, e pelos momentos tão preciosos que passei em sua companhia

Aos colegas de laboratório de Leptospirose e Brucelose: Nivaldo Aparecido de Assis, Thalita Masoti Blankenheim, Felipe Jorge da Silva.

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraudo por mostrar-me novas ferramentas de pesquisas, e pela amizade, e palavras de apoio em muitos momento.

Ao meu amigo-irmão Guilherme Guerra Neto e ao Fábio H. Amâncio, que cada qual com seu jeito, me ajudaram a superar tantas e tantas dificultadas ao longo deste caminho, tornando-se parte da minha família, pessoas que eu vou sempre agradecer por me ajudarem a enfrentar todos os obstáculos, e também por compartilharem muitos momentos de alegrias.

Agradeço de coração aos meus amigos Alan R. Panosso, Alinne Palermo. Bruna Alexandrino, Lucimara Borges (Pinga), Juliana Baldin, Marcos Ferraz, Mirelle Picinato, Jose Roberto Ferreira e Vivian M. Massaroto, que me proporcionaram muitos momentos alegres e de diversão a todos os instantes, me desculpem os que esqueci que foram muitos.

A minha amiga Paula Marcondes pela amizade longa e duradoura e pela compreensão nos meus momentos de ausência, frequentes durante este ano e meio.

Aos amigos, colegas, professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAV-UNESP, pela agradável convivência durante o curso.

Agradeço por fim, mas não menos importante, ao meu amigo Prof. Dr. Celso Martins Pinto, pela amizade, e por compartilhar comigo, em todos os momentos, seu vasto conhecimento em animais selvagens; hoje vislumbro que seu jeito esquecido era uma forma de me fazer amadurecer, obrigado eterno professor.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE GRÁFICOS x

LISTA DE FIGURAS xi

RESUMO xiii

SUMMARY xiv

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

3. OBJETIVOS 10

4. MATERIAL E MÉTODOS 11

4.1. Área de estudo 11

4.2 Captura 13

4.3 Caracterização da população animal estudada 16

4.4.1 Colheita de amostras de sangue 17

4.5 Processamento em laboratório de campo 18

4.6 Preparo dos antígenos de *Leptospira* 18

4.7 Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) 18

4.8 Análise estatística 20

4.9 Geoprocessamento 20

5. RESULTADOS 21

5.1 Análise de proporcionalidades 24

6. DISCUSSÃO 30

7. CONCLUSÕES 33

8. REFERÊNCIAS 34

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 Estirpes de *Leptospira* spp empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica à leptospirose, segundo o código, sorogrupo e sorovariedade, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Silvio de Arruda Vasconcellos (2010)..... 19

Tabela 2 Número e porcentagem das amostras reagentes e não reagentes dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias de acordo com a localização de sua captura, 1998 - 2001..... 21

Tabela 3 Números e porcentagem de amostras reagentes de acordo com a sorovariedade e o título sorológico encontrado nos cervos-do-pantanal, capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE Engenheiro de Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001..... 22

Tabela 4 Porcentagens de sorovariedades encontradas nas amostras reagentes dos cervos-do-pantanal, capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 23

Tabela 5 Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova de SAM contra *Leptospira* spp de acordo com o sexo dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 24

Tabela 6 Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova de SAM para *Leptospira* spp em machos e fêmeas de cervos-do-pantanal jovens capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 25

Tabela 7 Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova de SAM contra *Leptospira* spp em machos e fêmeas de cervos-do-pantanal adultos capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 26

Tabela 8 Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova da SAM contra *Leptospira* spp de cervos-do-pantanal adultos e jovens capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 27

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1 Porcentagem das sorovariedades segundo as amostras reagentes (n=217) contra *Leptospiras* spp dos cervos-do-pantanal, capturados na bacia do Rio Paraná, entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001. 23

Gráfico 2 Proporção de amostras de machos e fêmeas reagentes e não reagentes dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná, entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 24

Gráfico 3 Proporção de amostras de machos e fêmeas reagentes e não reagentes de cervos-do-pantanal jovens capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 25

Gráfico 4 Proporção entre amostras de machos e fêmeas reagentes e não reagentes de cervos-do-pantanal adultos capturados, na bacia do Rio Paraná, entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001 27

Gráfico 5 Proporção entre amostras reagentes e não reagentes de cervos-do-pantanal adultos e jovens capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias..... 28

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 Mapa representando trecho do Rio Paraná, local onde as amostras dos cervos-do-pantanal foram colhidas (Fonte: Relatório Projeto cervo-do-pantanal Porto Primavera).. 11

Figura 2 Visão do canteiro de obras da Usina Hidrelétrica Sérgio Motta (Porto Primavera), no Rio Paraná (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).. 12

Figura 3 Vista aérea do ambiente onde foi realizado o estudo. Ao fundo se vê o Rio Paraná e a margem paulista (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos). 13

Figura 4 Momento do salto do capturador na lateral do animal em movimento (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).. 14

Figura 5 Anestesista chegando ao animal para a contenção química (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) 14

Figura 6 Animal sendo colocado em uma rede, do tipo saco (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos). 15

Figura 7 Cervo-do-pantanal sendo içado pelo helicóptero para transporte (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).. 15

Figura 8 Cervo-do-pantanal sendo transportado pelo helicóptero para a base de campo. (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).. 16

Figura 9 Imagem de satélite com informações do georreferenciamento dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001. 29

Figura 10 Imagem de satélite com informações do georreferenciamento de cada amostra reagente contra *Leptospira* spp dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001. .. 29

AGLUTININAS CONTRA *Leptospira* spp **EM CERVOS-DO-PANTANAL** *(Blastocerus dichotomus*) **NA ÁREA AFETADA PELA CONSTRUÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA SÉRGIO MOTTA**

RESUMO – Em testes sorológicos com cervos-do-pantanal, teve-se como objetivos verificar a ocorrência de anticorpos contra leptospiras, avaliar espacialmente a dispersão das leptospiras na população de cervos-do-pantanal de vida livre, que habitavam a bacia do rio Paraná, por meio da prova de soroaglutinação microscópica. Foram examinadas 217 amostras de soro sanguíneo (77 machos e 140 fêmeas) de cervos-do-pantanal capturados em 6 localidades na bacia do rio Paraná entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Desse total, 130 (59,91%) amostras foram reagentes contra 12 diferentes sorovariedades de leptospiras patogênicas e 87 (40,09%) foram não reagentes. As sorovariedades encontradas foram: Autumnalis, em 44 amostras; Castellonis, em 29; Hardjo, em 26; Pyrogenes, em 7; Grippotyphosa, em 7; Bratislava, em 4; Copenhageni, em 3; Pomona, em 3; Wolffi, em 3; Australis, em 2 e Canicola e Javanica em uma amostra cada. Os títulos sorológicos obtidos nas amostras reagentes variaram de 100 a 800. O título 100 foi o mais frequente com 66,92%, seguidos pelo 200 com 22,31%, 400 com 9,23%, e 800 com 1,54%. Com relação ao sexo, 52 (67,5%) amostras de machos foram reagentes e 78 (55,7%) de fêmeas não reagentes. Esses resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos. A comparação entre os animais jovens e adultos sororreagentes revelaram que houve diferença estatística ($p<0,01$) com relação a idade; 65,1% dos adultos e 34,9% dos jovens. A dispersão espacial realizada por imagens de satélite aliadas as informações do geoposicionamento de cada cervo-do-pantanal capturado e que apresentou sororreação, comprovou a distribuição das leptospiras nos cervos-do-pantanal na área afetada pela construção da usina hidrelétrica Sérgio Motta.

Palavras Chave: *Leptospira* spp, cervo-do-pantanal, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

AGLUTININS AGAINST *Leptospira* spp **EM MASH DEER** *(Blastocerus dichotomus*) **IN THE AREA AFFECTED BY THE CONSTRUCTION OF SERGIO MOTTA HYDROELECTRIC POWER STATION**

SUMMARY – In serological tests with deer-in-marsh, took as objective to verify the occurrence of antibodies against leptospiral evaluate the spatial dispersion of leptospires in the population of mash deer free living, who inhabited the basin of Parana River through the microscopic agglutination test. We examined 217 serum samples (77 males and 140 females) of pantanal deer caught in six locations in Paraná river basin between the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul**.** From this total, 130 (59.91%) samples were reactive against 12 different serovars of pathogenic Leptospira and 87 (40.09%) not reactive. The serovars found were Autumnalis, in 44 samples; Castellonis, in 29; Hardjo, in 26; Pyrogenes, in 7; Grippotyphosa, in 7; Bratislava, in 4; Copenhageni, in 3, Pomona, in 3; Wolffi, in 3 ; Australis, in 2 and Canicola and Javanica in one sample each. The serologic titers obtained in the reactive samples ranged from 100 to 800. The serum titles obtained in the reagent samples ranged from 100 to 800. The title 100 was the most frequent with 66.92%, followed 200 with 22.31%, 9.23% with 400 and 800 with 1.54%. Regarding gender, 52 (67.5%) males samples were reactive and 78 (55.7%) females not reactive. These results showed no statistically significant difference between genders. The comparison between youth and adults ages revealed that there was statistical difference ($p<0,01$) in seropositive in respect to age,65.1% for adults and 34,9% for young ones. The spatial dispersion made by the satellite images with the georeference information of each mash deer captured, which had reagent sample confirmed the distribution of Leptospira in the mash deer on the area affected by the construction of the Sérgio Motta hydroelectric power station.

