

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS
SILVESTRES DE VIDA LIVRE DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP**

FELIPE FORNAZARI

Botucatu – SP
Junho/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS
SILVESTRES DE VIDA LIVRE DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP**

FELIPE FORNAZARI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, FMVZ - UNESP - Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Botucatu – SP
Junho/2015

Nome do autor: Felipe Fornazari

Título: EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS SILVESTRES
DE VIDA LIVRE DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Dra. Virgínia Bodelão Richini-Pereira

Membro Titular

Núcleo de Ciências Biomédicas, Instituto Adolfo Lutz – Bauru

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Membro Titular

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de
Pernambuco

Profa. Titular Jane Megid

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Márcia Marinho

Membro Suplente

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Medicina
Veterinária – UNESP – Araçatuba

Data da defesa: 14 de maio de 2015

DEDICATÓRIA

Aos animais silvestres que permitiram a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

A logística deste trabalho exigiu muito tempo e esforço para a obtenção das amostras biológicas, e sua realização não seria possível sem a colaboração de muitas pessoas. Sou muito grato a todos, especialmente:

Ao Prof. Helio Langoni, por aceitar minha proposta para esta tese, pelos ensinamentos e pela confiança depositada em mim durante tanto tempo. O profissional que me tornei hoje é fruto de todos esses anos que trabalhamos juntos. O senhor foi, e ainda é, não só uma grande referência como professor, como também um amigo presente nos momentos de dificuldade e insegurança, sempre preocupado em ajudar seus alunos. Espero ter correspondido da mesma forma durante quase 9 anos de convivência. Muito obrigado;

Ao prof. Carlos Roberto Teixeira (Carlinhos), por permitir a amostragem dos animais do CEMPAS e, principalmente, pela amizade, ensinamentos e liberdade para trabalhar com os animais silvestres da universidade. Com o senhor aprendi muito sobre como se relacionar com outras pessoas e como trabalhar em equipe;

À aluna e amiga Pamela Merlo Marson, por me acompanhar em grande parte das exaustivas e demoradas atividades de campo. Sua presença no início do trabalho foi essencial para o sucesso nas capturas dos animais;

A todos os amigos, residentes, estagiários e alunos das mais diversas áreas da UNESP-Botucatu, bem como aos funcionários da Vigilância Ambiental em Saúde da Secretaria da Saúde de Botucatu. Todos contribuíram muito para a captura dos animais e colheita das amostras: Daniela, Guilherme, Lygia, Bárbara, Gustavo, Felipe, Luisa, Valdinei, Rodrigo, Mario, Gislaine, Mariana, Regina, Henrique, João Marcelo, Selene, Alicia, Diogo e Alexandra.

Às residentes Marina e Mariana e à professora Regina Takahira do Laboratório Clínico por realizarem os exames laboratoriais complementares;

Ao colega e epidemiologista Diego Borin Nóbrega, por realizar a análise estatística do trabalho e pelas correções gramaticais do artigo científico;

Aos membros da banca do exame de qualificação, Dra. Virgínia Bodelão Richini-Pereira e prof. João Pessoa Araújo Junior pelas sugestões para esta tese;

Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja, com quem tive a oportunidade de realizar estágio em docência e aprofundar meus conhecimentos na área de epidemiologia e saneamento.

À minha namorada e grande companheira, Raíssa Vasconcelos Cavalcante, pela ajuda com a formatação e revisão gramatical da tese. Sua presença em minha vida me fez uma pessoa melhor e mais feliz. Te amo muito.

Aos meus queridos pais, Bel e Sergio, pelo amor, amizade e apoio. Amo muito vocês.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, UNESP, Botucatu) e às supervisões das Fazendas Lageado e Edgardia e do Jardim Botânico por autorizarem a captura dos animais;

À Fapesp por financiar o estudo e ceder a bolsa de doutorado; à Capes e ao CNPq por fornecerem parte da bolsa de doutorado.

