

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS EM ONÇAS-
PARDAS (*Puma concolor*) DE VIDA LIVRE NA BACIA
DO RIO TIETÊ, SÃO PAULO, BRASIL**

PAOLLA NICOLE FRANCO

BOTUCATU – SP

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS EM ONÇAS-
PARDAS (*Puma concolor*) DE VIDA LIVRE NA BACIA
DO RIO TIETÊ, SÃO PAULO, BRASIL**

PAOLLA NICOLE FRANCO

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Animais Selvagens
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Franco, Paolla Nicole.

Pesquisa de agentes infecciosos em onças-pardas (*Puma concolor*) de vida livre na bacia do rio Tietê, São Paulo, Brasil / Paolla Nicole Franco. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Roberto Teixeira

Capes: 50502034

1. Animais selvagens - Doenças. 2. Puma. 3. Felidae.
4. Doenças infecciosas.

Palavras-chave: Conservação; Doenças infecciosas; Felidae;
In situ.

Nome do autor: **Paolla Nicole Franco.**

Título: **Pesquisa de agentes infecciosos em onças-pardas (*Puma concolor*) de vida livre na Bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/BOTUCATU

Dr. Rodrigo Hidalgo Friciello Teixeira

Departamento de Medicina Veterinária

Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” – PZMQB

Dr^a. Sandra Maria Cintra Cavalcanti

Coordenadora do Projeto “Pardas do Tietê”

Instituto para Conservação dos Carnívoros Neotropicais – Pró-Carnívoros

Data da defesa: 02 de abril de 2021.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sonia e Wilson, pelos ensinamentos, educação, formação e, acima de tudo, pelo amor incondicional. Obrigada por compreenderem a importância da minha profissão, minha distância e ausência em momentos importantes.

Aos meus irmãos, Bruno e Fábio, por me apoiarem em minhas decisões e me incentivarem.

Ao meu namorado, Daniel Felippi, pelo companheirismo, apoio e paciência, e também por não me deixar desanimar diante de tantos obstáculos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos R. Teixeira, pela confiança, sabedoria e por acreditar em mim e em minhas escolhas.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Projeto Pardas do Tietê, em especial a Sandra Cavalcanti, por acreditar no meu trabalho e investir na minha formação como pesquisadora. Agradeço a oportunidade de ter atuado junto à equipe durante as expedições de campo, e por todo o conhecimento compartilhado e momentos inesquecíveis.

Ao CENAP/ICMBio, pelo armazenamento e separação das amostras biológicas das onças-pardas, especialmente a Rose Lilian Gasparini Morato.

Aos residentes e ex-residentes do CEMPAS, pela coleta das amostras de soro e disponibilização das fichas clínicas dos animais atendidos na Instituição.

Ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ/UNESP – Botucatu, em especial às residentes Dayane e Carol, pela análise das amostras.

Ao Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, da Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao residente Pablo Castilho e ao Prof. Luiz Daniel de Barros, pelo auxílio na realização dos testes sorológicos para toxoplasmose.

Às empresas SocelVet e IDEXX, pela parceria e apoio na disponibilização dos testes para diagnóstico de FIV e FeLV.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem participar desta fase importante em minha vida e sem dúvida enriquecer este trabalho.

Aos amigos que estiverem presentes, neste ano tão difícil. Serei sempre grata pelo carinho, apoio, palavras de motivação e compreensão.

Agradeço à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a minha formação e aprendizado, assim como no desenvolvimento deste projeto. Vocês foram peças fundamentais na minha trajetória.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Infectious agents in free-ranging cougars (<i>Puma concolor</i>) around the region of the Tietê River Basin, in the State of São Paulo, Brazil.....	46
TABELA 2. <i>Leptospira</i> serovars tested by microscopic agglutination test (MAT). Laboratory of the Zoonosis Diagnosis Service – Botucatu/SP, Brazil.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Study area location. Indication of the sampling sites along the Tietê river basin.....	48
FIGURA 2. Occurrence of <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Leptospira</i> spp. (serovar Djasiman) and FIV infections in the State of São Paulo, Brazil.....	49

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	3
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	5
1 Aspectos gerais da onça-parda – <i>Puma concolor</i> (Linnaeus,1771).....	5
2 Doenças infecciosas em carnívoros selvagens.....	8
2.1 Patógenos pesquisados.....	9
2.1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	9
2.1.2 <i>Leptospira</i> spp.....	11
2.1.3 Vírus da leucemia felina (FeLV)	13
2.1.4 Vírus da imunodeficiência felina (FIV)	14
CAPÍTULO III – ARTIGO CIENTÍFICO.....	16
Abstract.....	17
1 Introduction.....	18
2 Methods.....	20
2.1 Study Area.....	20
2.2 Animals.....	20
2.3 Sample Collection.....	21
2.4 Serological Analyses.....	22
2.5 Statistical Analyses.....	24
3 Results.....	24
4 Discussion.....	25
5 Conclusion.....	32
6 References.....	34
Tables.....	46
List of Figure.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	50

FRANCO, P.N. Pesquisa de agentes infecciosos em onças-pardas (*Puma concolor*) de vida livre na Bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil. Botucatu, 2021. 56 p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As constantes alterações ambientais ocasionadas por fatores antrópicos tem provocado mudanças na relação patógeno-hospedeiro. A emergência ou re-emergência de muitas doenças infecciosas e parasitárias associadas à degradação do *habitat* natural, podem causar sérios impactos na conservação de diversas espécies selvagens. A exposição desses animais à importantes agentes zoonóticos representa, ainda, uma ameaça à Saúde Pública. A onça-parda (*Puma concolor*) vem sofrendo diversas ameaças nas últimas décadas e enfrenta intenso declínio populacional em diferentes regiões. Pouco se sabe a respeito do impacto da circulação dos patógenos nessa espécie. Diante deste cenário, o presente estudo teve como objetivo realizar um inquérito sorológico para avaliar a circulação de quatro agentes infecciosos selecionados, em 27 onças-pardas de vida livre, oriundas de municípios situados próximos à bacia do Rio Tietê, no Estado de São Paulo. As análises incluíram a pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., FIV e FeLV, utilizando-se o teste de aglutinação modificada (MAT), a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a pesquisa viral, respectivamente. Os resultados evidenciaram a ocorrência de três destes patógenos nos animais avaliados. A infecção por *T. gondii* foi a mais prevalente, observando-se soropositividade em 59,3% (16/27) dos animais. Anticorpos contra *Leptospira* spp. e FIV também foram detectados, ambos com soroprevalência de 11,1% (3/27). Nenhuma amostra foi reagente para FeLV. Os resultados deste estudo indicam que a onças-pardas estão expostas à diversos agentes etiológicos, alguns potencialmente patogênicos para a espécie, ressaltando a necessidade de monitoramento constante do perfil epidemiológico destes animais, especialmente em áreas altamente fragmentadas.

Palavras-chave: Felidae; Doenças infecciosas; *In situ*; Conservação.

FRANCO, P.N. Pesquisa de agentes infecciosos em onças-pardas (*Puma concolor*) de vida livre na Bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil. Botucatu, 2021. 56 p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The environmental changes caused by anthropic factors have caused changes in the host-pathogen relationship. The emergence or re-emergence of many infectious and parasitic diseases associated with the degradation of the natural *habitat*, may have serious impacts on the conservation of several wild species. The exposure of animals to important zoonotic agents still represents a threat to Public Health. The cougar (*Puma concolor*) has suffered several threats in the last decades and it faces an intense population decline in different regions. Little is known about the impact of the circulation of pathogens on this species. Given this scenario, the present study aimed to conduct a serological survey to assess the circulation of four potentially pathogenic agents for felids, in 27 free-living cougars, from municipalities located near the Tietê River basin, in the State of São Paulo. The analyzes included the search for antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., FIV and FeLV, using the modified agglutination test (MAT), the microscopic agglutination test (MAT) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the viral research, respectively. The results showed the occurrence of three of these pathogens in the animals evaluated. Infection with *T. gondii* was the most prevalent one, with seropositivity being observed in 59.3% (16/27) of the animals. Antibodies against *Leptospira* spp. and IVF were also detected, both with 11.1% seroprevalence (3/27). No sample was reagent for FeLV. The results of this study indicate that pumas are exposed to several potentially pathogenic agents for the species, highlighting the need for constant monitoring of the epidemiological profile of these animals, especially in highly fragmented areas.

Key words: Felidae; Infectious diseases; *In situ*; Conservation.

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A família Felidae, pertencente à Ordem Carnivora, é constituída por mais de 40 espécies distribuídas mundialmente, com exceção da Austrália e Antártica (Hunter & Barrett, 2018), sendo representada no Brasil por quatro gêneros (*Panthera* spp., *Puma* sp., *Herpailurus* sp. e *Leopardus* spp.) (Cheida et al., 2006). Apesar da sua ampla distribuição geográfica, a abundância de muitas populações vem diminuindo e quase todas as espécies encontram-se ameaçadas de extinção em algum grau (Adania, Silva & Felipe, 2014).

A redução e fragmentação do *habitat*, os atropelamentos, tráfico ilegal e contínua pressão pela caça e abate são as principais ameaças para a sobrevivência dos felídeos (Adania, Silva & Felipe, 2014). Adicionalmente, deve-se considerar o impacto das doenças infecciosas sobre as populações *in situ*, tendo em vista que estas são particularmente relevantes para a conservação dos carnívoros e representam uma ameaça à biodiversidade (Lafferty & Gerber, 2002; Smith, Behrens & Sax, 2009).

Os processos mórbidos podem ser agravados em populações pequenas ou isoladas, quando somados a outros fatores, como má nutrição, estresse e endogamia, aumentando significativamente a mortalidade dos indivíduos (Pedersen et al., 2007). Declínios populacionais relacionados a surtos epidêmicos causados por agentes patogênicos já foram relatados em diversas espécies de carnívoros selvagens, indicando a necessidade de integrar a epidemiologia na conservação e manejo desses animais (Alexander & Appel 1994; Roelke-Parker et al., 1996).

No Brasil, estudos a respeito da exposição de felídeos silvestres a agentes infecciosos e parasitários em vida livre vem sendo desenvolvidos nos últimos anos (Filoni et al., 2006; Nava, 2008; Widmer, 2009; Jorge et al., 2011). No entanto, o conhecimento a respeito do impacto da circulação dos patógenos nessas populações ainda é restrito. Durante uma compilação de publicações sobre a ordem Carnivora, entre 2013 e 2017, Tensen (2018) observou que apenas 18% dos dados científicos publicados sobre felídeos silvestres eram voltados para fatores relacionados à saúde e doenças.

Além do impacto às populações selvagens, há a preocupação com a transmissão de alguns destes agentes à população humana e de animais domésticos, tendo em vista a participação dos animais silvestres como reservatórios ou portadores de zoonoses (Acha & Szyfres, 2003). As alterações ambientais têm provocado mudanças na relação patógeno-hospedeiro e, com isso, o aumento da proximidade entre seres humanos, animais domésticos e selvagens pode levar à disseminação de diversos patógenos e ao surgimento de doenças emergentes ou re-emergentes (Jorge et al., 2010).

Considerando o grau de vulnerabilidade em que os felídeos neotropicais estão inseridos, o monitoramento contínuo de potenciais agentes infecciosos possibilita um melhor entendimento quanto à saúde das populações selvagens e pode subsidiar ações de conservação *in situ* (Adania, Silva & Felipe, 2014). Investigações sorológicas são importantes e devem ser elaboradas em conjunto com estudos multidisciplinares para avaliar a importância dos carnívoros selvagens no ciclo epidemiológico das enfermidades, assim como seu impacto na Saúde Pública (Jorge et al., 2010).

Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar por meio de um inquérito sorológico a exposição de onças-pardas (*Puma concolor*) de vida livre à agentes infecciosos selecionados, incluindo *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV), na região da Bacia Hidrográfica do Tietê, no Estado de São Paulo, Brasil.