Keywords: *Leptospira* spp, mash deer, São Paulo and Mato Grosso do Sul states.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro país do mundo em biodiversidade, acolhendo aproximativamente 14% da biota mundial. No entanto, à medida que a humanidade aumenta sua capacidade de intervir na natureza para satisfação de necessidades e desejos crescentes, surgem tensões e conflitos com outras espécies quanto ao uso do espaço e dos recursos naturais.

A intensa exploração dos recursos naturais tem posto em risco as possibilidades de renovação natural. A perda, a degradação e a fragmentação de habitat, resultantes de atividades humanas, constituem as maiores ameaças aos mamíferos terrestres existentes em todo o território natural.

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) é o maior cervídeo do Brasil, esse animal habita áreas de banhados e várzeas, onde pode obter seu alimento. Atualmente a distribuição dessa espécie está fragmentada, por causa da ocupação das várzeas por agricultura e construções de usinas hidrelétricas.

As principais populações de cervo-do-pantanal brasileira remanescente, encontra-se restrita a algumas áreas, tais quais: Pantanal, região da ilha do Bananal no Rio Araguaia, Rio Guaporé, e nos resquícios de várzeas do Rio Paraná.

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a espécie é considerada como vulnerável, e pela International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) está incluída no

apêndice I da Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES).

O avanço da agropecuária, bem como o crescimento acelerado de centros urbanos próximos às áreas naturais, proporciona o contato entre as populações humanas, seus animais domésticos e as populações de animais selvagens de vida livre. Esse estreito contato facilita a disseminação de agentes infecciosos a novos hospedeiros e para o meio ambiente, estabelecendo-se assim, novas relações entre hospedeiros, e também novos nichos ecológicos na cadeia epidemiológica de doenças. Com isso, enfermidades que eram consideradas controladas ou que já não possuíam importância epidemiológica, começam a ocasionar surtos ou epidemias nos animais selvagens, nos animais domésticos e nos seres humanos. Nesse contexto, determinadas doenças podem contribuir para que as populações de animais selvagens, como, por exemplo, de cervos-do-pantanal, entrem em declínio populacional.

Frente a essa situação, a compreensão da epidemiologia de certas enfermidades torna-se importante para detectar seus focos naturais, estabelecendo-se assim, os fatores de risco existentes em determinados ecossistemas e os mecanismos de como circulam os agentes etiológicos entre os animais selvagens.

O conhecimento das condições do ambiente como um todo, unindo as informações do ecossistema e da saúde dos animais selvagens, pode contribuir para a manutenção do equilíbrio e da biodiversidade das espécies. Os estudos ecológicos ajudam a reconhecer como as doenças em populações naturais se desenvolvem e,

desta forma, constituem um importante mecanismo de estratégias para a conservação das espécies selvagens.

Tendo em vista a relação entre seres humanos, seus animais domésticos e as populações de animais selvagens de vida livre, pode-se considerar que os cervos-do-pantanal, oriundos de áreas com presença de animais domésticos possam ter contato com patógenos comuns a esses animais, vindo com isso a se tornar portadores desses agentes etiológicos. No presente estudo pretendeu-se verificar a frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp nos cervos-do-pantanal de vida livre localizados nas proximidades do Rio Paraná entre a atual Barragem da Usina Hidrelétrica (UHE) Engenheiro Sérgio Motta, no Município de Rosana (SP) e Batayporã (MS), e a Barragem da UHE Engenheiro Souza Dias, nos Municípios de Andradina (SP), Castilho (SP) e Três Lagoas (MS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose acomete uma gama variada de espécies animais, domésticas, selvagens e inclusive o ser humano, podendo provocar manifestações clínicas agudas ou, em outros casos, não causando os sintomas decorrentes da infecção. A maioria das espécies de animais domésticos, assim como a maioria das espécies silvestres, dentre as quais incluem-se carnívoros, roedores, marsupiais e répteis, podem tornar-se portadores renais e, portanto, contribuir para a disseminação do agente na natureza (FAINE *et* al., 1999).

Além de ser uma enfermidade de relevância entre os animais, a leptospirose é considerada de importância do ponto de vista da saúde pública, uma vez que o contato com animais infectados é uma das principais vias de transmissão para o ser humano (MICHNA, 1970; AMATREDJO et al., 1975; HIGGINS et al., 1980).

As leptospiras são espiroquetas pertencentes à ordem Spirochaetales, família LEPTOSPIRACEAE, gênero *Leptospira* (NOGUCHI, 1918). O gênero *Leptospira* era anteriormente dividido em duas espécies: *L. interrogans*, apresentando uma variação antigênica caracterizada por 23 sorogrupos e 202 sorovariedades (POSTIC et al., 2000); e *L. biflexa*, englobando variedades de comportamento saprófito, de vida livre e presentes em água doce de superfície, sendo caracterizada por 38 sorogrupos e 65 sorovariedades (FAINE, 1999). Essa classificação baseava-se em critérios estritamente relacionados a reações sorológicas relativamente específicas, que forneciam os sorogrupos e as sorovariedades de leptospiras patogênicas e saprófitas. A identificação da sorovariedade só era possível pelo emprego da técnica de absorção cruzada de aglutininas, realizada por laboratório de referência (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985).

Em 1992, o Subcomitê de Taxonomia da Leptospiraceae propôs uma nova divisão para este gênero, formado por oito genomespécies patogênicas: *L. borgptersenii, L. interrogans sensu stricto, L. noguchii, L. santarosai, L. weilii, L. kirchneri, L. inadai e L. fainii,* distribuídas em 26 sorogrupos e 250 sorovariedades; e três genomespécies saprófitas ou de vida livre: *L. biflexa, L. meyeri, L. wolbachii*, com

raros registros de infecção (KMETY; DIKKEN, 1993). Mas deve ser ressaltado que, com a nomenclatura aprovada em 2007, no Equador, durante a reunião do Subcomitê de Taxonomia da Leptospiraceae, o gênero foi reclassificado em 13 espécies patogênicas*: L. alexandrei, L. alstonii, L. borgpetersenii, L. inadai, L. interrogans, L. faine, L. kirscheneri, L. licerasiae, L. noguchi, L. santorasai, L. terpstae, L. weilii, L. wolffii,* distribuídas em mais de 260 sorovariedades agrupadas em 23 sorogrupos. Esta nova classificação foi oficializada por meio da publicação na *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (LEVETT; SMYTHE, 2008).

A leptospirose tem distribuição cosmopolita e tem sido descrita em todos os países que realizaram investigações epidemiológicas (PANDEY, 1994), principalmente nos países tropicais e subtropicais (SULZER; JONES, 1980), devido à sua forte associação com áreas de alta pluviosidade e clima quente (PLANK; DEAN, 2000; ACHA; SZYFRES, 2001).

A infecção por *Leptospira* spp é adquirida pelo contato direto ou indireto com urina (PANDEY, 1994) e produtos provenientes de animais infectados (BLOOD; RADOSTITS, 1989). Segundo BLAHA (1995), a transmissão também pode ocorrer pelo contato com água parada contaminada com urina de animais infectados, ou por meio do coito, sendo assim transmitida de forma direta de um animal infectado para outro.

A penetração da *Leptospira* spp ocorre por meio de mucosas, lesões na pele ou pele íntegra, seguindo-se de uma multiplicação no sangue e na quase totalidade dos órgãos e tecidos (BROD et al., 2005). Nos animais que resistem à fase aguda da enfermidade, os micro-organismos alcançam a luz dos túbulos contornados renais e são eliminados pela urina durante períodos variados de tempo, caracterizando assim, o animal como portador (VASCONCELLOS, 1987).

A prova de soroaglutinação microscópica (SAM) é considerada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como a técnica de referência, tanto para o diagnóstico sorológico da leptospirose humana como para animal (ANDRADE, 1993). Trata-se de uma técnica trabalhosa, que detecta anticorpos contra *Leptospira* spp em

soro sanguíneo, e exige o uso de leptospiras vivas como antígenos (CHAPPEL et al., 1998).

As várias sorovariedades possuem diferentes características patogênicas (ORGANIZACÍON PANAMERICANA DE LA SALUD - OPAS, 1997), podendo ocorrer a situação de um único hospedeiro se infectar, com mais de uma sorovariedades (ACHA; SZYFRES, 2001).

Alguns grupos profissionais são mais suscetíveis a contrair a infecção por leptospiras, devido ao frequente contato com animais possivelmente portadores e seus produtos, e, ainda, devido ao próprio ambiente de trabalho. Pessoas que trabalham com animais selvagens estão incluídas nesse grupo, uma vez que esses animais podem se tornar importantes hospedeiros de manutenção das leptospiras por toda a vida, e em consequência, podendo ser fonte de infecção para outros grupos humanos e animais domésticos, sendo, às vezes, causa do surgimento ou ressurgimento desta enfermidade (FAINE, 1999).

A investigação da enfermidade, em diversos países, incluindo o Brasil, têm demonstrado a presença de diversas sorovariedades de leptospiras em diferentes grupos animais, como, por exemplo: roedores, xenartras, carnívoros, artiodáctilos, primatas, répteis e aves (REILLY et al., 1968; MICHNA & CAMPBEL, 1997; GUERRA-NETO et al., 2004; ANDRADE, 2008).

Pesquisando a ocorrência de *Leptospira* spp em mamíferos do Zoológico de Chapultepec, na Cidade do México, LUNA-ALVARES et al. (1996) constataram a presença de 52% de soropositividade nas 48 amostras de soro sanguíneo examinadas pela SAM.