Lista de tabelas

TABELA 1: Frequência absoluta, relativa (%) e prevalência de animais silvestres positivos para o diagnóstico de leptospirose na região de Botucatu, SP. **30**

TABELA 2: Frequência absoluta de animais silvestres reagentes para diferentes sorogrupos de *Leptospira* spp. pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) na região de Botucatu, SP. **31**

TABELA 3: Frequência absoluta e relativa (%) de gambás positivos para o diagnóstico de leptospirose na região de Botucatu, SP, de acordo com o local de origem. **32**

TABELA 4: Frequência absoluta e relativa (%) de quatis positivos para o diagnóstico de leptospirose na região de Botucatu, SP, de acordo com o local de origem. **32**

Lista de Figuras

Figura 1: Interação entre quatis e pessoas em área urbana do município de Botucatu, SP. Fonte: NUPEZO. **10**

Figura 2: Mapa da Fazenda Lageado, Botucatu, SP. Os pontos vermelhos indicam os locais onde foram instaladas armadilhas para a captura de animais silvestres. Fonte: Google Maps. **18**

Figura 3: Mapa da Fazenda Edgardia, Botucatu, SP. Os pontos vermelhos indicam os locais onde foram instaladas armadilhas para a captura de animais silvestres. Fonte: Google Maps. **19**

Figura 4: Mapa do Jardim Botânico da UNESP, Botucatu, SP. O ponto vermelho indica o local onde foram instaladas armadilhas para a captura de animais silvestres. Fonte: Google Maps. **20**

Lista de abreviaturas

DNA: ácido desoxirribonucleico

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

IC: intervalo de confiança

LERG: Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group

MAT: Microscopic Agglutination Test

min: minutos

ml: mililitros

NUPEZO: Núcleo de Pesquisa em Zoonoses

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: pares de bases

qPCR: reação em cadeia pela polimerase quantitativa (*quantitative real time polymerase chain reaction*)

rcf: força centrífuga relativa (*relative centrifugal force*)

s: segundos

SAM: Soroaglutinação Microscópica

SP: São Paulo

SST: solução salina tamponada

µl: microlitro

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Revisão de literatura	6
Objetivos	13
Material e métodos	15
Delineamento experimental	16
Captura dos animais	17
Animais encaminhados ao CEMPAS	17
Contenção e anestesia dos animais capturados	18
Avaliação clínica dos animais	20
Colheita e preparo das amostras	21
Exames complementares	21
Exame sorológico	22
Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR)	23
Análise estatística	23
Resultados	26
Animais	27
Exame sorológico	27
Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR)	27
Associação da SAM e qPCR	28
Avaliação clínica dos animais	28
Análise estatística	29
Discussão	33
Conclusão	39
Referências bibliográficas	41
Artigo científico	50

FORNAZARI, F. **Epidemiologia da leptospirose em mamíferos silvestres de vida livre da região de Botucatu, SP**. Botucatu, 2015. 60p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de grande importância em animais e humanos. Devido à falta de estudos em animais silvestres, o presente estudo teve como objetivo investigar a epidemiologia da leptospirose em mamíferos silvestres de vida livre da região de Botucatu, SP. Foram colhidas amostras de sangue e urina de 309 animais, distribuídos em 16 espécies. O diagnóstico de leptospirose foi realizado pelas técnicas de Soroaglutinação Microscópica e PCR em tempo real (qPCR). Foram analisadas possíveis associações entre a positividade no diagnóstico, alterações clínicas e local de origem dos animais. Foram positivos 64 animais (20,7%), com maiores prevalências nas seguintes espécies: furão (83,3%), cachorro do mato (75%), lobo guará (66,6%) e quati (30,3%). O sorogrupo Semaranga foi o mais frequente, principalmente entre os gambás. Não foi observada uma associação positiva entre o diagnóstico de leptospirose e alterações clínicas. Gambás provenientes da mata apresentaram maiores chances de infecção em relação aos localizados na área urbana (*Odds Ratio* = 3,87). Os resultados permitiram concluir que uma grande diversidade de mamíferos silvestres apresentou infecção por *Leptospira* spp. na região de Botucatu; existem diferenças significativas na prevalência de infecção entre espécies, com maior positividade em indivíduos das famílias Canidae e Mustelidae; a leptospirose apresentou baixa morbidade nos animais estudados; os gambás apresentaram uma alta prevalência de infecção por leptospiros saprófitas; e fatores ambientais estão envolvidos na maior prevalência de infecção em gambás provenientes da mata em relação aos gambás localizados na área urbana.

Palavras chave: animais silvestres, *Leptospira*, PCR em tempo real, Uma Saúde, *One Health*, Soroaglutinação Microscópica, zoonose.