Este estudo será organizado em capítulos, os quais abordarão as considerações iniciais (Capítulo I), a revisão da literatura (Capítulo II) e, por fim, o artigo científico (Capítulo III), apresentado conforme as normas da revista científica.

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

1 ASPECTOS GERAIS DA ONÇA-PARDA – *Puma concolor* (Linnaeus, 1771)

A onça-parda, também conhecida como suçuarana, é a segunda maior espécie de felídeo neotropical, podendo pesar de 22 até 72 kg de peso corporal, sendo os machos maiores que as fêmeas (Adania, Silva & Felipe, 2014). Entretanto, podem ser observados animais maiores em regiões localizadas nos extremos latitudinais (Hunter & Barrett, 2018). Possuem corpo longo e esguio, cabeça relativamente pequena, pelagem curta e uniforme, e a coloração da região dorsal pode variar do marrom-acinzentado ao avermelhado, enquanto o ventre e a parte interna dos membros são mais claros (Fowler, 1986).

São animais carnívoros de hábitos solitários e terrestres, com atividade predominantemente noturna, porém, já foi registrada maior atividade diurna em algumas regiões (Azevedo et al., 2018). Considerados predadores oportunistas, consomem uma grande variedade de presas conforme a disponibilidade no ambiente, incluindo vertebrados de pequeno e médio porte (Cheida et al., 2006). Em vida livre a longevidade da espécie varia entre 8 e 10 anos, havendo relatos de indivíduos que atingiram 15 anos de idade na natureza (Mazzolli, 2010).

Originalmente, a espécie ocorria desde o sul do Canadá até o extremo sul do continente Sul-Americano, com exceção do complexo das ilhas Caribenhas e algumas regiões do Chile (Nielsen et al., 2015; Azevedo et al., 2018). É o mais plástico dos felídeos sul-americanos, ocupando uma grande variedade de *habitats*, desde áreas florestais a regiões de Caatinga, além de áreas abertas de campos de pastagem e cultivos. São capazes de persistir em ambientes com pouca cobertura vegetal, assim como em áreas com certo grau de perturbação (Brasil, 2017).

Apesar de ser globalmente classificada como “Pouco Preocupante”, pela International Union for Conservation of Nature (IUCN), devido à sua ampla distribuição geográfica, atualmente, a espécie enfrenta uma drástica redução em sua área de ocorrência e intenso declínio populacional em diferentes regiões (Nielsen et al., 2015). No Brasil, a onça-parda está presente em todos os biomas, porém as populações encontram-se bastante reduzidas, ou mesmo extintas localmente, sendo categorizada no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como “Vulnerável” (VU) (Azevedo et al., 2018).

Seu estado de conservação vem sendo avaliado, desde 2011, pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente (ICMBio/MMA). Atualmente a espécie é contemplada no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Grandes Felinos, juntamente com a onça-pintada (*Panthera onca*), o qual tem como principal objetivo reduzir a vulnerabilidade e melhorar o *status* de conservação dessas espécies (Brasil, 2017).

A supressão e a fragmentação do *habitat* representa uma das principais ameaças, assim como a perda de indivíduos vítimas de colisões com veículos em rodovias (Adania, Silva & Felipe, 2014). A caça oportunística, a retaliação por predação de animais domésticos e as queimadas também contribuem significativamente para a redução populacional em diversas áreas (Brasil, 2017). A espécie tem tamanhos populacionais naturalmente baixos e a reposição de indivíduos é lenta, por isso, todos esses fatores são extremamente impactantes à espécie (Azevedo et al., 2018).

A onça-parda apresenta ampla área de vida, a qual pode exceder 160 km², sendo ainda maior em áreas fragmentadas (Azevedo et al., 2018). Segundo Brasil (2017), sua plasticidade em se adaptar a diferentes ambientes em busca de recursos alimentares e abrigo, tem tornado a espécie ainda mais exposta aos conflitos com seres humanos. Devido à degradação dos ambientes naturais, tem sido cada vez mais frequentes os registros de onças-pardas próximas a áreas urbanas ou peri-urbanas, o que leva a uma maior proximidade entre animais selvagens, domésticos e seres humanos.

Os animais domésticos podem atuar como fontes de infecção de uma ampla gama de patógenos para espécies selvagens, causando impactos significativos nas populações *in situ* (Loveridge et al., 2010). Levantamentos sorológicos demonstraram a ocorrência de diferentes agentes patogênicos em onças-pardas de vida livre (Lima et al., 2020; Franklin et al., 2007; Kikuchi et al., 2004). Além das doenças infecciosas representarem uma ameaça à conservação da espécie, estudos indicam a possibilidade desses animais atuarem como reservatórios destes agentes, servindo como fontes de infecção para humanos e animais domésticos (Bevins et al., 2012).

A conservação da onça-parda é considerada um desafio frente ao fato da espécie já ter sido eliminada de grandes áreas de sua distribuição original (Azevedo et al., 2018). Vale ressaltar que por serem predadores de topo de cadeia alimentar, as onças possuem um papel fundamental no equilíbrio dos ecossistemas, controlando a densidade de suas presas e, consequentemente, mantendo a diversidade biológica da floresta (Hunter & Barrett, 2018). Logo, assegurando-se a manutenção das populações de grandes carnívoros, outras espécies de um mesmo ecossistema também são protegidas (Soulé & Terborgh, 1999).

2 DOENÇAS INFECCIOSAS EM CARNÍVOROS SELVAGENS

Historicamente, os animais selvagens têm sido considerados importantes reservatórios e portadores de diversos patógenos transmissíveis aos seres humanos (Acha & Szyfres, 2003). Seu papel na cadeia epidemiológica das zoonoses se mostrou ainda mais relevante nos últimos anos, à medida em que se consolidou o conceito “One World, One Health”, o qual norteia a medicina da conservação e preconiza que a saúde deve ser vista como algo que se sustenta sobre um tripé, envolvendo a saúde humana, animal e ambiental (Marvulo & Carvalho, 2014).

A maioria das enfermidades infecciosas emergentes consiste em zoonoses e aproximadamente 70% destas envolvem espécies silvestres em sua epidemiologia, representando um problema de Saúde Pública em todos os continentes (Acha & Szyfres, 2003). Estudos com populações selvagens *in situ* tem demonstrado que muitas dessas doenças são consequências de desequilíbrios causados por ações antrópicas, que levam a uma maior proximidade entre o homem e os animais silvestres, favorecendo a transmissão de agentes infecciosos (Sanches & Lavín, 2014).

Os carnívoros selvagens são expostos a patógenos que comumente causam morbidade e mortalidade em animais domésticos. Epidemias causadas por doenças infecciosas já resultaram em declínio populacional de diversas espécies ameaçadas de extinção, como furões-de-patas-negras (*Mustela nigripes*) (Williams & Thorne, 1988), leões (*Panthera leo*) (Roelke-Parker et al., 1996), cachorros selvagens africanos (*Lycaon pictus*) (Alexander & Appel, 1994) e lobos da Etiópia (*Canis simensis*) (Sillero-Zubiri et al., 1996).

A presença de patógenos comuns de carnívoros domésticos em felídeos selvagens aponta para a necessidade do monitoramento destas infecções, por meio de uma abordagem integrada e multidisciplinar (Filoni, 2006). Estudos de longo prazo, envolvendo aspectos ecológicos, o monitoramento contínuo de populações e a pesquisa da ocorrência de patógenos, são necessários para determinar o impacto dos agentes infecciosos e parasitários para a conservação dos carnívoros selvagens (Jorge et al., 2010).

Muitos fatores ecológicos e epidemiológicos podem influenciar a distribuição de infecções em uma população suscetível, sendo necessários estudos envolvendo levantamentos de exposição a patógenos (Acha & Szyfres, 2003). As técnicas de diagnóstico sorológico têm grande relevância por detectarem anticorpos produzidos para o combate aos patógenos, possibilitando que, mesmo que o agente já não circule no organismo do animal nem esteja sendo eliminado, seja possível encontrar indícios indiretos de sua circulação (Jorge et al., 2010).

2.1 PATÓGENOS PESQUISADOS

2.1.1 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma das parasitoses mais difundidas e prevalentes no mundo, acometendo todos os vertebrados endotérmicos (Dubey, 2004). Consiste em uma doença zoonótica causada pelo *Toxoplasma gondii*, um coccídeo intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, o qual tem os felinos domésticos e selvagens como hospedeiros definitivos (OIE, 2008; Menezes, 2011).

O *T. gondii* é considerado um parasito heteroxeno facultativo e seu ciclo biológico compreende duas fases distintas, a fase assexuada (extraintestinal) que ocorre nos linfonodos e tecidos dos hospedeiros intermediários, e a fase sexuada (enteroepitelial) que ocorre no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos (Fialho, Teixeira e Araújo, 2009).

Os felídeos são essenciais no ciclo biológico do *T. gondii*, pois são os únicos hospedeiros capazes de transmitir o agente por meio da eliminação dos oocistos do protozoário junto às fezes (Dubey, 2004). Após um a cinco dias em contato com o oxigênio, os oocistos esporulam e tornam-se infectantes, podendo permanecer no solo como fonte de infecção por até 18 meses em condições ideais de umidade, oxigenação e temperatura (Fialho, Teixeira e Araújo, 2009).

A transmissão das formas infectantes pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente ou de cistos contidos nos tecidos dos hospedeiros portadores, assim como por via transplacentária (Dubey, 2004). Diversas espécies podem atuar como hospedeiros intermediários e a gravidade da infecção depende da interação parasita-hospedeiro, incluindo o tipo de cepa, sua patogenicidade, a espécie acometida e o estado imunológico do hospedeiro (Epiphany, Sinhorini & Catão-Dias, 2003).

O diagnóstico da doença geralmente é realizado por métodos sorológicos, como hemaglutinação indireta (HAI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência indireta (RIFI), sendo estes bons indicadores de infecção prévia por *T. gondii*. O teste de aglutinação modificada (MAT) apresenta alta sensibilidade e especificidade e pode ser utilizado para qualquer espécie, pois não necessita de conjugado espécie-específico (Silva & Silva, 2018). A pesquisa de oocistos nas fezes de felídeos pelo método de centrífugo-flutuação de Sheather pode ser realizada, no entanto, o curto período de eliminação dificulta o diagnóstico por meio desta técnica (Menezes, 2011).

A enfermidade tem sido amplamente relatada na fauna selvagem, sendo os primatas do Novo Mundo e os marsupiais australianos altamente suscetíveis à doença (Carme et al., 2009; Casagrande et al., 2013; Fornazari e Langoni, 2014). A presença de anticorpos anti-*T. gondii* já foi detectada em felídeos silvestres em diversos países, tanto em zoológicos como em vida livre, e a eliminação de oocistos já foi comprovada em gato-mourisco (*Herpailurus yagouaroundi*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato-palheiro (*L. colocolo*), jaguatirica (*L. pardalis*) e onça-parda (Silva et al., 2001; Spencer et al., 2003; Sedlák & Bártová 2006; De Camps et al., 2008; Rivetti Jr. et al., 2008; Pimentel et al., 2009).

Sabe-se que os felinos raramente desenvolvem a doença clínica, no entanto, essas espécies podem ter um papel importante na epidemiologia natural da infecção por *T. gondii* (Silva, 2006; Canón-Franco et al., 2013; Furtado, Gennari & Ikuta, 2015). Apesar de ser uma zoonose, ainda não está clara a importância dos animais selvagens na transmissão da toxoplasmose para o homem (Silva, 2006). Aramini et al. (1998) relacionaram o maior surto da doença em humanos, no Canadá, à contaminação de um reservatório de

água por oocistos do protozoário supostamente eliminados por onças-pardas que habitavam a região. Portanto, o estudo desta enfermidade em felídeos selvagens é importante no contexto de saúde pública e animal, uma vez que tem sido reportado uma alta soroprevalência em animais de vida livre.

2.1.2 *Leptospira* spp.