LILENBAUM et al. (2002) analisaram, por meio da SAM, amostras de soro de 77 animais de 38 espécies diferentes de mamíferos que compõem o plantel do Zoológico do Rio de Janeiro e detectaram que 51 (66,2%) amostras foram reagentes; 29 (37,7%) amostras obtiveram título maior ou igual a 200, 15 (19,5%) amostras com título 100 e sete (9,1%) apresentaram título 50. Os anticorpos contra *Leptospira* spp foram mais detectados em animais das famílias Canidae, Myermecophagidae e Procyonidae.

CORRÊA et al. (2004) realizaram um levantamento sorológico para a detecção de anticorpos contra *Leptospira* em animais silvestres mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, durante o período de 1996 a 1999. Foram examinadas 302 amostras de soro sanguíneo, sendo 290 de animais mantidos em cativeiro e 12 de animais sinantrópicos; destas, 59 (19,5%) foram sororreagentes na SAM. Algumas ordens e classes de animais estudadas e as frequências de detecção de anticorpos, quando verificadas do ponto de vista da localização espacial dos recintos desses animais, permitiram a demonstração de áreas críticas para a exposição às leptospiras dentro do estabelecimento.

STRAUBE et al. (2004) avaliaram, na Alemanha, a importância do *Rattus norvegicus* na cadeia epidemiológica da leptospirose em zoológicos do país. O estudo foi feito por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), em tecido renal de 920 animais capturados nos zoológicos e nas imediações destes, e detectaram a presença do DNA de *Leptospira* spp em 11,4% das amostras.

Estudo realizado por GUERRA-NETO et al. (2004), com 61 amostras de soro de felídeos neotropicais, do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e do Zoológico Municipal Bosque Guarani, em Foz do Iguaçu – PR, mostrou que 28 (45,9%) amostras de soro sanguíneo dos animais foram reagentes à prova de SAM.

ESTEVES et al. (2005) estudaram 166 amostras de animais cativos do Zoológico Municipal de Uberaba – MG, entre eles: aves, répteis, mamíferos, peixes, além de oito gatos domésticos errantes e 27 roedores sinantrópicos. As amostras reagentes foram 17 (10,2%), e os títulos encontrados foram maior ou igual a 100, sendo oito amostras de mamíferos, dois de répteis, seis de peixes e uma de roedor sinantrópico.

GUERRA-NETO (2006), durante um levantamento sorológico com felinos mantidos em cativeiro, em criatórios de 41 cidades, observou que, das 359 amostras de soro recebidas, 46 (12,81%) foram reagentes na prova de SAM.

Em um estudo sorológico realizado no zoológico Dr. Fábio de Sá Barreto, no Município de Ribeirão Preto, SP, demonstrou-se que, das 388 amostras colhidas entre mamíferos, aves, répteis, peixes, animais sinantrópicos e funcionários que ali

trabalhavam, 112 (28,9%) foram reagentes para *Leptospira* spp, e, destas, 100 amostras foram de animais cativos e 12 de animais de vida livre. As sorovariedades que apresentaram maior ocorrência foram: Patoc, Andamana, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Panama (SANTOS-SILVA et al., 2010).

Levantamentos sorológicos para leptospirose envolvendo animais da ordem Primata demonstraram positividade, tanto em primatas do Velho Mundo como do Novo Mundo (STASILEVICH et al., 2000) ANDRADE em 2008 realizou um levantamento sorológico em macacos pregos (*Cebus apella*) de vida livre. Dos 50 animais examinados 33 (60%) apresentaram amostras de sororreagentes.

Embora alguns trabalhos de pesquisa sobre a leptospirose em animais selvagens tenham sido realizados no Brasil, a enfermidade ainda é pouco estudada, principalmente nas espécies de cervídeos de vida livre nativos da fauna brasileira, deixando uma possível lacuna no estudo da cadeia epidemiológica, o que dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle dessa enfermidade em regiões com grande densidade de animais, matas e rios.

MATHIAS et al. (1999), realizaram um levantamento sorológico para leptospirose em veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) do Pantanal Sul-Mato-Grossense e do Parque Nacional das Emas em Goiás. Das amostras provenientes do Pantanal, 24% foram sororreagentes às sorovariedades Hardjo, Wolffi e Mini, e nenhuma do Parque Nacional das Emas apresentou sororreação.

Em estudo realizado com 14 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus celer*) selvagens na Reserva de Vida Livre Campos del Tuyú na Argentina entre os anos de 1995 e 1998, obteve-se, três (21%) apresentaram amostras reagentes às sorovariedades Wolffi, com títulos de 100, e Pomona, com títulos entre 100 e 400 (UHART et al., 2003).

GIRIO et al. (2004) examinaram, por meio da SAM, 315 amostras de animais domésticos e cervídeos selvagens da região de Nhecolândia (MS), sendo 41 de veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) e 10 de veados-mateiros (*Mazama americana*). Os resultados revelaram que 9,7% das amostras foram reagentes e todas oriundas dos veados-campeiros. As sorovariedades de *Leptospira interrogans* mais frequentes foram Icterohaemorrhagie e Copenhageni.

NAVA (2008), em levantamento sorológico realizado na região do Pontal do Paranapanema, SP, com animais domésticos e silvestres, encontrou as seguintes sorovariedades: Pyrogenes, Patoc, Panama, Icterohaemorrhagie e Pomona em animais silvestres. Nos bovinos foram encontradas as sorovariedades: Hardjo, Shermani e Wolffi; em cães: Hardjobovis, Autumnalis e Patoc; em equinos, Icterohaemorrhagiae Autumnalis, Australis, Batislava, Patoc e Hardjobovis; em suínos, Australis, Batislava, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni; e nos ovinos, Castellonis e Autumnalis.

NARDI et al. (2009), realizaram um levantamento em 181 gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) em corredores agroflorestais e fragmentos de Mata Atlântica na região do Pontal do Paranapanema, São Paulo. Os 181 animais foram examinados por meio da técnica de SAM para 24 sorovariedades de *Leptospira* spp. Apenas dois animais foram sororreagentes: um proveniente de corredor agroflorestal, apresentando a sorovariedade Autumnalis e um proveniente do fragmento de Mata Atlântica, que apresentou reação a sorovariedade Butembo.

TONIN et al. (2010), relataram pela primeira vez em um exemplar da espécie de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), proveniente do sul do Brasil, sororreação na SAM, para as sorovariedades Butembo e Bratislava.

ESPÍ et al. (2010), realizaram um levantamento soroepidemiológico para Leptospirose entre os anos de 1999 e 2005, em duas espécies de cervídeos na região de Asturias, Espanha, as espécies estudadas foram: cervo-dama (*Dama dama*) e cervo-nobre (*Cervus elaphus hispanicus*); as sorovariedades diagnosticadas pelo teste da SAM para as respectivas espécies foram: Pomona (1,6% e 5,8%), Bratislava (1,1% e 0,7%), Grippotyphosa (0,7% e 2,4%), Muenchen (2,6% e 0%), Pyrogenes (0,4% e 2,4%), Panama (1,2% e 1,7%), Copenhageni (0% e 0,7%), Autumnalis (0,4% e 0%). A sorovariedade predominante foi Pomona (5,8%), na espécie de cervo-dama, e para a espécie cervo-nobre foi a sorovariedade Muenchen (2,6%).

SILVA et al. (2010), examinaram 44 amostras de soros sanguíneos de cervídeos do criadouro do Câmpus da FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP, mantidos em estado cativo. Das 19 (43,1%) amostras reagentes, sete foram contra a sorovariedade Autumnalis (36,8%), seis contra a Andamana (31,5%), seis contra a Icterohaemorrhagiae (31,5%), seis contra a Patoc (31,5%) e cinco contra a Canicola (26,3%).

3. OBJETIVOS

Considerando-se a escassez de informações sobre a ocorrência de leptospirose em cervos-do-pantanal, de vida livre, que tem o hábito de viver em áreas alagadas e/ou várzeas de rios, na proximidade de criações de animais de interesse zootécnico, originou-se o presente trabalho. Mesmo considerando o tempo pós-retirada (1998-2001) do soro sanguíneo dos animais, objetivou-se:

1- pesquisar a ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp na população de cervos-do-pantanal oriundos de vida livre, na região do Rio Paraná entre as Usinas Hidrelétricas Engenheiro Sergio Motta e Engenheiro Souza Dias;

2- determinar a frequência das sorovariedades de *Leptospira* spp nos soros sanguíneos dos cervos-do-pantanal de vida livre na região do Rio Paraná entre as Usinas Hidrelétricas Engenheiro Sergio Motta e Engenheiro Souza Dias;

3- avaliar espacialmente a dispersão da enfermidade na população de vida livre dos cervos-do-pantanal de vida livre na região do Rio Paraná entre as Usinas Hidrelétricas de Sergio Motta e Engenheiro Souza Dias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na bacia do Rio Paraná, entre os Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo e entre as Usinas Hidrelétricas (UHE) Engenheiro Souza Dias (Jupiá) e Engenheiro Sérgio Motta (Porto Primavera) (figura 1).