FORNAZARI, F. **Epidemiology of leptospirosis in free-ranging wild mammals from Botucatu, SP**. Botucatu, 2015. 60p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Leptospirosis is considered a zoonoses of great importance in animals and humans. Due to the lack of studies in wild animals, the present study aimed to investigate the epidemiology of leptospirosis in free-ranging wild mammals from Botucatu, SP. Blood and urine samples were collected from 309 animals, distributes in 16 species. Leptospirosis diagnosis was performed by Microscopic Agglutination Test (MAT) and Real Time PCR (qPCR). Correlations between positivity, clinical disorders and origin of animals were assessed. Sixty-four (20.7%) animals were positive, with higher prevalence among the following species: lesser grisson (83.3%), crab-eating fox (75%), maned wolf (66.6%) and coatis (30.3%). Semaranga serogroup was the most prevalent, especially in opossums. No positive association was observed between diagnosis and clinical disorders. Opossums from forests presented higher chances of infection than those from urban areas (Odds Ratio = 3.87). The results demonstrated the high diversity of wild mammals infected by *Leptospira* spp. in Botucatu; there are significant differences in the prevalence of infection between species, with higher positivity in Canidae and Mustelidae families; leptospirosis presented low morbidity in the studied animals; opossums presented high prevalence of infection by saprophyte leptospire; and environmental features are involved in the higher prevalence of infection in opossums from the forest than those from urban areas.

Key-words: *Leptospira*, Microscopic Agglutination Test, One Health, real time PCR, wild animals, zoonosis.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A pesquisa de doenças infecciosas em animais silvestres possui grande importância no contexto atual. Nos últimos anos, houve um grande aumento no número de estudos voltados para este tema. O conceito de Saúde Única, também conhecido como *One Health*, exemplifica muito bem a importância destes estudos: a saúde pública, animal e ambiental deve ser entendida e trabalhada de forma integrada, pois existe uma importante relação de causa e efeito entre as mesmas (GEBREYES et al., 2014). Assim, conhecer as enfermidades de natureza infecciosa em animais silvestres possui implicações na saúde dos próprios animais, visando protegê-los; na saúde humana, ao identificar possíveis transmissores de tais enfermidades; e, por fim, na saúde ambiental, pois permite identificar possíveis mudanças na dinâmica de uma doença, as quais são causadas por alterações no meio ambiente - como aumento do índice pluviométrico, temperatura média, acúmulo de lixo, entre muitas outras.

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial, considerada endêmica em muitos países, incluindo o Brasil. Sua epidemiologia está diretamente relacionada às mudanças ambientais, o que a torna um excelente modelo para estudos que abordam o conceito de *One Health* (JANCLOES et al., 2014). Outros aspectos de ordem social e política também estão intimamente envolvidos, especialmente no que se refere à ocorrência de surtos. Poucos estudos sobre leptospirose em animais silvestres foram realizados no Brasil, os quais apresentam muitas limitações em sua metodologia. Geralmente estes estudos consistem em inquéritos sorológicos, realizados em poucos exemplares provenientes de cativeiro (ESTEVES et al., 2005; LILENBAUM et al., 2005; PIMENTEL et al., 2009; SILVA et al., 2010; PINNA et al., 2012; ULLMANN et al., 2012a; PROENÇA et al., 2013).

O Brasil é considerado um dos países com a maior biodiversidade do planeta (BEGOSSI et al., 2003). A grande quantidade de espécies animais e vegetais, aliadas à extensão de nosso território, ao clima tropical e à diversidade de biomas, constitui uma rede complexa de relações na cadeia de transmissão de enfermidades infecciosas.

Diante da importância da leptospirose, da abundante fauna silvestre no Brasil e das limitações dos estudos encontrados na literatura, o presente trabalho procurou investigar a epidemiologia da leptospirose em uma população representativa de animais silvestres utilizando técnicas sorológicas e moleculares, focando principalmente os riscos para saúde pública. Também foram abordados aspectos de saúde animal, pela avaliação clínica dos mesmos, bem como a influência de diferentes condições ambientais na epidemiologia desta enfermidade. Assim, foi possível uma extensa e profunda análise sobre a epidemiologia da leptospirose na fauna silvestre de Botucatu.

REVISÃO DE
LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma enfermidade infecto-contagiosa, de caráter zoonótico e ampla distribuição mundial. Possui grande importância em saúde pública e saúde animal devido à gravidade das lesões, bem como aos prejuízos econômicos, decorrentes principalmente do tratamento dos doentes e das perdas na produção animal (LEVETT, 2001).