A leptospirose é considerada uma doença infectocontagiosa reemergente e, provavelmente, uma das zoonoses de maior ocorrência em todo o mundo, apresentando elevada incidência nos países tropicais e subtropicais, onde as condições de temperatura e umidade favorecem a manutenção do agente no meio ambiente (Genovez, 2018). A infecção é causada por espiroquetas patogênicas pertencentes à família Leptospiraceae, gênero *Leptospira* spp., as quais apresentam um amplo espectro e podem acometer uma grande variedade de hospedeiros, incluindo animais domésticos, selvagens e humanos (Vieira et al., 2017).

Inicialmente, este gênero foi classificado sorologicamente em 24 sorogrupos e mais de 300 sorovares diferenciados por características antigênicas. Na década de 1990 foi proposta uma classificação genética baseada na hibridização por homologia de DNA, sendo confirmada a existência de 20 genomoespécies de leptospiros (Cerqueira & Picardeau, 2009). Teoricamente, todos os sorovares podem infectar qualquer animal; porém, um número limitado apresenta-se endemicamente em determinada espécie ou região (Genovez, 2018).

As leptospiros colonizam os túbulos renais proximais dos hospedeiros infectados e são excretadas de forma intermitente na urina, podendo persistir durante meses em solo úmido ou ambientes aquáticos (Adler & Moctezuma, 2010). As bactérias podem ser transmitidas diretamente pelo contato com secreções, sangue ou urina de animais infectados, ou indiretamente por meio de água contaminada principalmente com urina de animais reservatórios (Paes, 2018; Bharti et al., 2003). Os animais acometidos podem desenvolver um quadro clínico característico de baixo índice de fertilidade, abortamentos e transtornos oculares (Corrêa, 2006).

Segundo Genovez (2018), o diagnóstico da leptospirose é complexo e diferentes métodos diretos e indireto podem ser utilizadas. A investigação de anticorpos humorais tem sido a principal metodologia aplicada à rotina diagnóstica da leptospirose. O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos é indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Brasil, 1995), sendo considerado uma prova padrão-ouro por apresentar boa sensibilidade e especificidade, além de detectar imunoglobulinas das classes IgM e IgG (Paes, 2018).

Sabe-se que diversas espécies animais são suscetíveis a esta zoonose e podem apresentar infecções subclínicas (Acha & Szyfres, 2003). Os animais selvagens podem atuar como reservatórios de leptospirosas, porém, ainda não está claro o real papel dessas espécies como fonte de infecção para animais domésticos e humanos, assim como os reservatórios e cepas mais importantes (Arent et al., 2017).

Investigações sobre a exposição de animais selvagens a leptospirosas têm sido realizadas em muitos países, demonstrando o envolvimento de muitas espécies na epidemiologia da doença (Silva et al., 2010; Petrakovsky et al., 2014). Roedores, xenarthras, carnívoros e artiodáctilos podem atuar como potenciais disseminadores de diversos sorovares (Michna et al., 1970; Corrêa, 2006). Levantamentos sorológicos tem evidenciado positividade em diferentes espécies, tanto *ex situ* (Lilenbaum et al., 2004; Corrêa et al., 2004; Guerra Neto et al., 2004; Esteves et al., 2005; Ullmann et al., 2012) quanto *in situ* (Millán et al., 2009; Jorge et al., 2011; Onuma et al., 2014).

Para estabelecer se um animal que apresentou títulos ou teve resultado positivo por técnicas moleculares é um reservatório patogênico de leptospirose, são necessários estudos mais aprofundados (Ullmann & Langoni, 2011). Algumas pesquisas obtiveram sucesso no isolamento de leptospirosas de animais silvestres, fornecendo informações mais confiáveis sobre seu papel como portadores (Vieira et al., 2017).

Pouco se sabe sobre os possíveis mecanismos de transmissão envolvendo animais selvagens e humanos, por isso, a implementação de medidas de controle pode ser desafiadora devido ao crescente contato entre

animais domésticos e fauna selvagem. A redução de *habitats* de vida selvagem favorece processos de spillback e spillover na interface vida selvagem-pecuária-humana, possivelmente levando ao surgimento de leptospirose em algumas áreas geográficas (Petrakovsky et al., 2014).

Segundo Vieira et al. (2017), a leptospirose é amplamente difundida entre a vida selvagem em todos os biomas da América Latina; entretanto, as informações disponíveis ainda são escassas e não representam um cenário epidemiológico claro. Neste contexto, são necessárias mais pesquisas sobre o papel da fauna selvagem na epidemiologia da infecção e seu impacto na pecuária e na saúde pública, principalmente com foco na detecção direta do agente.

2.1.3 Vírus da leucemia felina (FeLV)

Os retrovirus estão entre os agentes virais mais importantes para felídeos domésticos e selvagens (Filoni et al. 2003). O FeLV pertence ao gênero *Gammaretrovirus* e caracteriza-se por sua capacidade de integrar no genoma das células hospedeiras, estabelecendo infecções de caráter persistente e causando uma ampla gama de síndromes clínicas, como neoplasias linfó ou mieloproliferativas, doenças degenerativas, citopenias, síndrome de imunodeficiências e coinfeções (Hagiwara & Junior, 2018a).

Segundo Hagiwara e Junior (2018a), este vírus é eliminado na saliva de gatos virêmicos e pode ser transmitido por contato direto ou por meio do uso comum de fontes de água e alimentos. A transmissão vertical intrauterina ou perinatal também pode ocorrer. A evolução da infecção é variável de acordo com a idade e o estado imune do animal, patogenicidade do vírus e carga viral, sendo os filhotes mais suscetíveis do que os adultos.

O diagnóstico da infecção por FeLV é estabelecido por meio de métodos diretos de detecção do vírus ou do DNA proviral ou RNA viral no sangue periférico (Filoni & Catão-Dias, 2005a). Os kits disponíveis comercialmente são os mais empregados e detectam a proteína p27, a qual é produzida abundantemente durante a replicação do agente, porém, o resultado positivo de um único teste ELISA não significa viremia persistente e deve ser

confirmado após 12 semanas (Gomes-Keller et al, 2006). Outros testes normalmente empregados se baseiam na pesquisa de antígenos virais, produzidos em excesso durante a replicação do agente, são eles: ELISA, imunomigração rápida (RIM), ensaios imunocromatográficos (ICGA), imunofluorescência indireta (IFI) (Hagiwara & Junior, 2018a).

A infecção por FeLV é rara na maioria dos felídeos selvagens; porém, o agente já foi detectado diferentes espécies, demonstrando que este vírus pode ter importância para felídeos selvagens (Adania, Silva e Felipe, 2014). Costa et al. (2005), analisaram três onças-pardas e duas jaguatiricas por imunofluorescência indireta e detectaram anticorpos em uma das onças e ambas as jaguatiricas foram soropositivas. Filoni (2006) observou provírus de FeLV e RNA viral em dois gatos-mouriscos mantidos sob cuidados humanos, além da existência de anticorpos em onças-pardas de vida livre.

O FeLV demonstrou ser patogênico na maior parte das vezes em que foi diagnosticado em felídeos selvagens. Desta maneira, pode-se supor que o agente possa ter efeitos devastadores se introduzido em populações indenes (Filoni & Catão-Dias, 2005a).

2.1.4 Vírus da imunodeficiência felina (FIV)

O FIV é um *Lentivírus* que causa uma infecção importante para os gatos domésticos, a qual envolve depleção de linfócitos T com receptores do tipo CD4+, suscetibilidade a infecções secundárias e morte, sendo conhecida como síndrome da imunodeficiência adquirida (Hagiwara & Junior, 2018b). Três espécies do gênero *Lentivírus* podem infectar felídeos: o FIV isolado a partir do gato doméstico, o FIV-O isolado de um gato-de-pallas (*Otocolobus manul*) e o lentivírus de puma (PLV) isolado de pumas norte-americanos (Filoni & Catão-Dias, 2005a).

A detecção de antígenos virais, proteínas e provírus do FIV já foi descrita em cerca de metade das espécies de felídeos em todo o mundo, podendo indicar algum papel desses animais na ecoepidemiologia da imunodeficiência felina (Teixeira et al., 2012; Adania, Silva e Felipe, 2014).

De acordo com Filoni & Catão-Dias (2005b), enquanto o FeLV é patogênico para os felídeos selvagens, a patogenicidade dos diferentes lentivírus felinos é controversa nessas espécies. Ainda não há informações sobre a ocorrência de doença clínica ocasionada pelo FIV nesses animais, também, não se sabe se estes desenvolvem um período assintomático, como observado em gatos domésticos. De qualquer maneira, a transmissão interespecífica a partir do gato doméstico é possível. As espécies com maior grau de sinantropia, ou em situações que favoreçam o contato com gatos domésticos são mais suscetíveis a essa transmissão.

A transmissão natural ocorre principalmente pela saliva, por meio de mordidas, sendo os machos mais predispostos a infecção em função do comportamento mais agressivo. Gatos domésticos no entorno de Unidades de Conservação podem atuar como reservatórios para os felídeos selvagens (Adania, Silva e Felipe, 2014).

A infecção por FIV é mais comumente diagnosticada por meio da detecção de anticorpos, o que indica infecção persistente e capacidade de transmissão de vírus para outros hospedeiros (Filoni & Catão-Dias, 2005b). Métodos sorológicos diretos geralmente não são realizados porque os níveis de vírus circulantes são muito baixos, situando-se abaixo do limite de detecção destes testes. Pode-se utilizar testes rápidos realizados em sangue total, soro ou plasma.

Vários testes laboratoriais estão disponíveis, no entanto, estabelecer o verdadeiro estado de infecção por FIV em gatos às vezes pode ser difícil, mesmo com testes adicionais (Adania, Silva e Felipe, 2014). O Western blotting e PCR tem sido usados como testes adicionais para o diagnóstico de FIV (Little et al., 2020).

CAPÍTULO III – ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista “Ecohealth”. Normas disponíveis em: <<https://www.springer.com/journal/10393/submission-guidelines>>.

Serological survey of selected pathogens in free-ranging cougars (*Puma concolor*) in São Paulo, Brazil

Paolla Nicole Franco,¹ Daniel Angelo Felippi,¹ Dayane da Silva Zanini,² Caroline Muniz Cunha,² Pablo Menegon Castilho,³ Luiz Daniel de Barros,³ João Luis Garcia,³ Sandra Cavalcanti,⁴ Jean Carlos Ramos Silva,⁵ Carlos Roberto Teixeira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

²Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR, Brazil.

⁴Projeto Pardas do Tietê, Instituto para a Conservação dos Carnívoros Neotropicais – Pró-Carnívoros, Atibaia, SP, Brazil.

⁵Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil.

Running Head: Serological survey in free-ranging cougars

Key words: Felidae; infectious diseases; *in situ*; conservation, serosurvey, Brazil.

Corresponding Author:

Paolla Nicole Franco – FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu

Avenida Monte Castelo, 1315, casa 3 - Monte Castelo, Campo Grande, CEP: 79011-540, Mato Grosso do Sul, Brazil

Phone: +55-13-9-9131-7290 (cell phone)

Email: paolla.nicole@unesp.br; paollanicole@yahoo.com.br

Acknowledgments: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

ORIGINAL CONTRIBUTION**Serological survey for selected pathogens in free-ranging cougars (*Puma concolor*) in São Paulo, Brazil**

Abstract: This study performed a serological assay to assess the exposure of free-ranging cougars (*Puma concolor*) to four selected infectious agents, including *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and the Feline Leukemia Virus (FeLV). Serum samples were collected from 27 free-ranging cougars from 16 cities located along the Tietê River Basin, in the central region of the State of São Paulo, Brazil. The presence of antibodies for *T. gondii*, *Leptospira* spp. and FIV was detected respectively by the modified agglutination test (MAT-t), the microscopic agglutination technique (MAT-l), and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed the occurrence of infection with three of these pathogens in the cougars in that region. Infections by *T. gondii* were the most prevalent, observed in 59.3% (16/27) of the animals. Antibodies against *Leptospira* spp. and FIV were also detected, both with a prevalence of 11.1% (3/27). No sample reacted to the FeLV. These results suggest that free-ranging cougars are exposed to several agents that are potentially pathogenic for the species, highlighting the need for a constant monitoring of the epidemiologic profile of these animals, particularly in highly fragmented areas.