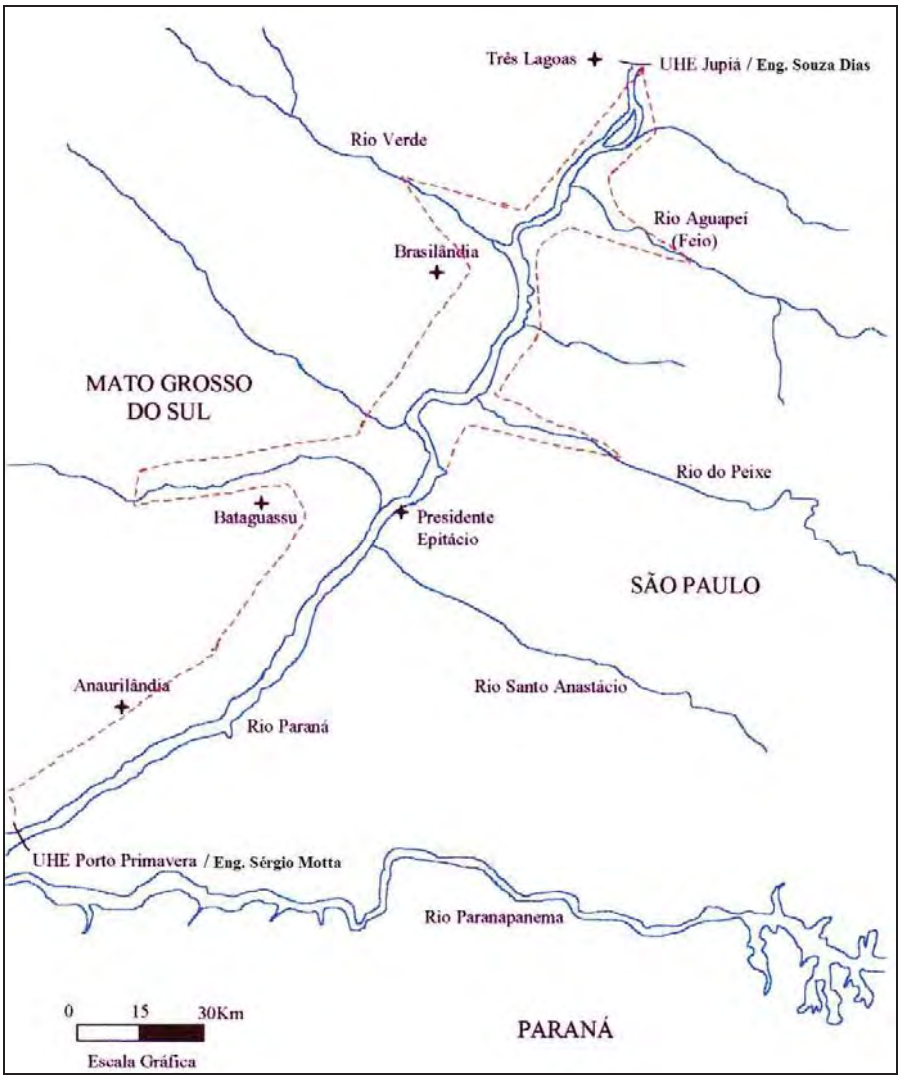

Figura 1 – Mapa representando trecho do Rio Paraná local onde as amostras dos cervos-do-pantanal foram colhidas (Fonte: Relatório Projeto cervo-do-pantanal Porto Primavera).

A presente área foi afetada pelo enchimento do reservatório da UHE de Porto Primavera (figura 2). A área inundada, em sua maioria constituída de várzeas, foi de aproximadamente 200.000 ha, o equivalente a 2.000 Km^2.

Figura 2 – Visão do canteiro de obras da Usina Hidrelétrica Sérgio Motta (Porto Primavera), no Rio Paraná (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

As comunidades vegetais dessa área formavam um complexo mosaico de extensos campos úmidos, entremeados de formações florestais distintas, geralmente formando cordões que se desenvolveram nas barras arenosas. Nas inúmeras lagoas marginais, que muitas vezes são interligadas, desenvolve-se uma cobertura com espécies flutuantes ou fixas, em geral mais densas nas porções marginais. O varjão do Rio Paraná assemelha-se fisionômica e floristicamente ao Pantanal Mato-Grossense (figura 3).

Figura 3 – Vista aérea do ambiente onde foi realizado o estudo. Ao fundo se vê o Rio Paraná e a margem paulista (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

4.2 Captura

Os animais foram capturados, entre março de 1998 e agosto de 2001, utilizando-se técnica de captura manual, criada pela equipe do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte. Essa técnica consiste na busca e localização dos animais utilizando-se um helicóptero, que neste caso foi do modelo Bell, Jet Hanger III, que sobrevoava a região a uma altura média de 200 metros do solo.

A equipe de captura era integrada por quatro pessoas: o piloto, o capturador, um auxiliar e o anestesista. O capturador lançava-se do helicóptero (figuras 4), a uma altura entre 2 e 4 m, para a lateral do animal, tentando agarrá-lo na região do tronco, com um dos braços envolvendo o tórax logo atrás dos membros anteriores e outro braço na base do pescoço. O auxiliar se lançava em seguida, contendo o posterior do animal. Após a contenção manual do animal, o anestesista descia da aeronave para então proceder-se à sedação do animal (figura 5).

Figura 4 – Momento do salto do capturador na lateral do animal em movimento (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

Figura 5 – Anestesista chegando ao animal para a contenção química (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

Após a captura e a anestesia, os animais foram colocados em uma rede, em forma de saco (figura 6), içados pelo helicóptero (figura 7 e 8) e em seguida transportados para a base de campo, localizada numa área estratégica próxima, às margens do Rio Paraná, no Estado de São Paulo ou Estado do Mato Grosso do Sul.

Figura 6 –Animal sendo colocado em uma rede tipo saco (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

Figura 7 – Cervo-do-pantanal sendo içado pelo helicóptero para transporte (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

Figura 8 – Cervo-do-pantanal sendo transportado pelo helicóptero para a base de campo. (Foto: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos).

4.3 Caracterização da população animal estudada

Cada animal capturado recebeu um número por meio de marcação com brincos, os machos foram marcados do lado direito, e as fêmeas do esquerdo. Também foram implantados *transponders*, marca Tovan, na base da orelha.

A idade dos animais era estimada pelo tamanho do corpo do animal e pela avaliação da arcada dentária.

As coordenadas do local de captura foram estabelecidas utilizando-se o sistema de posicionamento global (GPS). Para o presente estudo, os animais (n = 217) foram divididos em seis subgrupos de acordo com o local da captura.

Na região entre as cidades de Quebracho e Bataguassú, foram realizadas duas capturas em tempos diferentes: uma antes da inundação, denominada MS1; e outra, dois anos após ter sido atingido o primeiro nível de enchimento do reservatório, denominada MS2. No MS1, 101 animais foram capturados, e na captura MS2, 32 animais.

Situação semelhante ocorreu na região do Rio do Peixe, onde duas capturas foram definidas: uma antes do enchimento do reservatório, denominado de PX1 e

outra, dois anos após ter sido atingido o primeiro nível de enchimento do reservatório, denominada PX2. No PX1, 28 animais foram capturados, e em PX2, 12 animais.

A região do rio Aguapeí foi nomeada de Aguapeí, onde 23 animais foram capturados, dois anos após ter sido atingido o primeiro nível de enchimento do reservatório. Essa região não foi diretamente afetada pelo enchimento do reservatório.

A região do complexo Cisalpina, consiste em uma área de cerca de 12.100 hectares, compreendendo a fazenda Cisalpina e a parte Sul da fazenda Flórida (de propriedade da Companhia Energética de São Paulo) que possui áreas de várzeas. Esta área de captura foi nomeado Cisalpina, e 21 animais foram capturados, dois anos após ter sido atingido o primeiro nível de enchimento do reservatório. o enchimento do reservatório da hidrelétrica teve um impacto pequeno na região de estudo.

4.4 Amostras

As amostras de soro sanguíneo dos cervos foram obtidas entre 1998 e 2001, durante a realização e execução do projeto de despovoamento de cervídeos da bacia do Rio Paraná para a construção do complexo de hidrelétricas de Porto Primavera, as quais pertencem a sorotéca de animais selvagens localizado no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, que foram gentilmente cedidas pelo seu coordenador Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, para a realização desta pesquisa.

4.4.1 Colheita de amostras de sangue

Um total de 217 cervos-do-pantanal foi capturado e de todos foram colhidos amostras de sangue. Outros animais também foram capturados, mas as informações sobre localização, idade e sexo não foram devidamente identificadas pela equipe. Mediante isso, no presente trabalho, o número amostral foi considerado como 217 porque, estas, apresentavam com todas às informações obtidas sobre os animais capturados.

Com o animal anestesiado e sob controle intensivo dos anestesistas da equipe, era realizada a colheita do material. O sangue foi colhido da veia jugular, com tubos a

vácuo de 10 mL, sem anticoagulante. Após a colheita, o material foi refrigerado até a chegada no laboratório de campo, montado na cidade de Presidente Epitácio, no Estado de São Paulo.

4.5 Processamento em laboratório de campo

Uma vez coletado, o sangue total foi levado a um laboratório montado na cidade de Presidente Epitácio (SP), que dispunha de equipamentos básicos para o processamento inicial das amostras com a finalidade de mantê-las em bom estado de conservação para que pudessem ser utilizados em outros estudos.

O sangue coletado em tubos sem anticoagulante foi centrifugado por 10 minutos a 800 G para a extração do soro sanguíneo. O soro foi então transferido e aliquotado em microtubos tipo microtubos de poliestireno de 1,5 mL e armazenado à temperatura de -20°C.

4.6 Preparo dos antígenos de *Leptospira*

Os antígenos das estirpes de *Leptospira* spp foram repicados semanalmente, em meio líquido de EMJH (Difco), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear. Para tanto, foi utilizada uma coleção de antígenos constituída por 23 sorovariedades de leptospiras patogênicas e duas sorovariedades de leptospiras não patogênicas (tabela 1). Foram utilizados apenas antígenos puros, isentos de contaminação e livres de autoaglutinação, e foram escolhidos por estimativa de densidade, contendo de 100 a 200 leptospiras por campo microscópico.