Diversas espécies de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* spp. são responsáveis pela etiologia da leptospirose, enquanto que outras espécies, consideradas não-patogênicas (ou saprófitas), possuem menor importância clínica. Segundo Levett (2005), atualmente as leptospirosas são classificadas em 9 espécies patogênicas (*L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpeterseni*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchi*, *L. santarosai* e *L. weilii*), 5 espécies de patogenicidade intermediária (*L. licerasiae*, *L. wolffii*, *L. fainei*, *L. inadai* e *L. broomii*) e 6 espécies não patogênicas (*L. vanthiellii*, *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. terpstrae*, *L. meyeri* e *L. yanagawae*). As leptospirosas são ainda subdivididas em mais de 300 sorovares, os quais apresentam características fenotípicas específicas, determinadas pelos seus antígenos de superfície presentes na membrana citoplasmática. Portanto, esta classificação não é baseada no genótipo – um erro muito comum observado na literatura –, e diferentes espécies de leptospirosas podem apresentar o mesmo sorovar, dependendo dos antígenos expressos em sua membrana. Diferentes sorovares podem apresentar imunidade cruzada e, nestes casos, os mesmos são agrupados em sorogrupos. Em razão disso, a literatura internacional recomenda utilizar a nomenclatura baseada em sorogrupos ao fazer referência ao resultado de testes sorológicos que utilizam sorovares como antígenos.

A infecção ocorre principalmente pela penetração ativa da bactéria pelas mucosas ou soluções de continuidade, tanto de forma direta (contato com animais infectados) como indireta (contato com água ou solo úmido contaminado). Uma vez infectados, animais e humanos eliminam as leptospirosas pela urina, completando assim o ciclo epidemiológico da doença (GUERRA, 2013).

Leptospiras são pouco resistentes no ambiente, necessitando de condições adequadas de temperatura, pH e umidade para sobreviver. Portanto, os reservatórios são essenciais na manutenção da enfermidade, atuando como portadores renais e eliminando as leptospiras pela urina de forma intermitente durante longos períodos. Os roedores sinantrópicos são considerados os reservatórios mais importantes da leptospirose (BARTHI et al., 2013), destacando-se a espécie *Rattus norvegicus* (popularmente chamada de ratazana), a qual possui grande adaptação às leptospiras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Diversas espécies domésticas também são consideradas importantes reservatórios, como suínos, ovinos, caprinos e bovinos (MIRAGLIA et al., 2008; FORNAZARI et al., 2012; GAMAGE et al., 2014).

A epidemiologia da leptospirose é complexa, apresentando diferentes características em cada região, incluindo reservatórios, sorogrupos, espécies de leptospiras e mecanismos de transmissão. De forma geral, sua ocorrência é mais frequente em países tropicais, onde as condições de temperatura e umidade favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente, resultando assim em altas taxas de incidência tanto em animais como em humanos (LEVETT, 2001). De acordo com estimativas realizadas em 2011 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 500.000 casos de leptospirose humana ocorrem anualmente em todo o mundo. Porém, uma nova estimativa que está atualmente sendo realizada pelo *Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group* (LERG), coordenado pela OMS, indicam uma incidência anual de mais de um milhão de casos e 60.000 mortes em todo o mundo.

No Brasil, a leptospirose é considerada endêmica, ocorrendo com frequência surtos epidêmicos durante o verão, principalmente em regiões que apresentam saneamento básico inadequado. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, entre 2007 e 2012 foram notificados 99.675 casos de leptospirose humana em nosso país, dos quais 22.233 foram confirmados, indicando uma média anual de 3.075 casos. No mesmo período, foram registrados 9.108 óbitos, correspondendo a uma letalidade de 9,4% (SCHNEIDER et al., 2014). Provavelmente estes índices são ainda mais elevados, pois a leptospirose ainda é uma doença negligenciada e, assim, muitos casos não são notificados. As causas incluem a indisponibilidade de

diagnóstico laboratorial e, principalmente, a dificuldade em se realizar o diagnóstico diferencial para outras enfermidades que apresentam sinais clínicos muito semelhantes, tais como dengue, febre amarela, hantavirose, malária, febre maculosa, influenza, entre muitas outras (SCHNEIDER et al., 2014).