1 INTRODUCTION

The reduction and fragmentation of the *habitat*, motor vehicle collisions, illegal trafficking and the continuous pressure exerted by hunting are the main threats to the survival of wild felids (Adania et al. 2014). In addition, the impact of infectious diseases on the populations *in situ* should also be considered since these populations are particularly relevant for conservation of these species and represent a considerable threat to biodiversity (Daszak et al. 2000; Lafferty & Gerber 2002; Smith et al. 2009).

In addition to their impact on the conservation of wild felines, the occurrence of some of these zoonoses in the wild may represent a risk for Public Health (Acha & Szyfres 2003). Anthropogenic changes in the landscape have also led to changes in the relationship between pathogen and host, and, in addition, the closer proximity between humans, domesticated animals and wild animals may lead to more opportunities for the dissemination of several pathogens and appearance of emerging or re-emerging diseases (Jorge et al. 2010).

Toxoplasma gondii is a protozoon from the Apicomplexa phylum that targets domestic and wild felids as its definitive host (Dubey 2004; OIE 2008; Menezes 2011). Serological assays have shown a wide dispersion of this agent between several species of wild felids worldwide (Spencer et al. 2003; Rendón-Franco et al. 2012; Onuma et al. 2014), indicating that these animals may play an important role in the maintenance and transmission of the pathogen in natural environments (Furtado et al. 2015). The occurrence of toxoplasmosis in wild felids is rare, but the infection with *T. gondii* can pose a threat to Public Health

since these animals may serve as sources of infection for humans (Aramini et al. 1998; Amendoeira et al. 2003).

Leptospirosis is a disease caused by bacteria from the *Leptospira* spp. genus and is one of the most prevalent zoonosis around the world (Genovez 2018). Evidence indicated that the disease shows a widespread dissemination across the wild fauna in all biomes found in Latin America (Vieira et al. 2017). Its occurrence has been reported in several species in the wild (Jorge et al. 2012; Scialfa et al. 2013; Fratini et al. 2015; Albuquerque et al. 2017; Castro et al. 2018), but the role of these individuals as a source of infection for humans and other animals is still unclear. Therefore, studies regarding the occurrence of this agent in free-ranging populations are of particular importance since understand its dynamics in natural environments is essential to prevent outbreaks and establish adequate prophylactic measures (Vieira et al. 2017).

Retroviruses are among the most important viral agents for domestic and wild felids (Hagiwara & Junior 2018). The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) has been reported in around half of the wild felids species around the world (Hofmann-Lehmann et al. 1996). On the other hand, infection by the Feline Leukemia Virus (FeLV) is rare in wild felids (Adania et al. 2014), but the agent has proven to be pathogenic in most of the diagnosed cases in these species, indicating that the virus may have devastating effects on these populations (Filoni et al. 2006; Brown et al. 2008).

Considering the degree of vulnerability of neotropical felines, the continuous monitoring of potential infectious agents leads to a better understanding regarding the overall health of free-ranging populations and may serve as a basis for *in situ* conservation actions. This study aims at evaluation through a

serological assay the exposure of free-ranging cougars (*Puma concolor*) to selected infectious agents, including *T. gondii*, *Leptospira* spp., FIV and FeLV, around the region of the Tietê River Basin, in the State of São Paulo, Brazil.

2 METHODS

Study Area

The study area was located along the Tietê River Basin, in the State of São Paulo, Brazil. That is the largest hydrographic basin in the State, extending for over 30% of the territory (SIGRH 2011). Part of the animals sampled in this study were found in 10 cities located in the region, and another six individuals rescued in nearby cities were also included in the analysis [Figure 1].

Characterized originally by the presence of residual areas of Atlantic Forest interspersed with transition zones with the Cerrado, the landscape of this region has been altered by human activity over the last few decades. The native vegetations was significantly altered due to the cycles of agricultural expansion, industrial development and urbanization, and, today, it has been reduced to small, fragmented and disconnected forested areas. Nowadays the region is characterized by a strong industrial and agricultural activity, as well as by large urban areas.

Animals

Between 2013 and 2020, serum samples were collected from 27 free-ranging cougars (*P. concolor*). Twelve of these animals were captured using the foot snare technique during field activities of the Pumas in the Tietê River Basin

Project, a conservation program of the Institute for the Conservation of Neotropical Carnivores – “*Pró-Carnívoros*”. The remaining samples (15/27) were collected from rescued individuals forwarded to the CEMPAS – *Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens* at Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Botucatu), São Paulo State, Brazil. Blood samples were taken on the same day that the felids arrived at the institution, as part of the quarantine program.

Of the 27 cougars examined, 9 were females and 18 were males; 5 were kittens (<16 months), 8 juveniles (16–24 months), and 14 were adults (>24 months). The age of the animals was estimated based on the degree of dental wear and gum recession (Ashman et al. 1983). Except for the rescued animals treated at CEMPAS, all individuals captured *in situ* presented good health condition, adequate body condition and absence of alterations or clinical signs indicating disease. Information regarding the animals, including identification, sex, age group, weight, history and origin, as well as the collection dates of blood, are listed in Table 1.

Sample Collection

The animals were restrained using an association of tiletamine/zolazepam (10 mg/kg; Zoletil 100®) and xylazine (0.5 mg/kg). The drugs were administered intramuscularly through a dart. When necessary, the anesthesia was maintained through the intravenous injection of propofol (0.5 mg/kg) *in bolus*. Blood samples were collected by puncture of the cephalic or saphenous vein. The blood was stored in tubes without anticoagulant and kept at room temperature until clot retraction. The samples were centrifuged to obtain the

serum, which was divided in portions of 0.5 to 1 mL in properly identified polypropylene microtubes. The serum samples were stored at -20°C until analysis. All information regarding the history and general condition of the individuals were recorded in individual profile cards for later analysis under the light of the results obtained.

Serological Analyses

The identification of anti-*T. gondii* antibodies was performed through the modified agglutination technique as per the methodology previously described by Dubey & Desmonts (1987). Tachyzoites of the RH strain inactivated by the formaldehyde were used as antigens. The analyses were performed in partnership with the Laboratory of Zoonoses and Public Health of the Department of Preventive Veterinary Medicine at the Londrina State University, Paraná State, Brazil.

The test serums, as well as the positive and negative controls, were initially diluted at a 1:16 ratio in buffered saline solution (pH 7.2). The diluted serum was then transferred to a U-shaped microplate contained the antigen diluted in buffered borate (pH 8.5), 2-mercaptoethanol and Evans blue. The plate was sealed and incubated overnight at 37°C. The mass fractions corresponded to the highest dilution that presented agglutination (threshold $\geq 1:64$).

The microscopic agglutination method (MAT-I) was used to identify the antibodies for *Leptospira* spp. The technique was performed at the laboratory of the Zoonoses Diagnostic Service of the Department of Veterinary Hygiene and Public Health at FMVZ/UNESP, Botucatu, Brazil, using 12 serovars prevalent in the region and relevant to carnivores (Australis, Autumnalis, Bratislava,

Canicola, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes e Hardjo) (Table 2). The antigens were kept in an oven at 28-30°C in a liquid Ellinghausen-McCollough-Johnson-Harris (EMJH) culture medium and cultivated weekly.

The test was performed as advocated by Brasil (1995), in two stages. First, the samples were screening with a 1:100 dilution in buffered saline (pH 7.6) and those with at least 50% of the leptospira agglutinated were considered positive. Then, the reactive samples underwent a titration test with reacting antigens in a series of dilutions following a geometric progression (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600).

The reading was performed in a dark field microscope (Zeiss®) with 100x magnification. The mass fraction was considered equivalent to the highest dilution in which there was 50% or more agglutination per microscopic field in comparison with the control. Samples were considered to be reactive when the titration was 100 or higher.

For the identification of the retroviruses, the serum samples were tested with commercially available enzyme-linked immunosorbent assays SNAP® Combo Plus FeLV Ag/FIV Ab Test Kit (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME 04092 USA). This method simultaneous detects antibodies against feline lentiviruses and the p27 viral antigens of FeLV in samples of blood, serum or plasma of felines through the enzyme-linked immunosorbent assay technique (ELISA), presenting sensitivity and specificity of 93.5%100% for FIV and 98.6%/98.2% for FeLV, respectively. The test was performed as per the manufacturer's instructions.

Statistical Analyses

The data was analyzed using the statistics software Statistical Analysis System version 9.3 (SAS 2011). The Logistic procedure was used to perform a logistic regression technique to analyze the presence of antibodies against *T. gondii*, *Leptospira* spp., FIV and FeLV in the animals considering that the variables are categorical dependent. The regression coefficients (β) were identified as the rate of change in a category of the dependent variable (y) per unit of change in the independent variables (x) in relation to the reference categories. The reference categories for the independent variables “Sex” and “Age” were “Males” and “Adults”, respectively.

3 RESULTS

The tests detected evidence that the cougars were exposed to three of the four pathogens researched [Figure 2]. The prevalence rate of antibodies against *T. gondii*, *Leptospira* spp. and FIV were 59.3% (16/27), 11.1% (3/27) and 11.1% (3/27), respectively.

Of the 27 cougars in the study, 16 were seroreactive to *T. gondii* with titration of 64 (n=10), 256 (n=3) and 1024 (n=3). Three of these animals also presented antibodies against *Leptospira* spp., with serological mass fractions of 100 (animals 1 and 23) and 200 (animal 12). The most probable serovar for these animals was Djasiman. Three cougars were also seropositive for FIV, but none of the samples analyzed was reactive to FeLV.

All juvenile and adult individuals presented antibodies against one or more pathogens. None of the kittens were seropositive for the studied diseases. According to the sex, 83.3% (15/18) of the males and 77.7% (7/9) of the

females were seropositive for *T. gondii*. All animals seropositive to FIV were adult males, but antibodies against *Leptospira* spp. were detected in one female and two males, all adults.

According to the logistic regression model, there were no statistically significant differences ($p>0.05$) between sex and age in comparison with the reference categories. It was not possible to perform the same analysis for FeLV because all results were negative for this pathogen.

4 DISCUSSION

The high prevalence of *T. gondii* observed in this study (59.3%) was in line with the results described for several species of wild felids. In Brazil, seroprevalences ranging from 54.6% to 100% have been reported for felines kept under human care (Silva et al. 2001; Rivetti Jr. et al. 2008; Pimentel et al. 2009; André et al. 2010). Silva et al. (2001) have detected antibodies in 48.3% of the cougars living in 86 Brazilian zoos. However, studies with free-ranging wild cougars are still scarce in the country.

A serological survey conducted with 438 specimen of *P. concolor* native from 15 countries in the Americas observed a prevalence of 22.4% (Kikuchi et al. 2014). Still according to the authors, animals from Mexico, Central America and South America presented higher chances of being seropositive than animals from the United States and Canada. In the United States, Spencer et al. (2003) analyzed 42 serum samples of cougars *in situ* and observed the presence of antibodies anti-*T. gondii* in only 23.8% (10/42) of the animals.

Among the seropositive animals, the analysis detected serological mass fractions equal to 64 (n=10), 256 (n=3) and 1024 (n=3), with the highest

titrations observed only in adult animals. These results are in line with the results reported by Kikuchi et al. (2014), who observed a higher prevalence of antibodies in adult animals, suggesting that the highest fractions indicate repeated exposure to the infection. In that study, despite the lack of statistically significant differences between the different age groups, none of the kittens (n=5) presented antibodies against the agent. According to Franti et al. (1976), the prevalence of anti-*T. gondii* antibodies is higher in older carnivores. This fact may be related to the feeding habits of the species, getting infected primarily through the ingestion of cysts present in the tissues of their prey.