4.7 Técnica de soroaglutinação microscópica (SAM)

Os soros foram diluídos em solução tamponada de Sörensen, segundo técnica descrita por SANTA ROSA (1970), sendo a diluição inicial de 1/50. Dessa diluição, foram colocadas alíquotas de 25 µL em placas de poliestireno, com fundo chato e adicionada igual quantidade de antígeno, das 25 sorovariedades de *Leptospira*, resultando na diluição 1/100. A utilização de placas de poliestireno foi uma adaptação realizada pelo Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, com o objetivo

de usar menos antígeno sem interferir na diluição das amostras dos soros. A mistura soro-antígeno foi incubada em estufa bacteriológica à temperatura de 28°C, por 40 minutos, procedendo-se, a seguir, à leitura em microscopia de campo escuro, com objetiva de 100x.

O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de no mínimo 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiras aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. Os soros reagentes na triagem inicial foram reexaminados com oito diluições seriadas de razão dois e foram utilizados apenas os animais cujos soros apresentaram titulação mínima de 100. O título do soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição, que apresentou no mínimo 50% de aglutinação.

Tabela 1. Estirpes de *Leptospira* spp empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica à leptospirose, segundo o código, o sorogrupo e a sorovariedade, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Silvio de Arruda Vasconcellos (2010).

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

4.8 Análise estatística

Para verificar a proporcionalidade entre as 217 amostras de soros examinadas, duas categorias foram criadas: sexo (77 machos e 140 fêmeas) e idade (175 adultos e 42 jovens). Para divisão a por idade foram consideradas jovens as amostras cujo os animais que apresentavam até um ano e meio de vida, e adultos, as amostras dos animais que apresentavam idade superior a um ano e meio de vida. Os resultados sorológicos entre as categorias (sexo e idáde) obtidos com as 25 sorovariedades de *Leptospira* spp foram comparados, pelo teste do x^2 (qui-quadrado de Pearson). Todas as análises foram realizadas por meio do software R, de domínio público (R Development Core Team, 2010).

4.9 Geoprocessamento

A imagem de satélite foi obtida através de *download,* autorizado no site governamental *United States Geological Survey, Earth Resources Observation & Science Center*, o qual forneceu uma imagem do Satélite *Lansat* 1 (http://www.usgs.gov).

As informações geográficas dos animais capturados juntamente com a imagem foram processadas pelo sistema de informação geográfica MapInfo Professional Version 10.0 Ten Build 7 (32-bit), que permitiu verificar a dispersão espacial dos animais que tiveram amostras reagentes e não reagentes.

5. RESULTADOS

Das áreas onde ocorreram as capturas dos animais, a que apresentou maior número de amostras sororreagentes foi do Rio Aguapeí, com 95,65%, seguido respectivamente, por Cisalpina, com 66.67% e PX-01, com 57.14%.Pode-se também ressaltar que das 217 amostras de soro sanguíneo dos cervos-do-pantanal examinadas 59,91% apresentaram-se reagentes (tabela 2).

Tabela 2. Número e porcentagem das amostras reagentes e não reagentes dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias de acordo com a localização de sua captura, 1998 - 2001.

ÁREAS	Reagentes		Não Reagentes		Total
	Nº	%	Nº	%	
MS-01	56	**55,45**	45	**44,55**	101
MS-02	16	**50,00**	16	**50,00**	32
PX-01	16	**57,14**	12	**42,86**	28
PX-02	6	**50,00**	6	**50,00**	12
Aguapeí	22	**95,65**	1	**4,35**	23
Cisalpina	14	**66,67**	7	**33,33**	21
Total	130	**59,91**	87	**40,09**	217

Na tabela 3 verifica-se que nas 130 amostras reagentes que apresentaram títulos sorológicos, estes variaram de 100 a 800. Com relação ao título 100, a sorovariedade Autumalis foi a mais frequente com 31,54% de ocorrência. As sorovariedades de maior ocorrência que apresentaram títulos sorológicos 200 foram: Castellonis (6,15%), Hardjo (3,08%) e Pyrogenes (3,08%). Os títulos 400 e 800 foram detectados, respectivamente, para as sorovariedades Castellonis (5,38%) e Hardjo (1,54%). Os títulos sorológicos 100 (66,92%) foi o mais frequente, seguidos pela ordem de 200 (22,31%), 400 (9,23%) e 800 (1,54%). Ressalta-se que das 25 sorovariedades utilizadas como antígenos na prova de SAM, somente contra 12 foram detectados anticorpos.

Tabela 3. Números e porcentagem de amostras reagentes de acordo com a sorovariedade e o título sorológico encontrado nos cervos-do-pantanal, capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

SOROVARIEDADES	TITULOS								Total
	100		200		400		800		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Autumnalis	**41**	31,54	**3**	2,31	**0**	0,00	**0**	0,00	44
Castellonis	**14**	10,77	**8**	6,15	**7**	5,38	**0**	0,00	29
Hardjo	**19**	14,62	**4**	3,08	**1**	0,77	**2**	1,54	26
Grippotyphosa	**4**	3,08	**2**	1,54	**1**	0,77	**0**	0,00	7
Pyrogenes	**1**	0,77	**4**	3,08	**2**	1,54	**0**	0,00	7
Bratislava	**1**	0,77	**3**	2,31	**0**	0,00	**0**	0,00	4
Copenhageni	**2**	1,54	**1**	0,77	**0**	0,00	**0**	0,00	3
Pomona	**1**	0,77	**2**	1,54	**0**	0,00	**0**	0,00	3
Wolffi	**1**	0,77	**1**	0,77	**1**	0,77	**0**	0,00	3
Australis	**1**	0,77	**1**	0,77	**0**	0,00	**0**	0,00	2
Canicola	**1**	0,77	**0**	0,00	**0**	0,00	**0**	0,00	1
Javanica	**1**	0,77	**0**	0,00	**0**	0,00	**0**	0,00	1
TOTAL	**87**	66,92	**29**	22,31	**12**	9,23	**2**	1,54	130

A tabela 4 e o gráfico 1 mostram as porcentagens das sorovariedades de leptospiras encontradas nas amostras examinadas, comparando as porcentagens em relação ao total de amostras de animais examinadas (n=217) com o total de amostras reagentes (n=130). As sorovariedades de maior predominância foram Autumnalis, Hardjo, Castellonis e Pyrogenes, respectivamente, com 20,28%, 11,98%, 13,36% e 3,23%, do total de amostras colhidas (n=217). Com relação às amostras reagentes (n=130), manteve-se a predominância das mesmas sorovariedades abaixo descritas apresentaram os porcentuais de: 33,85%, 20%, 22,31% e 5,38%. As sorovariedades com menos porcentagem encontradas foram Canicola, Javanica e Australis, respectivamente com, 0,46%, 0,46% e 0,92%, do total de amostras colhidas e 0,77%, 0,77% e 1,54% do total de amostras reagentes. Ainda na tabela pode-se verificar que do total de 217 amostras examinadas, 59,91% foram reagentes para diferentes sorovariedades de *Leptospira interrogans*.

Tabela 4. Porcentagens das sorovariedades encontradas nas amostras reagentes dos cervos-do-pantanal, capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

SOROVARIEDADES		Porcentagem	
	Total	%[a]	%[b]
Autumnalis	44	20,28	33,85
Castellonis	29	13,36	22,31
Hardjo	26	11,98	20
Pyrogenes	7	3,23	5,38
Grippotyphosa	7	3,23	5,38
Bratislava	4	1,84	3,08
Copenhageni	3	1,38	2,31
Pomona	3	1,38	2,31
Wolffi	3	1,38	2,31
Australis	2	0,92	1,54
Canicola	1	0,46	0,77
Javanica	1	0,46	0,77
Total	130	59,91	100

%[a]: Porcentagem das amostras de cervos sororreagentes do total amostral (n = 217)
%[b]: Porcentagem das amostras cervos sororreagentes do total amostral (n = 130)

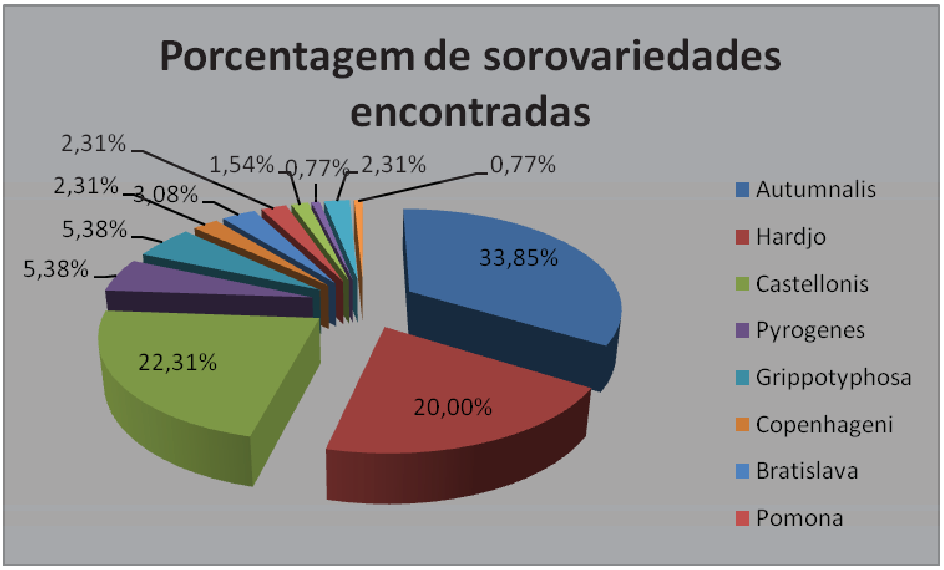

Gráfico 1 - Porcentagem das sorovariedades segundo as amostras reagentes (n=217) contra *Leptospira* spp dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

5.1 Análise de proporcionalidades

Das 217 amostras analisadas, (tabela 5 e gráfico 2), 77 eram de machos e 140 de fêmeas. Destas amostras, 52 (67,5%) eram de machos reagentes e 78 (55,7%) de fêmeas reagentes para um ou mais sorovariedades de leptospiras. As amostras não reagentes eram de 25 (32,5%) de machos e 62 de fêmeas (44,3%). O teste do qui-quadrado de Pearson mostrou que a proporcionalidade de amostras foi de p=0,12. Esse resultado obtido revelou que as amostras entre machos e fêmeas reagentes e não reagentes não foram estatisticamente significativas.