Na maioria dos casos de infecção por *Leptospira* spp., o quadro clínico é assintomático ou brando, independente da espécie. Em humanos ocorrem febre, dores musculares e enxaqueca. Entretanto, uma parcela significativa de casos pode apresentar sintomas mais graves, como icterícia, hemorragias generalizadas e insuficiência renal, resultando em óbito (LAROCQUE et al., 2005). Muitos fatores estão envolvidos no desfecho clínico da leptospirose, como imunidade do paciente, carga bacteriana infectante e cepa envolvida. Em cães domésticos os sinais clínicos são semelhantes (GREENE et al., 2006), enquanto que algumas espécies domésticas manifestam sintomas de ordem reprodutiva. Em bovinos, pequenos ruminantes e suínos ocorrem abortamento, infertilidade, partos prematuros, nascimento de filhotes doentes, retenção de placenta, orquite e mastite (LEVETT, 2001).

Devido à proximidade com humanos, importância econômica e facilidade na amostragem, as espécies domésticas são muito mais estudadas do que as espécies silvestres, não somente no campo da leptospirose, mas de diversas enfermidades. A pesquisa de leptospirose em animais silvestres pode fornecer informações a respeito da condição de portador renal e, conseqüentemente, indicar seu potencial como fonte de infecção. Outro importante aspecto que justifica esse tipo de investigação é o papel dos animais como sentinelas, indicando assim a dispersão do micro-organismo no ambiente. Estes estudos devem ser priorizados em áreas urbanas e rurais, onde existe uma maior proximidade entre animais silvestres, domésticos e humanos.

Pouco se sabe sobre os riscos que a fauna silvestre representa como fonte de infecção para leptospirose, e a identificação das espécies que podem atuar como transmissoras é muito importante para a adoção de medidas preventivas. Atualmente os roedores são considerados os principais reservatórios silvestres e, conseqüentemente, a prevenção da leptospirose envolve ações direcionadas para o controle populacional desta espécie. Por

outro lado, permanece desconhecido o papel de outras espécies, algumas inclusive muito frequentes no ambiente urbano, como é o caso de gambás, morcegos e quatis (Figura 1). Nestes casos, eventualmente, informações equivocadas são disseminadas pela população sobre os reais riscos que os estes animais representam para a saúde pública, devido às crenças populares ou pelo acesso à literatura não especializada.



Figura 1. Interação entre quatis e pessoas em área urbana do município de Botucatu, SP. Fonte: NUPEZO

Conforme mencionado anteriormente, a literatura sobre leptospirose em animais silvestres no Brasil se limita, em sua grande maioria, a inquéritos sorológicos. Um importante trabalho foi realizado por Jorge et al. (2011) na região do Pantanal, onde foi estudada uma quantidade significativa de animais. Os autores identificaram uma elevada soroprevalência em 75 carnívoros silvestres de vida livre, especialmente para os sorovares Australis, Autumnalis, Canicola, Pyrogenes e Pomona. Em relação a animais de cativeiro, são descritos inquéritos sorológicos em dois dos maiores zoológicos do Brasil. Na

Fundação Parque Zoológico de São Paulo foi identificada uma grande diversidade de sorovares em 19,5% dos animais estudados (CORREIA et al., 2004), enquanto que no Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba, SP) foi observada uma baixa prevalência (5,6%) de animais soropositivos (ULLMANN et al. 2012b). Muitos outros trabalhos similares foram descritos no Brasil, entretanto, grande parte foi realizada com poucos animais, questionando assim a credibilidade de seus resultados em relação aos trabalhos supracitados.

Do ponto de vista de saúde animal, os estudos são ainda mais escassos. Os poucos trabalhos descritos na literatura descrevem principalmente casos de leptospirose em animais de cativeiro. Szonyii et al. (2011) relataram um surto em uma colônia de macacos prego (*Cebus spp.*) mantidas em cativeiro na Colômbia. Muitos animais apresentaram sinais clínicos típicos de leptospirose, e alguns casos evoluíram para o óbito, resultando em uma taxa de mortalidade de 27%. Segundo os autores, roedores sinantrópicos foram a provável fonte de infecção. Curiosamente, outro trabalho de grande relevância sobre o assunto também envolve primatas. Baitchman et al. (2006) descreveram dois casos de leptospirose em saguis (*Callithrix kuhlii*) mantidos em um zoológico nos Estados Unidos da América. Ambos os animais também apresentaram sinais clínicos clássicos de leptospirose e um dos exemplares veio a óbito.