In this study, it was not possible to perform a direct test for *T. gondii* in the feces of the studied animals, but the elimination of oocysts has been proven in several species of wild felines, including *P. concolor* (Aramini et al. 1998). Even though these animals excrete a low number of oocysts in comparison with domestic cats, the contamination of the environment may be considerable due to the extensive area inhabited by these predators (Dahroug 2014).

It is important to highlight the existence of large municipal water reservoirs within the studied area and the possibility that the cougars could act as sources of *T. gondii* infection to other animals or humans. The contamination of water sources by oocysts has already been reported, proving that this should be considered an important transmission route for humans (Aramini et al. 1998). A large number of people have already been infected by this protozoon in Brazil due to the contamination of municipal water reservoirs by oocysts excrete in the feces of domestic cats (Brasil, 2002).

In Canada, an outbreak involving humans was linked to the presence of oocysts in the water, presumably excreted by pumas inhabiting the region (Aramini et al.

1998). For this reason, it is of utmost importance to constantly monitor these water reservoirs in order to minimize possible public health risks.

The modified agglutination test used in this study was chosen for presenting higher sensitivity in comparison with other tests, in addition to being the most widely used technique in epidemiological studies with wild felines (Silva et al. 2007; Montazeri et al. 2020). Silva et al. (2016) assessed 21 serum samples of four different species of neotropical felines using both the modified agglutination test and the indirect hemagglutination technique (IHA), observing the former was capable of detecting a larger number of positive animals.

As expected, no clinical evidence of toxoplasmosis was observed during the evaluation of the animals. Even today, the real impact of toxoplasmosis on free-ranging populations of cougars are still unknown. Even though the clinical manifestation of the disease is rarely observed in felines, cases have been reported in cheetahs (*Acinonyx jubatus*), Pallas's cats (*Otocolobus manul*), bobcats (*Lynx rufus*), tigers (*Panthera tigris*) and lions (*P. leo*), highlighting the susceptibility of these species to the agent (Lloyd & Stidworthy 2007; Basso et al. 2005; Kenny et al. 2002; Dorny & Franssen 1989; Ocholi et al. 1989; Dubey et al. 1988; Dubey et al. 1987).

Of the 27 animals sampled for this study, only three (11.1%) were seroreactive for *Leptospira* spp., supporting the results of the largest serological survey with felines under human care in Brazil, in which 12.9% (9/70) of the cougars presented antibodies against *Leptospira* (Guerra-Neto 2006). A similar rate has been reported in a study developed in the São Paulo Zoo, in which 17 (16.8%) of the 62 neotropical exotic felines were seropositive to leptospirosis (Corrêa et al. 2004).

Recently, a higher prevalence (46%) has been reported in free-ranging cougars in California (Straub et al. 2021). However, there are few studies performed *in situ* with populations of wild felines and information regarding this subject is still scarce.

In all seropositive cougars, the only serovar detected was the Djasiman serovar of *L. interrogans*, diverging from the results observed by other authors. Based on the literature, the most prevalent serovars reported in felines was Autumnalis, Butembo, Pomona, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Andamana, Patoc, Copenhageni and Bratislava serovars (Guerra-Neto, 2004; Corrêa et al., 2004; Guerra-Neto, 2006; Esteves, 2005; Jorge et al., 2011; Ullmann et al., 2012; Straub et al., 2021).

Even though it has been associated with human leptospirosis in the past (Ismail et al. 2006; Héry et al. 2015), the Djasiman serogroup is seldom reported in the literature and this is the first record of its occurrence in *P. concolor*. However, it has already been detected in other wild species, including ocelots (*Leopardus pardalis*), opossums (*Didelphis* spp.), primates, capybaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*) and wild boars (*Sus scrofa scrofa*) (Ullmann et al. 2012; Lenharo et al. 2012; Langoni et al. 2016; Vieira et al. 2016; Cutolo et al. 2020).

In the same region in which this study was performed, Fornazari et al. (2018) observed a high prevalence of the Djasiman serovar in several wild species, including coatis (*Nasua nasua*), nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*), lesser grisons (*Galictis cuja*) and other mammals, indicating the circulation of this serovar in free-ranging life. Some of these species are commonly preyed upon by cougars (Azevedo et al. 2018), which could act as possible sources of infection for these predators. It is known that transmission

happens chiefly through contact with water contaminated with the urine of infected animals, but the *Leptospira* may also be transmitted through the ingestion of infected prey.

No clinical alterations indicative of leptospirosis were observed in the animals evaluated in this study. According to Corrêa (2006), due to their habit of preying upon rodents, which are pointed as the main reservoirs of the agent, animals of the Felidae family are more resistant to infections by *Leptospira*, presenting low mass fractions and no signs of infection. Even though there are few evidences of the occurrence of leptospirosis in felines, a fatal case involving a cougar was reported in the Rio de Janeiro Zoo by Lilenbaum et al. (2004).

Even though the presence of the bacteria in the urine of seropositive animals was not confirmed, the role of these animals as reservoirs of *Leptospira* should be further clarified, as well as its relevance in public health issues in the region studied.

This study found antibodies against FIV in three cougars, indicating that the agent is in circulation in the wild environment. The detection of antibodies against this virus highlights the need to monitor individuals for further information, considering that the real impact of this pathogen to the general health of free-ranging populations still remain unknown.

All seropositive animals were adult males, which is in line with the results reported in other studies. Several authors observed a higher prevalence of this infection in male individuals, as is the case in domestic cats, which suggests that the frequent disputes for resources between animals of this sex may increase the chance of disseminating the virus, which is transmitted mainly through the saliva (Biek et al. 2006; Bevins et al. 2012; Reynolds et al. 2019).

According to the physical examination performed at the time of sample collection, there were no clinical signs of disease. However, studies indicate that these viruses may represent a potential risk to wild populations (Filoni et al. 2006). Cases of infection by FIV have been reported in lions (*Panthera leo*), pumas (*Puma concolor coryi*) and Iberian lynxes (*Lynx pardinus*) (Roelke-Parker et al. 1996; Fromont et al. 2000; López et al. 2009).

The serological analyzes have shown that these individuals were also positive to other infectious diseases, such as toxoplasmosis (3/3) and leptospirosis (1/3). It is known that the infection by FIV persists for the entire life of the animal and, although without significant mortality rates, leads to immunosuppression and may predispose the animals to other infectious diseases or influence their impact on the organism (Biek et al. 2006). Roelke-Parker et al. (1996) reported lymphocytopenia in free-ranging cougars, suggesting that the infection may lead to immunological perturbations, similar to other lentiviral infections.

Two of the seroreactive animals were rescued near urbanized areas, where there is a circulation of stray cats, which may eventually transmit the retroviruses. The interspecies transmission between wild and domestic felines is possible, being more probable in wild species with higher potential for synanthropic behavior or in situations that favor contact with such animals (Jessup et al. 1993). This type of transmission has been reported in several species and cats are considered the main source of infection (Franklin et al. 2007; Brown et al. 2008; Lee et al. 2016).

In all regions sampled, the natural landscapes modified by the actions of mankind are an alarming point and the presence of domestic animals in these areas represents yet another threat to the conservation of the wild fauna. In this

study, it was impossible to determine the nature and origin of the virus because there was no material available for isolating and molecularly characterizing the pathogen.

The study of antibodies against the retroviruses was performed using the SNAP Combo FeLV Ag/FIV Ac test. This test presents high sensitivity and specificity in domestic cats and has been increasingly employed in the diagnostic of FIV and FeLV in wild felines since there is a perfect sequence homology between the main proteins of the viral capsid of lentiviruses, allowing for cross reactivity (Filoni et al. 2003; Nava 2008; Furtado 2010).

None of the cougars evaluated in this study were seroreactive for FeLV. These results support the results observed with Furtado (2010) and Nava (2008) in studies developed with free-roaming jaguars employing the same diagnostic method. The occurrence of FeLV is rare in wild felines, but there are reports of exposure of several species to the agent in many countries (Miller et al. 2003; Ostrowski et al. 2003; Schmitt et al. 2003; Millán et al. 2009; Tangsudjai et al. 2010). The agent has been associated with severe disease in pumas (Jessup et al. 1993; Brown et al. 2008) and cheetahs (Marker et al. 2003).

Even though the p27 antigen of FeLV was not found in the serological analyses of the animals sampled, we may not exclude the possibility of latent infections. A negative test does not necessarily mean lack of exposure to the pathogen; serological assays may return negative results if the samples are collected during the most initial stages of the infection, before the development of specific antibodies, or when the viral loads are very low (Gomes-Keller et al, 2006).

5 CONCLUSION

These results show that the cougars in the studied region have been exposed to several infectious agents. The serological analyses revealed a significant occurrence of infection with *T. gondii*, while few animals were seropositive for *Leptospira* spp. and FIV. The occurrence of co-infections was observed in five animals. Apparently, infections by FeLV do not represent a threat for free-ranging cougar populations in the region studied. The continuous and long-term monitoring the health of these animals is of utmost importance to clarify the role of *P. concolor* in the epidemiologic cycle of these diseases and possibly help in the development of preventive and control measures aiming both the conservation of the wild fauna and the protection of human health.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001. We thank the Institute for the Conservation of Neotropical Carnivores – “*Pró-Carnívoros*”, especially Sandra Cavalcanti, who contributed to field work and data collection. We also thank all the team of CEMPAS for all the support.

ETHICAL APPROVAL

All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Acha PN, Szyfres B (2003) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3rd ed., v. 2. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 439 p.
- Adania CH, Silva JCR, Felipe PAN (2014) Carnívora - Felidae (onça, suçuarana, jaguatirica e gato-do-mato). In: *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*, Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL (editors), 2nd ed., v. 2. São Paulo: Roca, pp. 779–818.
- Albuquerque NF, Martins G, Medeiros L, Lilenbaum W, Ribeiro VMF (2017) The role of capybaras as carriers of leptospires in periurban and rural areas in the western Amazon. *Acta Tropica* 169:57–61.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.018>
- Amendoeira MRR, Sobral CAQ, Teva A, Lima JN, Klein CH (2003) Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(6):671–676.
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000600005>
- André MR, Adania CH, Teixeira RHF, Silva KF, Jusi MMG, Machado STZ, Bortolli CP, Falcade M, Sousa L, Alegretti SM, Felipe PAN, Machado RZ (2010) Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *Journal of Parasitology* 96(5):1007–1009.
<https://doi.org/10.1645/GE-2502.1>
- Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP (1998) *Toxoplasma gondii* in Vancouver island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. *The Journal of Parasitology* 84(2):438–440. <https://doi.org/10.2307/3284508>

- Ashman DL, Christensen GC, Hess ML, Tsukamoto GK, Wichersham MS (1983) The mountain lion in Nevada. Nevada Department of Wildlife Report W-48-15, Reno, USA.
- Azevedo FC, Lemos FG, Almeida LB, Campos CB, Beisiegel BM, Paula RC, Crawshaw Jr PG, Ferraz KMP, Oliveira TG (2018) *Puma concolor* (Linnaeus, 1771). In: *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: volume II – mamíferos*. Brasília: ICMBio/MMA, 2018. pp. 358–366.
- Basso W, Edelhofer R, Zenker W, Möstl K, Kübber-Heiss A, Prosl H (2005) Toxoplasmosis in pallas' cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. *Parasitology* 130:293–299. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006584>
- Bevins SN, Carver S, Boydston EE, Lyren LM, Alldredge M, Logan KA, Riley SPD, Fisher RN, Vickers TW, Boyce W, Salman M, Lappin MR, Crooks KR, VandeWoude S (2012) Three pathogens in sympatric populations of pumas, bobcats, and domestic cats: implications for infectious disease transmission. *PLoS ONE* 7(2):e31403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031403>
- Biek R, Drummond A, Poss M (2006) A virus reveals population structure and recent demographic history of its carnivore host. *Science* 311:538–541.
- Brasil (2002) Fundação Nacional de Saúde. Surto de toxoplasmose no município de Santa Isabel do Ivaí, Paraná. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Brasília, Ano 02, n. 03, 9 pp. Brasília. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_ano02_03.pdf
- Brasil (1995) Ministério da Saúde. Manual de leptospirose. Centro Nacional de Epidemiologia. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 98 pp.
- Brown MA, Cunningham MW, Roca AL, Troyer JL, Johnson WE, O'Brien SJ (2008) Genetic characterization of feline leukemia virus from Florida panthers. *Emerging Infectious Diseases* 14(2):252–259. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1402.070981>