Tabela 5. Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova de SAM contra *Leptospira* spp de acordo com o sexo dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

	Machos		Fêmeas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Reagentes	52	67,5	78	55,7	130	59,9
Não reagentes	25	32,5	62	44,3	87	40,1
Total	77	100	140	100	217	100

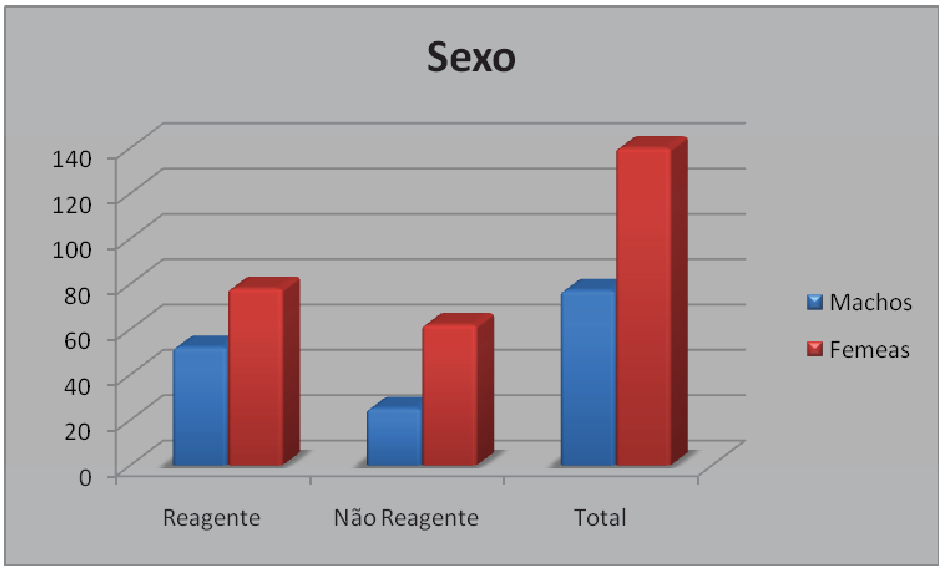

Gráfico 2 - Proporção de amostras de machos e fêmeas reagentes e não reagentes dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

Na tabela 6 e no gráfico 3 pode-se verificar que das 42 amostras de animais jovens, 16 foram reagentes, sendo 6 (38%) de machos e 10 (39%) de fêmeas. O resultado do teste x^2 de Pearson não apresentou diferença estatísticamente significativa (p=0,7911) entre os animais jovens do sexo masculino e feminino. Assim, tanto machos como fêmeas jovens apresentam, naquela situação, a mesma probabilidade de serem infectados.

Tabela 6. Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova de SAM para *Leptospira* spp em machos e fêmeas de cervos-do-pantanal jovem capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

	Jovens					
	Machos		Fêmeas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Reagentes	6	38	10	39	16	38
Não reagentes	10	63	16	62	26	62
Total	16	100	26	100	42	100

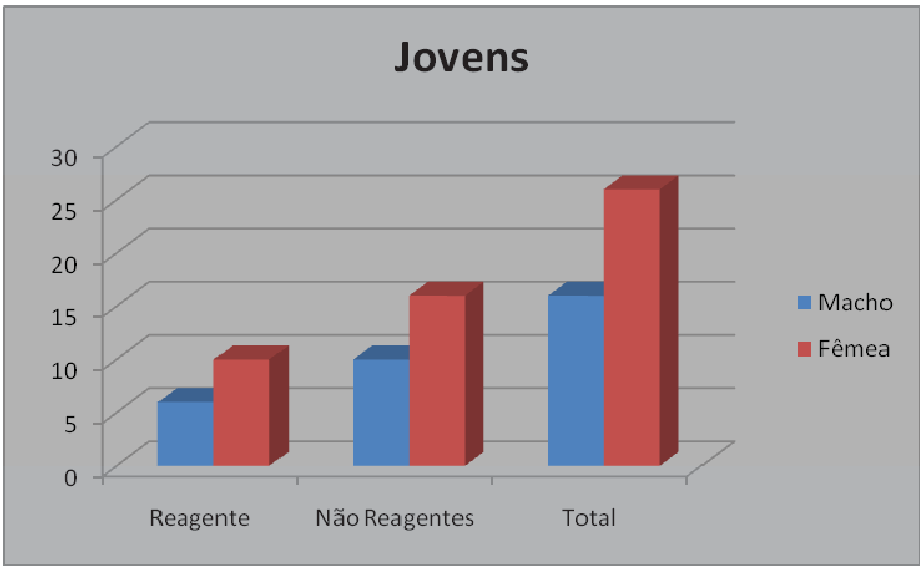

Gráfico 3 – Proporção de amostras de machos e fêmeas reagentes e não reagentes de cervos-do-pantanal jovem capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

Na tabela 7 e no gráfico 4 está demonstrado o número total de amostras de soro sanguíneo dos animais considerados adultos, ou seja, com idade superior a um ano e seis meses. Das 61 amostras de machos adultos, 46 (75,4%) foram reagentes e 15 (24,6%) não reagentes. Das 114 amostras de soro sanguíneo de fêmeas adultas, 68 (59,6%) foram reagentes. Das 61 amostras de soro dos machos adultos, 46 (75,4%) foram reagentes.

Os resultados obtidos entre as amostras de machos e fêmeas adultos sugerem que não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos (p = 0,0550), considerando-se cervos-do-pantanal em idade adulta.

Tabela 7. Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova de SAM contra *Leptospira* spp em machos e fêmeas de cervos-do-pantanal adultos capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

	Adultos					
	Machos		Fêmeas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Reagente	46	75,4	68	59,6	114	65,1
Não reagente	15	24,6	46	40,4	61	34,9
Total	61	100	114	100	175	100

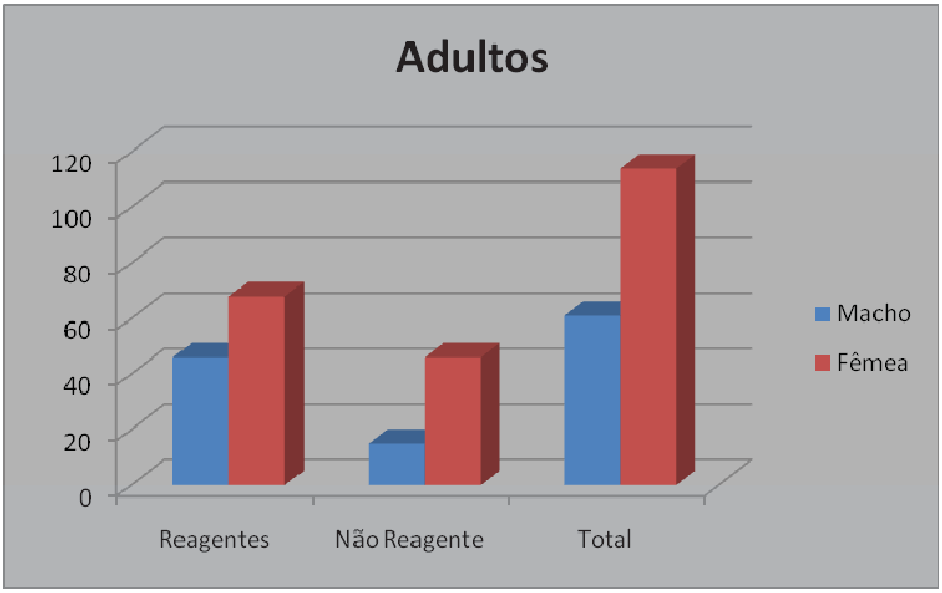

Gráfico 4 - Proporção entre amostras de machos e fêmeas reagentes e não reagentes de cervos-do-pantanal adultos capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

A tabela 8 e o gráfico 5 mostram a comparação entre os resultados obtidos nas amostras de animais adultos e jovens. Observa-se na tabela que, 114 (65,1%) das amostras dos soros sanguíneos dos animais adultos e 16 (34,9%) das de animais jovens, foram reagentes. Pode-se verificar que 87 amostras entre adultos e jovens foram não reagentes, sendo 61 (34,9%) de adultos e 26 (61,9%) de jovens. O teste de x^2 de Pearson relevou significância estatística ($p < 0,01$) entre as faixas etárias.

Tabela 8. Número e porcentagem de amostras reagentes e não reagentes na prova da SAM contra *Leptospira* spp de cervos-do-pantanal adultos e jovens capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

	Adultos		Jovens		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Reagente	114	65,1	16	38,1	130	59,9
Não reagente	61	34,9	26	61,9	87	40,1
Total	175	100	42	100	217	100

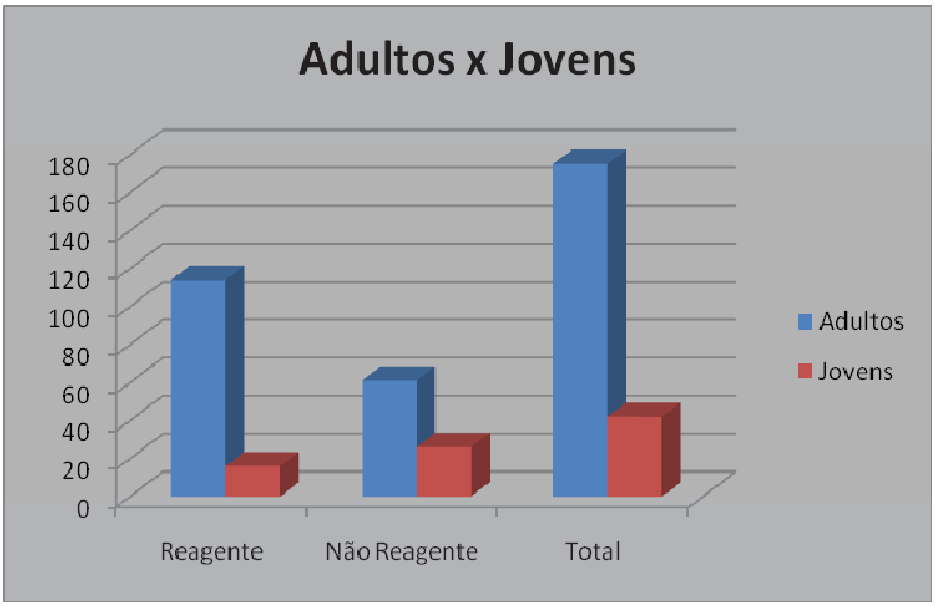

Gráfico 5 - Proporção entre amostras reagentes e não reagentes de cervos-do-pantanal adultos e jovens capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias.

Observa-se na figura 9 os locais marcados, em amarelo, onde ocorreram as capturas dos cervídeos na bacia do Rio Paraná. Os deslocamentos dos cervos-do-pantanal eram realizados em grupos por meio dos pastos onde também habitam rebanhos de bovinos.

Na figura 10 apresenta-se a localização geográfica ao longo da bacia do Rio Paraná, dos cervídeos capturados que apresentaram amostras reagentes, marcação em vermelho.

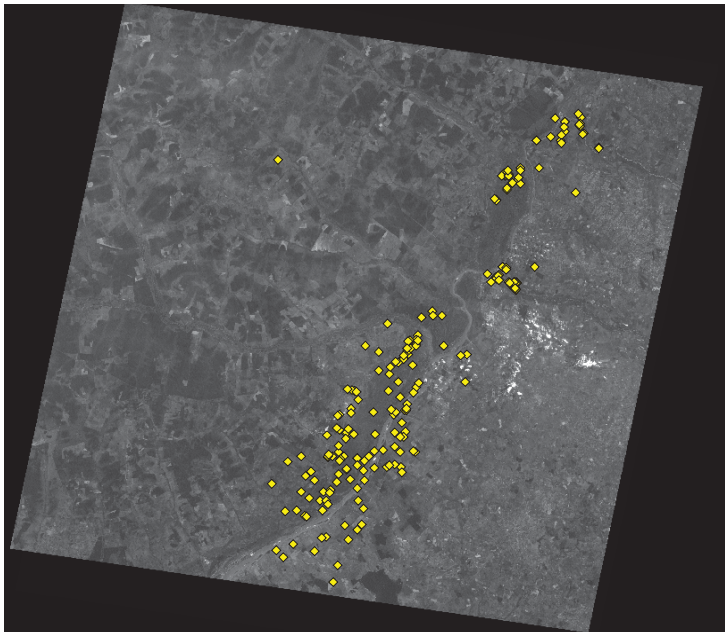

Figura 9 - Imagem de satélite com informações do georreferenciamento dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

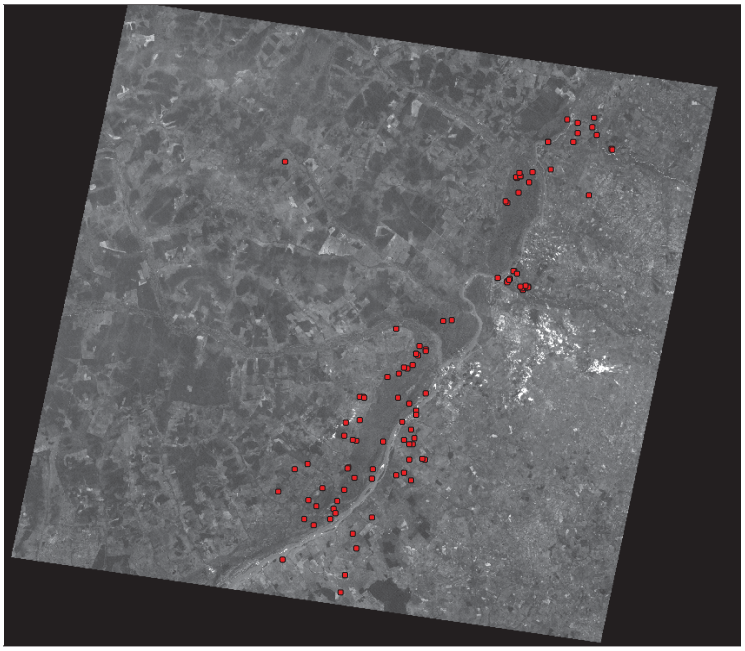

Figura 10 - Imagem de satélite com informações do georreferenciamento de cada amostra reagente contra *Leptospira* spp dos cervos-do-pantanal capturados na bacia do Rio Paraná entre as UHE de Engenheiro Sérgio Motta e Engenheiro Souza Dias, 1998-2001.

6. DISCUSSÃO

Embora o material tenha sido colhido há mais de dez anos, deve-se levar em consideração que são raras as oportunidades de acesso a populações de animais selvagens, especialmente em amostragens com essa abrangência. Mesmo não sendo recente, o soro desses animais pode fornecer informações úteis, que contribuirão com o conhecimento da história natural da leptospirose naquele ambiente.

Esses animais apresentam um deslocamento constante de região para região, às vezes podem dividir a mesma pastagem com rebanhos bovinos, e com outras espécies de animais selvagens, principalmente com grupos de capivaras. Na época da colheita, o ambiente que habitavam todas as espécies citadas propiciava a possibilidade dos animais portadores renais eliminarem as leptospiras pela urina e a transmissão ocorrer devido ao contato com a água das pastagens.

De acordo com ACHA; SZYFRES (2001), os roedores são considerados portadores universais de leptospiras e o contato com a água contaminada com a sua urina pode ser o meio de transmissão mais importante da leptospirose. Na espécie bovina, a infecção por leptospiras pode causar altos prejuízos econômicos, com queda na produção de leite, de carne e abortamentos (BLOOD; RADOSTITS, 1989).

Foi possível identificar a área de captura das 217 animais estudadas, esses estavam distribuídos em 6 locais ao longo da bacia do Rio Paraná, entre as UHE de Porto Primavera e Jupiá, tanto na margem paulista, quanto na margem sul matogrossense. Pela prova de SAM, detectou-se 59,1% de amostras reagentes, a área que apresentou maiores índices foi Aguapei, região com possível impacto ambiental, pois, é a que esta mais próxima da barragem da UHE de Jupiá. Esses achados mostram a possibilidade de disseminação das sorovariedades de leptospiras patogênicas na bacia do rio Paraná entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, como pode-se verificar nas imagens de satélite com as informações do georreferenciamento sobre a dispersão dos cervos-do-pantanal, que apresentaram amostras reagentes em toda a extensão da bacia (figuras 9 e 10).

Os títulos sorológicos verificados nas amostras variaram de 100 a 800 (tabela 3). Esses resultados são similares com os de GIRIO et al. (2004) obtidos em amostras de

veados-campeiros em estado feral da região de Nhecolândia, MS. O que difere dos encontrados, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul por MATHIAS et al. (1999) título máximo de 400, e por UHART et al. (2003) em amostras de veados-campeiros de vida livre oriundas, respectivamente, dos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul e na região dos Campos del Tuyú na Argentina, entre os anos de 1995 e 1998. A interpretação desses títulos sorológicos pode ser considerada como uma infecção passageira ou uma imunidade de memória ou ainda um estágio inicial da leptospirose (FAINE, 1999).

Pode-se também considerar até uma infecção crônica e com isso reforçar a importância das espécies veado-do-pantanal e veado-campeiro, na manutenção da leptospira no ambiente dessas regiões (VASCONCELLOS, 1987; FAINE, 1999).

Do total de amostras examinadas (n= 217), 130 foram reagentes contra 12 diferentes sorovariedades de leptospiras patogênicas. A sorovariedade Autumnalis foi a de maior frequência, 33,85%, seguida pelas sorovariedades Castellonis com 22,31% e Hardjo com 20,0%. A sorovariedade Autumnalis também foi a mais frequente (36,8%) encontrada por SILVA et al. (2010), em cervídeos em estado cativo. Resultados diferentes em amostras de cervídeos de vida livre que habitam várias regiões, mostram outras sorovariedades de leptospiras patogênicas como as mais frequentes, MATHIAS et al. (1999) encontraram Hardjo (24,0%), GIRIO et al. (2004) Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (9,7%), TONIN et al. (2010) em um única amostra encontrou Butembo e Bratislava e ESPÍ et al. (2010) encontrou Pomona (5,8%) e Muenchen (2,6%). Essa diversidade de sorovariedades, que podem infectar cervídeos, deve estar relacionada com o ambiente que pode encontrar-se em desequilíbrio, e/ou onde co-habitam com outras espécies em estado selvagem ou ainda por dividirem o mesmo espaço com rebanhos de bovinos e/ou com roedores, entre eles as capivaras.