- Castro MP, Figueiredo FB, Balassiano IT, Varela TM, Pereira MM (2018) *Leptospira* spp. in opossums *Didelphis aurita* from the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazil. J Vet Med Res.* 5(4):1132.
- Corrêa SHR, Vasconcellos SA, Morais Z, Teixeira AA, Dias RA, Guimarães MAB, Ferreira F, Ferreira Neto JS (2004) Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 41:189-193.
- Corrêa SHR (2006) Leptospirose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, pp. 736–741.
- Cutolo AA, Wanderley GG, Langoni H, Teixeira AC (2020) Anti-*Leptospira* spp. antibodies in wild mammals in the municipality of Monte Mor, São Paulo State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 41(6):3465-3472. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6Supl2p3465>
- Dahroug MAA (2014) Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos e comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil [tese]. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
- Dorny P, Franssen J (1989) Toxoplasmosis in a siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Veterinary Record* 125(26-27):647.
- Dubey JP (2004) Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology* 126(1–2):57–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>
- Dubey JP, Desmonts G (1987) Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet J* 19:337–339. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1987.tb01426.x>

- Dubey JP, Gendron-Fitzpatrick AP, Lenhard AL, Bowman D (1988) Fatal toxoplasmosis and enteroepithelial stages of *Toxoplasma gondii* in a pallas cat (*Felis manul*). *J Protozool* 35(4):528–530. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1988.tb04144.x>
- Dubey JP, Quinn WJ, Weinandy D (1987) Fatal neonatal toxoplasmosis in a bobcat (*Lynx rufus*). *Journal of Wildlife Diseases* 23(2):324–327. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.2.324>
- Esteves FM, Guerra-Neto G, Girio RJ, Silva-Vergara ML, Carvalho AS (2005) Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. *Arq Inst Biol* 72(3):283–288.
- Filoni C, Adania CH, Durigon EL, Catão-Dias JL (2003) Serosurvey for feline leukemia virus and lentiviruses in captive small neotropic felids in São Paulo State, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 34(1):65–66. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2003\)34\[0065:SFFLVA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2003)34[0065:SFFLVA]2.0.CO;2)
- Filoni C, Catão-Dias JL, Bay G, Durigon EL, Jorge RSP, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2006) First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and ehrlichia exposure in brazilian free-ranging felids. *Journal of Wildlife Diseases* 42(2):470–477. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.470>
- Fornazari F, Langoni H, Marson PM, Nóbrega DB, Teixeira CR (2018) *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: beyond rodents. *Acta Tropica* 178:205–212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019>
- Franklin SP, Toryer JL, TerWee JA, Lyren LM, Kays RW, Riley SPD, Boyce WM, Crooks KR, Vandewoude S (2007) Variability in assays used for detection of lentiviral infection in bobcats (*Lynx rufus*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*). *Journal of Wildlife Diseases* 43(4):700–710. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.700>

- Franti CE, Riemann HP, Behymer DE, Suther D, Howarth JA, Ruppanner R (1976) Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and domestic animals in Northern California. *JAVMA* 169(9):901-906.
- Frantini F, Turchi B, Ebani VV, Bertelloni F, Galiero A, Cerri D (2015) The presence of *Leptospira* in coypus (*Myocastor coypus*) and rats (*Rattus norvegicus*) living in a protected wetland in Tuscany (Italy). *Veterinarski Arhiv* 85 (4):407–414.
- Fromont E, Sager A, Léger F, Bourguemestre F, Jouquelet E, Stahl P, Pontier D, Artois M (2000) Prevalence and pathogenicity of retroviruses in wildcats in France. *Veterinary Record* 146:317–319. <https://doi.org/10.1136/vr.146.11.317>
- Furtado MM (2010) Estudo epidemiológico de patógenos circulantes nas populações de onça-pintada e animais domésticos em áreas preservadas de três biomas brasileiros: Cerrado, Pantanal e Amazônia [tese]. Universidade de São Paulo. 282 pp.
- Furtado MM, Gennari SM, Ikuta CY (2015) Serosurvey of smooth *Brucella*, *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic animals from Brazil. *PLoS ONE* 10(11):e0143816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143816>
- Genovez ME (2018) Leptospirose em animais de produção. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, pp. 378–387.
- Gomes-Keller MA, Tandon R, Gönczi E, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Lutz H (2006) Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Vet Microbiol* 1:11-21. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.027>
- Guerra-Neto G (2006) Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil [dissertação]. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. 61 pp.
- Guerra-Neto G, Girio RJS, Andrade TM, Koproski LP, Moraes E, Santos LC (2004) 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 veterinaria* 20(1):75–80.

Hagiwara MK, Junior AR (2018) Retrovíroses dos felinos: leucemia viral felina. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, pp. 825-835.

Héry G, Letheulle J, Flécher E, Quentin C, Piau C, Tulzo YL, Tattevin P (2015) Massive intra-alveolar hemorrhage caused by *Leptospira* serovar Djasiman in a traveler returning from Laos. *J Travel Med* 22(3):212–214. <https://doi.org/10.1111/jtm.12189>

Hofmann-Lehmann R, Fehr D, Grob M, Elgizoli M, Packer C, Martenson JS, O'Brien SJ, Lutz H (1996) Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in East Africa. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3(5):554–562.

Ismail TF, Wasfy MO, Abdul-Rahman B, Murray CK, Hospenhal DR, Abdel-Fadeel M, Abdel-Maksoud M, Samir A, Hatem ME, Klena J, Pimentel G, El-Sayed N, Hajjeh R (2006) Retrospective serosurvey of leptospirosis among patients with acute febrile illness and hepatitis in Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75(6):1085–1089. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.1085>

Jessup DA, Petta KC, Lowenstine LJ, Pedersen NC (1993) Feline leukemia virus infection and renal spirochetosis in a free-ranging cougar (*Felis concolor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24(1):73–79.

Jorge RSP, Ferreira F, Neto JSF, Vasconcellos SA, Lima ES, Morais ZM, Souza GO (2011) Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp. in the northern Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106(4):441–444. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000400009>

- Jorge RSP, Rocha FL, Júnior JAM, Morato RG (2010) Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecologia Australis* 14(3):686–710.
<https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1403.06>
- Jorge S, Hartleben CP, Seixas FK, Coimbra MAA, Stark CB, Larrondo AG, Amaral MG, Albano APN, Minello LF, Dellagostin OA, Brod CS (2012) *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): first isolation in Brazil. *Acta Tropica* 124:147–151.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.009>
- Kenny DE, Lappin MR, Knightly F, Baier J, Brewer M, Getzy DM (2002) Toxoplasmosis in pallas cats (*Otocolobus felis manul*) at the Denver Zoological Gardens. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(2):131–138. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2002\)033\[0131:TIPCOF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2002)033[0131:TIPCOF]2.0.CO;2)
- Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Martenson JS, Swift PK, O'Brien SJ (2004) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Parasitology* 120:1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.002>
- Lafferty KD, Gerber LR (2002) Good medicine for conservation biology: the intersection of epidemiology and conservation theory. *Conservation Biology* 16(3):593–604.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00446.x>
- Langoni H, Kuribara IY, Correa APF, Ullmann LS, Sánchez GP, Lucheis SB (2016) Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 22:4.
<https://doi.org/10.1186/s40409-016-0059-6>
- Lee J, Malmberg JL, Wood BA, Hladky S, Troyer R, Roelke M, (2016) Feline immunodeficiency virus cross-species transmission: implications for emergence of new lentiviral infections. *J. Virol* 91(5):e02134-16; doi: 10.1128/JVI.02134-16.

- Lenharo DK, Santiago MED, Lucheis SB (2012) Avaliação sorológica para leptospirose em mamíferos silvestres procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. *Arq Inst Biol* 79(3): 333–341. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572012000300003>
- Lilenbaum W, Monteiro RV, Albuquerque CE, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPL (2004) Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *The Veterinary Journal* 168:191–193. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00139-4)
- Lloyd C, Stidworthy MF (2007) Acute disseminated toxoplasmosis in a juvenile cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38(3):475–478. <https://doi.org/10.1638/2007-0016.1>
- López G, López-Parra M, Fernández L, Martínez-Granados C, Martínez F, Meli ML, Gil-Sánchez JM, Viqueira N, Díaz-Portero MA, Cadenas R, Lutz H, Vargas A, Simón MA (2009) Management measures to control a feline leukemia virus outbreak in the endangered Iberian lynx. *Animal Conservation* 12(3):173–182. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00241.x>
- Marker L, Munson L, Basson PA, Quackenbush S (2003) Multicentric T-cell lymphoma associated with feline leukemia virus infection in a captive namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Wildlife Diseases* 39(3):690–695. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.690>
- Menezes RCAA (2011) Coccídios. In: Monteiro SG. *Parasitologia na medicina veterinária*. São Paulo: Roca, pp. 149–151.
- Millán J, Candela MG, López-Bao JV, Pereira M, Jiménez MA, León-Vizcaíno L (2009) Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9(5):549–554. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0081>
- Miller DL, Taylor SK, Rotstein DS, Pugh MB, Barr MC, Baldwin CA, Cunningham M, Roelke M, Ingram D (2003) Feline immunodeficiency virus and Puma lentivirus in

Florida panthers (*Puma concolor coryi*): epidemiology and diagnostic issues. *Veterinary Research Communications* 30:307–317. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3167-x>.

Montazeri M, Galeh MT, Moosazadeh M, Sarvi S, Dodangeh S, Javidnia J, Sharif M, Daryani A (2020) The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967–2017): a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors* 13:82. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3954-1>.

Nava AFD (2008) Espécies sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo [tese]. Universidade de São Paulo.

Ocholi RA, Kalejaiye JO, Okewole PA (1989) Acute disseminated toxoplasmosis in two captive lions (*Panthera leo*) in Nigeria. *Veterinary Record* 124:515–516. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.124.19.515>

OIE – World Organisation for Animal Health (2008) Toxoplasmosis. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. 6th ed., v. 2, pp. 1284–1293.