Quanto ao sexo (tabela 5), os resultados demonstraram que as amostras reagentes de fêmeas (78 – 55,7%) foram maiores que a dos machos (52 – 67,5%), tanto jovens como adultos. A análise de proporcionalidade realizada pelo teste de x^2 de Pearson entre as amostras de fêmeas e machos mostram que não houve dependência entre os sexos dos cervídeos e a porcentagem de reagentes. As diferenças de amostragem observadas entre fêmeas e machos são justificáveis pelo fato de nasceram

mais fêmeas do que machos e que em ambos os sexos independentemente da idade, jovem ou adulto, a probabilidade de se infectarem é igual (tabelas 6 e 7).

Mas, quando se comparou a porcentagem de amostras reagentes de cervídeos adultos (65,16%) com a de jovens (38,1%), o teste do x^2 de Pearson foi estatisticamente significativo ($p<0,01$), o que caracteriza que há independência entre as idades dos animais de se infectarem. Isso pode estar relacionado com o período das colheitas de amostras quando havia maior número de animais adultos do que jovens (tabela 8). A despeito disso outro fator que poderia estar estritamente ligado seria a longevidade dos animais e com isso proporcionarem uma maior probabilidade de contrair a infecção, indicando que, em regiões com áreas contaminadas, o risco de se adquirir a infecção aumenta com o passar do tempo (BLAHA, 1995 e CORRÊA et al., 2004).

7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

1) Das 217 amostras examinadas pela prova de SAM, 130 (59,91%) foram reagentes;

2) Das 25 sorovariedades de leptospiras utilizadas como antígeno na prova de SAM, contra 12 sorovaridades patogênicas foi possível detectar anticorpos;

3) Do total de amostras examinadas, as sorovariedades reagentes encontradas, por ordem de maior frequência foram: Autumnalis (33,85%), Castellonis (22,31%) e Hardjo (20,0%);

4) Os títulos sorológicos encontrados variaram de 100 a 800, sendo o título de 100 o mais frequente ocorrendo em 87 (66,92%) amostras;

5) Não houve diferença significativa ($p=0,0550$) de sororreagentes com relação ao sexo, 67,5% para os machos e 55,7% para as fêmeas;

6) Houve diferença estatística ($p<0,01$) de sororreagentes em relação a idade dos animais sororreagentes, 65,1% para adultos e 34,9% para jovens;

7) Na extensão da bacia do rio Paraná entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, por meio das imagens de satélite com as informações do georreferenciamento, comprovou a dispersão dos cervos-do-pantanal de vida livre, que apresentaram amostras reagentes contra sorovariedades de *Leptospira interrogans*.

8. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**, 3. ed., Washington, Organizacion Panamericana de La Salud, v. 1, p. 508, 2001.

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R. S. F.; PATH, M. R. C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletins**, v. 45, n. 12, p. 875-891, 1975.

ANDRADE, J. Aspectos bacteriológicos e sorológicos. In: Encontro Nacional de Leptospirose, 1., 1986, Salvador, Bahia. **Anais**. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, p. 32-33, 1993.

ANDRADE, T. M. Títulos de anticorpos contra Lesptospira spp e análise bioquímica no soro sangüíneo em macaco prego (*Cebus apella nigritus*). 2007, 62p. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2008

BLAHA, T. **Epidemiologia especial veterinária**. São Paulo: Acribia, 1995, p. 128-136.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Veterinary Medicine.** 7 ed. London: Baillère Tindall, 1989, p. 758-769.

BROD, C. S.; ALEIXO, J. A. G.; JOUGLARD, S. D. D.; FERNANDES, C. P. H.; TEIXEIRA, J. L. R. S.; DELLAGOSTIN, O. A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovariedade , caracterização molecular e utilização em inquérito. **Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 294-300, 2005.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de métodos para el diagnóstico de laboratório de la leptospirosis**. Washingtonm 1985. 46 p. (Nota técnica, 30).

CHAPPEL, R. J.; PRIME, R. W.; MILLAR, B. D.; JONES, R. T.; CUTLER, R. S.; ADLER, B. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 235-242, 1998.

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

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, Northen Spain. **The Veterinary Journal**, London, v. 183, p. 226-227, 2010.

ESTEVES, F. M.; GUERRA-NETO, G; GIRIO, R. J. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; CARVALHO, A. C. F. B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 283-288, 2005.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed., Melbourne: CRC Press, 1999, p. 353.

FURTADO, L. R. I.; ÁVILA, M. O.; FEHLBERG, M. F. B.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina no município de Pelotas. Rio Grande do Sul. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, p. 57-61, 1997.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; MARCHIORI-FILHO, M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato

Grosso do Sul, Brasil. Utilização de técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.

GUERRA-NETO, G. Freqüência de anticorpos contra Leptospira spp em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil. 2006. 62 p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Jaboticabal. 2006.

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 da Itaipu Binacional e ao Zoológico Municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, Estado do Paraná. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p.75 – 80, 2004.

HIGGINS, R. J.; HARBOUNE, J. F.; LITTLE, T. W. A.; STEVENS, A. E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with Leptospira of serotype hardjo. **Veterinary Record**, London, v. 27, n. 9, p. 307-309, 1980.

LEVETT, P. N.; SMYTHE, L. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Leptospiraceae*: Minutes of the closed meeting, 18 September 2007, Quito, Ecuador. **International Journal Of Systematic and Evoluntionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 4, p. 1049-1050, 2008.

KMETY, E.; DIKKEN, H. Classification of the species of *Leptospira interrogans* and history of its serovars. **University Press Groningen**, Groningen, 1993.

LILENBAUM, W.; MONTEIRO, R. V.; RISTOW, P.; FRÁGUAS, S; CARDOSO, V. S.; FEDULLO, L. P. L. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zôo, Brazil. **Research in Veterinary Science,** London, v. 73, n. 3, p. 319-321, 2002.

LUNA-ALVARES, M. A.; MOLES-CERVANTES, L. P.; TORRES-BARRANCA, J. I.; GUALL-SILL, F. Investigacíon sexológica de lepstospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio em el zoológico de Chapultepec de la Cuidad de México. **Veterinaria México**, Cuidad de México, v. 27, n. 3, p. 229-324, 1996.

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S.; DUARTE, J. M. B. Serosurvery for antibody against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **Journal of Wildlife Disease**, Ames, v. 35, n. 1, p.112-114, 1999.

MICHNA, S. W. Leptospirosis. **Veterinary Record**, London, v. 86, n. 17, p. 484-496, 1970.

MICHNA, S. W.; CAMPBEL, R. S. F. Leptospirosis in wild animals. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 38, n 7, p. 440 - 442, 1997.

NARDI, M. S.; TÓFOLI, C. F.; AZEVEDO, R. M.; FERREIRA-NETO, J. S.; SOUZA, G. O.; MORAIS, Z. M.; FERREORA, F. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) em corredores agroflorestais e remanescentes de Mata Atlântica da região do Pontal do Paranapanema, São Paulo. **Anais do XII Congreso -XVIII Encontro ABRAVAS**. p. 100, 2009.

NAVA, A. Espécies Sentinela: o estudo de caso do Pontal do Paranapanema. **Natureza & Conservação**. v. 3, n. 2, p. 142-143, 2005.

NAVA, A. Espécie sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo, f 147, **Teste (Doutorado em Medicina Veterinária)**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo., São Paulo, 2008.

NAVA, A.; PETERKA, C. R. L.; BANDEIRA, D. S.; CULLEN, L. JR.; FERREIRA, F.; PEDRO, P.; CORTEZ, A.; MORAES, Z. M. DE; SOUZA, G. O. DE; NETO-FERREIRA, J.

S. Sentinel species: The Pontal do Paranapanema Study. **Newsletter of WPSG, PSG and HCG**, v. 5, n. 2, 2005.

NOGUCHI, H. The survival of Leptospira (Spirochaeta) icterrohaemorrhagiae in nature: Observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 27, n. 3, p. 609-625, 1918.

ORGANIZACÍON PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Análisis del proyecto de presupuesto por programas del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis para 1998-1999 y 2000-2001, p. 37 in: **RISMA 10/8**, Washington, 1997.

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

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

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

REILLY, J.R.; FERRIS, D.H.; HANSON, L.E. Experimental demonstration of the enteric route of infection with *Leptospira grippotyphosa* in wild carnivores. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 29, n. 9, p. 1849-1854, 1968.

SANTA-ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 97-109, 1970.

SANTOS-SILVA, C.; GIRIO, R. J. S.; GUERRA-NETO, G.; BRICH, M.; SANTANA, L. A. S.; AMANCIO, 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 237-242, 2010.

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

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

STRAUBE, M.; BAUERFEIND, R.; RIETSCHE, L. Epidrmiological investigation of leptospirosis in zoological gardens. in: **5° SCIENTIFIC MEETING EUROPEAN ASSOCIATION OF ZOO AND WILDLIFE VETERINARIANS (EAZWV)**, Ebeltoft, p. 19-23, 2004.

SULZER, C. R.; JONES, W. L. **Leptospirosis**: method in laboratory diagnosis Atlanta: Center of Diseases Control, U.S., 1980. 40 p.

TONIN, A. A.; AZEVEDO, M. E. de; SILVA, A. S. da; SANTOS, L. G. dos; JUNIOR-MOURA, J. de. Infection in the Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) by four serotype of *Leptospira interrogans*. **Comparative Clinical Pathology**, Santa Barbara, p. 1-2, 2010. <doi: 10.1007/S00580-010-1100-8>

UHART, M. M.; VILA, A. R.; BEADE, M. S.; BALCARCE, A.; KARESH, W.B. Health evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 39, n. 4, p. 887-893. 2003.

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