Onuma SSM, Melo ALT, Kantek DLZ, Crawshaw-Junior PG, Morato RG, May-Júnior JA, Pacheco TA, Aguiar DM (2014) Exposure of free-living jaguars to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in the Brazilian Pantanal. *Rev Bras Parasitol Vet* 23(4):547–553. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014077>

Ostrowski S, Vuuren MV, Lenain DM, Durand A (2003) A serologic survey of wild felids from Central West Saudi Arabia. *Journal of Wildlife Diseases* 39(3):696–701. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.696>

Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos SA, Morais ZM, Silva JCR, Neto JE (2009) Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesq Vet Bras* 29(12):1009–1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009001200010>

- Rendón-Franco E, Caso-Aguilar A, Jimenéz-Sánchez NG, Hernandez-Jauregui DMB, Sandoval-Sánchez AL, Zepeda-López HM (2012) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases* 48(3):829–831. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.829>
- Reynolds JJH, Carver S, Cunningham MW, Logan KA, Vickers W, Crooks KR, VandeWoude S, Craft ME (2019) Feline immunodeficiency virus in puma: estimation of force of infection reveals insights into transmission. *Ecology and Evolution* 9:11010–11024. <https://doi.org/10.1002/ece3.5584>
- Rivetti Jr AV, Caxito FA, Resende M, Lobato ZIP (2018) Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 60:1281–1283. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000500038>.
- Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mwamengele GLM, Mgasia MN, Machange GA, Summers BA, Appel MJG (1996) A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379:441–445. <https://doi.org/10.1038/379441a0>
- Schmitt AC, Reischak D, Cavlac CL, Monforte CHL, Couto FT, Almeida ABPF, Santos DGG, Souza L, Alves C, Vecchi K (2003) Infecção pelos vírus da leucemia felina e da peritonite infecciosa felina em felídeo selvagem de vida livre e de cativeiro da região do Pantanal matogrossense. *Acta Scientiae Veterinariae* 31(3):185–188. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.17175>
- Scialfa E, Brihuega B, Venzano A, Morris WE, Bolpe J, Schettino M (2013) First isolation of *Leptospira interrogans* from *Lycalopex griseus* (South American Gray Fox) in Argentina Shows New MLVA Genotype. *Journal of Wildlife Diseases* 49(1):168–172. <https://doi.org/10.7589/2011-07-219>

- SIGRH - Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos do Estado de São Paulo
(2011) *Plano Estadual de Recursos Hídricos: relatório de situação dos recursos hídricos do Estado*. São Paulo.
- Silva JCR, Marvulo MFV, Dias RA, Ferreira F, Amaku M, Adania CH, Neto JSF (2007) Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Preventive Veterinary Medicine* 78:286–295. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.10.013>
- Silva CC, Meneses AMC, Moraes CCG, Carmo EL, Langoni H, Silva RC, Pancieri HMH, Martins BR, Souza NF (2016) Soroprevalência e pesquisa de oocistos de *Toxoplasma gondii* em felídeos selvagens procedentes do estado do Pará, Brasil. *Vet e Zootec* 23(3):400–408.
- Silva JCR, Ogassawara S, Adania CH, Ferreira F, Gennari SM, Dubey JP, Ferreira-Neto JS (2001) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Veterinary Parasitology* 102:217–224. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00523-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00523-4)
- Smith KF, Behrens MD, Sax F (2009) Local scale effects of disease on biodiversity. *EcoHealth* 6:287–295. <https://doi.org/10.1007/s10393-009-0254-9>
- Spencer JA, Higginbotham MJ, Blagburn BL (2003) Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and freeranging nondomestic felids in the United States. *J Zoo Wildl Med* 34:246–249. <https://doi.org/10.1638/02-046>
- Straub MH, Rudd JL, Woods LW, Clifford DL, Foley JE (2021) *Leptospira* prevalence and its association with renal pathology in mountain lions (*Puma concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*) in California, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 57(1):27–39. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00070>
- Tangsudjai S, Malidang S, Phonarknguen R, Boonyarittichaikit R, Pattanarangsarn R, Buddhirongawatr R, Chaichoun K (2010) Feline leukemia virus (FeLV) in captive wild felids in Thailand during 2004-2005. *Journal of Applied Animal Science* 3(1-3):25–31.

- Ullmann LS, Hoffmann JL, De Moraes W, Cubas ZS, Santos LC, Silva RC, Moreira N, Guimaraes ANS, Camossi LG, Langoni H, Biondo AW (2012) Serologic survey for *Leptospira* spp. in captive neotropical felids in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43(2):223–228.
<http://dx.doi.org/10.1638/2010-0091.1>
- Vieira AS, Lilenbaum W (2017) Leptospirosis on captive wild animals in Latin America. *Research in Veterinary Science* 115:496–500.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.001>
- Vieira AS, Narduche L, Martins G, Péres IAH, Zimmermann NP, Juliano RS, Pellegrin AO, Lilenbaum W (2016) Detection of wild animals as carriers of *Leptospira* by PCR in the Pantanal biome, Brazil. *Acta Tropica* 163:87–89.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.001>

TABLES

Table 1. Infectious agents in free-ranging cougars (*Puma concolor*) around the region of the Tietê River Basin, in the State of São Paulo, Brazil.

ID	Sex	Age range	History	Tox ¹	Lep ²	FIV	FeLV
1	Female	Adult	Captured	+	+	-	-
2	Male	Adult	Captured	-	-	-	-
3	Female	Adult	Captured	-	-	-	-
4	Male	Juvenile	Rescued	-	-	-	-
5	Female	Juvenile	Rescued	+	-	-	-
6	Male	Adult	Captured	+	-	+	-
7	Male	Adult	Rescued	+	-	-	-
8	Male	Adult	Captured	+	-	+	-
9	Male	Juvenile	Captured	+	-	-	-
10	Male	Juvenile	Captured	+	-	-	-
11	Male	Adult	Captured	+	-	-	-
12	Male	Adult	Rescued	+	+	-	-
13	Male	Kitten	Orphaned	-	-	-	-
14	Male	Kitten	Orphaned	-	-	-	-
15	Female	Kitten	Orphaned	-	-	-	-
16	Female	Kitten	Orphaned	-	-	-	-
17	Male	Adult	Run over	-	-	-	-
18	Male	Adult	Run over	+	-	-	-
19	Female	Juvenile	Run over	-	-	-	-
20	Female	Juvenile	Run over	+	-	-	-
21	Male	Juvenile	Rescued	+	-	-	-
22	Female	Juvenile	Run over	+	-	-	-
23	Male	Adult	Run over	+	+	+	-
24	Male	Adult	Rescued	+	-	-	-
25	Female	Kitten	Orphaned	-	-	-	-
26	Male	Adult	Run over	-	-	-	-
27	Male	Adult	Run over	+	-	-	-

¹*Toxoplasma gondii*. ²*Leptospira* spp. +Positivo. -Negativo.

Table 2. *Leptospira* serovars tested by microscopic agglutination test (MAT).
Laboratory of the Zoonosis Diagnosis Service – Botucatu/SP, Brazil.

Specie	Serogroup	Serovar	Sample
<i>Leptospira interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
		Bratislava	Jez-bratislava
<i>Leptospira interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>Leptospira interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>Leptospira kirshneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3552 C
<i>Leptospira interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>Leptospira kirshneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
		Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>Leptospira interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>Leptospira interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>Leptospira interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno

LIST OF FIGURES

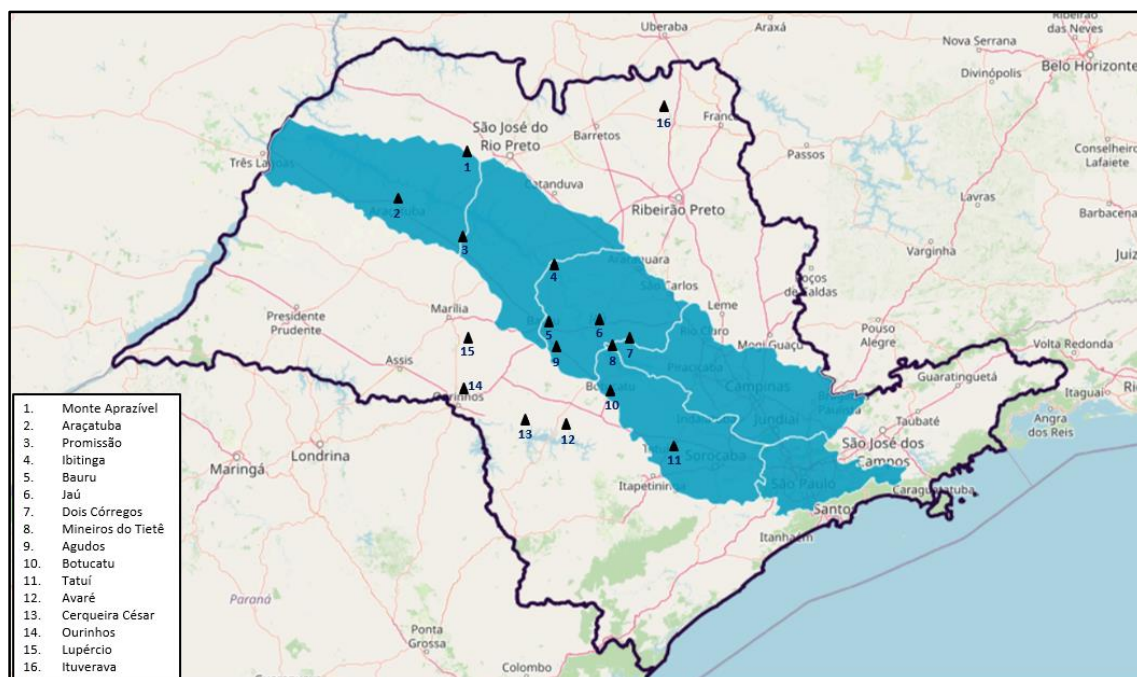


Figure 1. Study area location. Indication of the sampling sites along the Tietê river basin.

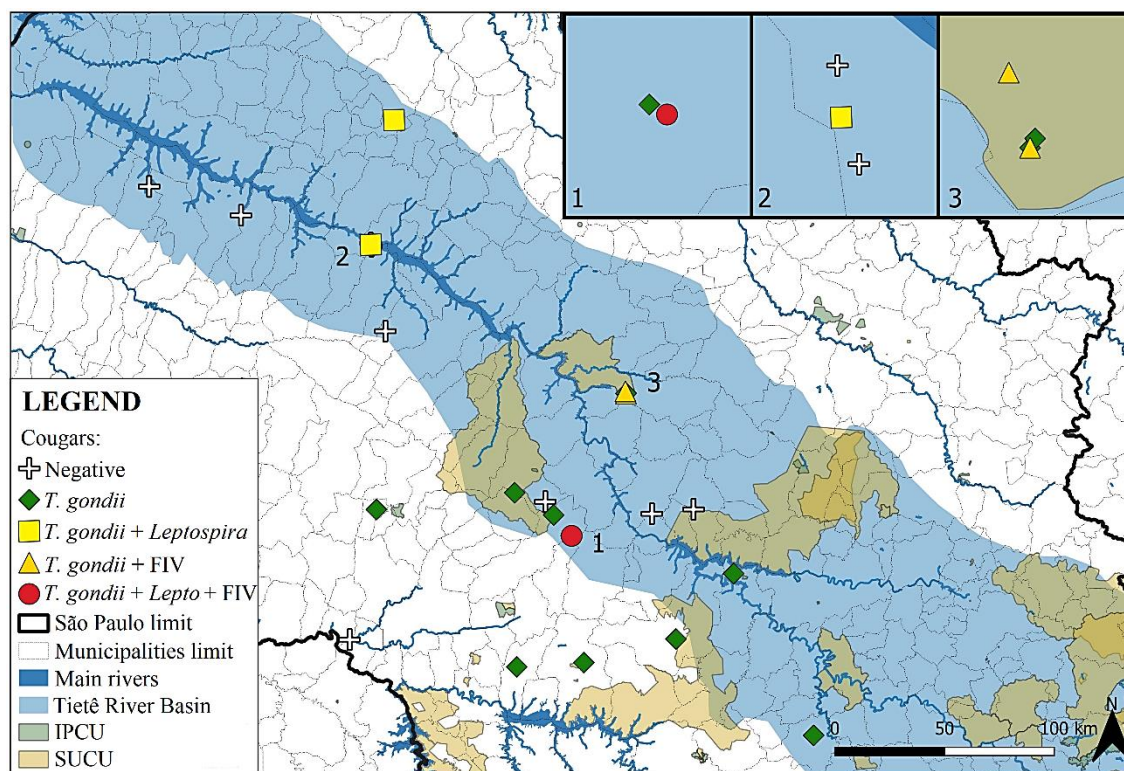


Figure 2. Occurrence of *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp. (serovar Djasiman) and FIV infections in free-ranging cougars in the State of São Paulo, Brazil. IPCU = Integral Protection Conservation Units; SUCU = Sustainable Use Conservation Units.

BIBLIOGRAFIA

- Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed., v. 2. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. 439 p.
- Adania CH, Silva JCR, Felipe PAN. Carnívora - Felidae (onça, suçuarana, jaguatirica e gato-do-mato). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed., v. 2. São Paulo: Roca; 2014. p. 779-818.
- Adler B, Moctezuma AP. Leptospira and leptospirosis. Veterinary Microbiology. 2010; 140:287-296.
- Alexander KA, Appel MJG. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. Journal of Wildlife Diseases. 1994; 30:481-485.
- Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* in vancouver island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. The Journal of Parasitology. 1998; 84(2):438-440.
- Arent ZJ, Gilmore C, Ayanz JM, Neyra QL, García Peña FJ. Molecular epidemiology of *Leptospira* serogroup Pomona infections among wild and domestic animals in Spain. EcoHealth. 2017; 14:48-57.
- Azevedo FC, Lemos FG, Almeida LB, Campos CB, Beisiegel BM, Paula RC, Crawshaw Junior PG, Ferraz KMP, Oliveira TG. *Puma concolor* (Linnaeus, 1771). In: Brasil. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: volume II – mamíferos. 1. ed. Brasília: ICMBio/MMA, 2018. p. 358-366.
- Bevins SN, Carver S, Boydston EE, Lyren LM, Alldredge M, Logan KA, Riley SPD, Fisher RN, Vickers TW, Boyce W, Salman M, Lappin MR, Crooks KR, VandeWoude S. Three pathogens in sympatric populations of pumas, bobcats, and domestic cats: implications for infectious disease transmission. PLoS ONE. 2012; 7(2):e31403.
- Brasil. ICMBio. Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação da onça-parda. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros - CENAP. Atibaia: ICMBio/MMA, 2017. 8 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de leptospirose. Centro Nacional de Epidemiologia. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.

- Canón-Franco WA, Araújo FAP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2013; 50(1):50-67.
- Carme B, Ajzenberg D, Demar M, Simon S, Dardé ML, Maubert B, Thoisy B. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. Veterinary Parasitology. 2009; 163(1-2):132-135.
- Casagrande RA, Silva TCE, Pescador CA, Borelli V, Souza Jr. JC, Souza ER, Traverso SD. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2013; 33(1):94-98.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. Infect Genet Evol. 2009; 9(5):760-768.
- Cheida CC, Nakano-Oliveira E, Fusco-Costa R, Rocha-Mendes F, Quadros J. Ordem Carnívora. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP. (Eds.). Mamíferos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. p. 231-239.
- Corrêa SHR, Vasconcellos SA, Moraes Z, Teixeira AA, Dias RA, Guimarães MAB, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2004; 41:189-193.
- Corrêa SHR. Leptospirose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 1. ed. São Paulo: Roca; 2006. p. 736-741.
- Costa A, Costa UM, Andrade MP. Vírus da leucemia felina em três felinos neotropicais. In: Anais do IX Congresso e XIV Encontro da ABRAVAS, 2005. São José do Rio Preto, p. 84.
- De Camps S, Dubey JP, Saville WJA. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the Midwestern United States. J. Parasitol. 2008; 94:648-653.
- Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Veterinary Parasitology, 2004; 126(1-2):57-72.
- Epiphany S, Sinhorini IL, Catão-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. Journal of Comparative Pathology. 2003; 129:196-204.
- Esteves FM, Guerra-Neto G, Girio RJ, Silva-Vergara ML, Carvalho AS. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários

- do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. Arq. Inst. Biol. 2005; 72(3):283-288.
- Fialho CG, Teixeira MC, Araújo FAP. Toxoplasmose animal no Brasil. Acta Scientiae Veterinariae. 2009; 37(1):1-23.
- Filoni C. Exposição de felídeos selvagens a agentes infecciosos selecionados [tese]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. 126 p.
- Filoni C, Catão-Dias JL. Infecções por retrovírus (FeLV e FIV) em felídeos selvagens - revisão - parte 1. Clínica Veterinária. 2005a; 10(54):56-64.
- Filoni C, Catão-Dias JL. Infecções por retrovírus (FeLV e FIV) em felídeos selvagens - revisão - parte 2. Clínica Veterinária. 2005b; 10(55):28-32.
- Filoni C, Adania CH, Durigon EL, Catão-Dias JL. Serosurvey for feline leukemia virus and lentiviruses in captive small neotropic felids in São Paulo State, Brazil. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2003; 34(1):65-66.
- Filoni C, Catão-Dias JL, Bay G, Durigon EL, Jorge RSP, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and Ehrlichia Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. Journal of Wildlife Diseases. 2006; 42(2):470-477.
- Fornazari F, Langoni H. Principais zoonoses em mamíferos selvagens. Veterinária e Zootecnia. 2014; 21(1):10-24.
- Fowler ME. Carnivora. In: Fowler ME. Zoo & Wildlife Medicine. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1986. p. 800-807.
- Franklin SP, Toryer JL, TerWee JA, Lyren LM, Kays RW, Riley SPD, Boyce WM, Crooks KR, Vandewoude S. Variability in assays used for detection of lentiviral infection in bobcats (*Lynx rufus*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*). Journal of Wildlife Diseases. 2007; 43(4):700-710.
- Furtado MM, Gennari SM, Ikuta CY. Serosurvey of smooth *Brucella*, *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic animals from Brazil. PLoS ONE. 2015; 10(11):e0143816.
- Genovez ME. Leptospirose em animais de produção. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2018. p. 378-387.

- Gomes-Keller MA, Tandon R, Gönczi E, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Vet. Microbiol.* 2006; 1:11-21.
- Guerra-Neto G, Girio RJS, Andrade TM, Koproski LP, Moraes E, Santos LC. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais pertencentes ao criadouro de animais silvestres da Itaipu Binacional e ao Zoológico Municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, Estado do Paraná. *Ars veterinaria.* 2004; 20(1):75-80.
- Hagiwara MK, Junior AR, Teixeira BM. Retrovíroses dos felinos: síndrome da imunodeficiência dos felinos. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2018a. p. 836-843.
- Hagiwara MK, Junior AR. Retrovíroses dos felinos: leucemia viral felina. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2018b. p. 825-835.
- Hunter L, Barrett P. A field guide to the carnivores of the world. 2. ed. Londres: Bloomsbury Publishing, 2018. 256 p.
- Jorge RSP, Ferreira F, Neto JSF, Vasconcellos SA, Lima ES, Morais ZM, Souza GO. Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp. in the northern Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106(4):441-444.
- Jorge RSP, Rocha FL, Júnior JAM, Morato RG. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecologia Australis.* 2010; 14(3):686-710.
- Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Martenson JS, Swift PK, O'Brien SJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Parasitology.* 2004; 120:1-9.
- Lafferty KD, Gerber LR. Good Medicine for Conservation Biology: The Intersection of Epidemiology and Conservation Theory. *Conservation Biology.* 2002; 16(3):593-604.
- Lilenbaum W, Monteiro RV, Albuquerque CE, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPL. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *The Veterinary Journal.* 2004; 168:191-193.
- Lima JC, Morgado TO, Ribeiro KR, Fontana C, Cândido SL, Dutra V, Nakazato L, Catroxo MHB, Aguiar DM, Borges JC. Infecção por morbillivirus canino

- em onça parda (*Puma concolor*) no estado de Mato Grosso, Brasil – relato de caso. Biodiversidade. 2020; 19(3):211-219.
- Little S, Levy J, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, Olah G, Denis KS. 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. Journal of Feline Medicine and Surgery. 2020; 22:5-30.
- Loveridge AJ, Wang SW, Frank LG, Seidensticker J. People and wild felids: conservation of cats and management of conflicts. In: Macdonald DW, Loveridge AJ (eds.). Biology and Conservation of Wild Felids. Oxford University Press, 2010. p. 161-195.
- Marvulo MFV, Carvalho VM. Zoonoses. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed., v. 2. São Paulo: Roca, 2014. p. 2152-2177.
- Mazzolli M. Mosaics of exotic forest plantations and native forests as habitat of pumas. Environmental Management. 2010; 46(2):237-253.
- Menezes RCAA. Coccídios. In: Monteiro SG. Parasitologia na medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2011. p. 149-151.
- Michna SW, Campbel RSF. Leptospirosis in wild animals. J. Comp. Pathol. 1970; 8:101-106.
- Millán J, Candela MG, López-Bao JV, Pereira M, Jiménez MA, León-Vizcaíno L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2009; 9(5):549-554.
- Nava AFD. Espécies sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo [tese]. Universidade de São Paulo, 2008.
- Nielsen C, Thompson D, Kelly M, Lopez-Gonzalez C.A. *Puma concolor* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species. 2015:e.T18868A97216466.
- OIE – World Organisation for Animal Health. Toxoplasmosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 6. ed., v. 2, p. 1284-1293, 2008.
- Onuma SSM, Melo ALT, Kantek DLZ, Crawshaw-Junior PG, Morato RG, May-Júnior JA, Pacheco TA, Aguiar DM. Exposure of free-living jaguars to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in the Brazilian Pantanal. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2014; 23(4):547-553.

- Paes A. Leptospirose canina. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2018. p. 356-377.
- Pedersen AM, Jones KE, Nunn CL, Altizer S. Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. *Conservation Biology*. 2007; 21(5):1269-1279.
- Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: reported outbreaks and literature review (2002–2014). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2014; 11:10770-10789.
- Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos SA, Morais ZM, Silva JCR, Neto JE. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesq. Vet. Bras*. 2009; 29(12):1009-1014.
- Rivetti Jr A.V., Caxito F.A., Resende M., Lobato Z.I.P. Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2018; 60:1281-1283.
- Roelke-Parker ME, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien SJ, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mwamengele GLM, Mgasia MN, Machange GA, Summers BA, Appel MJG. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*. 1996; 379:441-445.
- Sanches IM, Lavín S. Métodos de vigilância epidemiológica em fauna selvagem. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed., v. 2. São Paulo: Roca, 2014. p. 2178-2185.
- Sedlák E, Bártová E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet. Parasitol*. 2006; 136:223-231.
- Sillero-Zubiri C, King AA, Macdonald DW. Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases*. 1996; 32(1):80-86.
- Silva CS, Gírio RJS, Guerra-Neto G, Brich M, Santana LAS, Amâncio FH, Mariani JR, Wessort PMF. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em animais selvagens do zoológico municipal de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 2010; 47(3):237-242.

- Silva JCR. Toxoplasmose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 768-784.
- Silva JCR, Ogassawara S, Adania CH, Ferreira F, Gennari SM, Dubey JP, Ferreira-Neto JS. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. Vet. Parasitol. 2001; 102:217-224.
- Smith KF, Behrens MD, Sax F. Local scale effects of disease on biodiversity. EcoHealth. 2009; 6:287-295.
- Soulé ME, Terborgh J. Conserving nature at regional and continental scales - a scientific program for North America. BioScience. 1999; 49(10):809-817.
- Spencer JA, Higginbotham MJ, Blagburn BL. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. J. Zoo Wildl. Med. 2003; 34:246-249.
- Teixeira BM, Hagiwara MK, Cruz JCM, Hosie MJ. Feline Immunodeficiency Virus in South America. Viruses. 2021; 4:383-396.
- Tensen L. Biases in wildlife and conservation research, using felids and canids as a case study. Global Ecology and Conservation. 2018; 15:e00423.
- Ullmann LS, Hoffmann JL, De Moraes W, Cubas ZS, Santos LC, Silva RC, Moreira N, Guimaraes ANS, Camossi LG, Langoni H, Biondo AW. Serologic survey for *Leptospira* spp. in captive neotropical felids in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2012; 43(2):223-228, 2012.
- Ullmann LS, Langoni H. Interactions between environment, wild animals and human leptospirosis. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2011; 17(2):119-129.
- Vieira AS, Lilenbaum W. Leptospirosis on captive wild animals in Latin America. Research in Veterinary Science. 2017; 115:496-500.
- Widmer CE. Perfil sanitário de onças-pintadas (*Panthera onca*) de vida livre no Pantanal Sul do Mato Grosso do Sul - Brasil [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
- Williams ES, Thorne ET, Appel MJG, Belitsky DW. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from wyoming. Journal of Wildlife Diseases. 1988; 24(3):385-398.