Em relação aos animais de vida livre, as publicações mais relevantes – considerando os periódicos nos quais foram publicadas – envolvem mamíferos marinhos na América do Norte (GULLAND et al., 1996; COLEGROVE et al., 2005; LLOYD-SMITH et al., 2007; DELANEY et al., 2014). A literatura descreve vários casos de animais encontrados doentes ou mortos na praia desde o começo da década de 1970. As espécies mais acometidas são o leão marinho (*Zalophus californianus*), o elefante marinho (*Mirounga agustirostris*) e a foca (*Phoca vitulina*). Apesar da escassez de estudos sobre o impacto da leptospirose na saúde dos animais silvestres, estas publicações indicam o potencial desta doença como ameaça para a conservação de algumas espécies. Esta observação já foi constatada com outras enfermidades, as quais foram responsáveis por causar grandes impactos em populações de animais selvagens em vida livre, como, por exemplo, o botulismo em mamíferos e aves

na Itália (DEFILIPPO et al., 2013) e a cinomose e a raiva em leões (*Panthera leo*) e cães selvagens (*Lycaon pictus*), respectivamente, ambos na África do Sul (ROELKE-PARKER et al., 1996; CLEVELAND et al., 2007).

O meio ambiente exerce um papel essencial na epidemiologia da leptospirose. Surtos da doença ocorrem - na maioria das vezes - após longos períodos de chuva (CANN et al., 2013; SAITO et al., 2014), que permitem a ampla disseminação do agente no ambiente e aumentam os riscos de infecção tanto em animais como em humanos. O clima quente também é favorável para a ocorrência da enfermidade, pois as leptospirosas são muito sensíveis a baixas temperaturas, motivo pelo qual a leptospirose é comum em regiões de clima temperado. Outras variáveis ambientais muito importantes são aquelas envolvidas na disponibilidade de alimento e abrigo para roedores. Acúmulo de lixo doméstico, entulho, saneamento básico inadequado e ausência de redes de esgoto são exemplos de situações favoráveis a presença de roedores, e geralmente, estão presentes em comunidades com poucas condições socioeconômicas (COSTA et al., 2014). De maneira muito simplificada e generalista, a epidemiologia da leptospirose se caracteriza por dois ciclos: o urbano, que é o mais comum, de transmissão indireta e cujos principais reservatórios são os roedores sinantrópicos; e o rural, menos frequente, de transmissão tanto direta como indireta, onde os principais reservatórios são os animais domésticos de produção, principalmente os bovinos, pequenos ruminantes e suínos. Entretanto, esta classificação é superficial e, conforme exposto, muitas variáveis estão envolvidas na epidemiologia desta doença.

Concluindo, a leptospirose é considerada uma enfermidade complexa, influenciada por inúmeros fatores e carente de informações em diversas áreas. É crescente o número pesquisas sobre esta doença e nos últimos anos as ferramentas de biologia molecular e bioinformática iniciaram uma nova era de estudos sobre as leptospirosas, principalmente no que concerne à epidemiologia e à biologia desta bactéria (REN et al., 2003; KO et al., 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em amostras de sangue de mamíferos silvestres de vida livre, seus títulos e quais os sorogrupos mais frequentes;
- Pesquisar o DNA genômico específico para o gênero *Leptospira* spp. em amostras de urina de animais silvestres pela PCR em tempo real (qPCR);
- Avaliar o impacto da leptospirose na saúde dos animais silvestres, pela correlação entre os resultados da sorologia/qPCR e as alterações clínicas dos animais;
- Comparar os resultados do diagnóstico de leptospirose entre as diferentes espécies, determinando quais são as mais acometidas e/ou mais frequentes fontes de infecção;
- Investigar a influência de fatores ambientais na infecção por *Leptospira* spp., por meio da associação entre a positividade dos animais com seus respectivos habitats de origem.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O estudo foi realizado no município de Botucatu, SP (22° 53' 09" S 48° 26' 42" O). Para a amostragem dos animais foram utilizadas duas técnicas: (1) captura por meio de armadilhas em fragmentos florestais e (2) acompanhamento da casuística do Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Selvagens (CEMPAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP - Botucatu. Foram analisados somente mamíferos de vida livre, enquanto que outras classes taxonômicas ou animais de cativeiro foram excluídos do estudo.

Ambos os métodos de amostragem selecionados permitiram o estudo de populações representativas da região de Botucatu, diminuindo assim a possibilidade de vieses na análise epidemiológica. Tanto a captura como a amostragem dos animais encaminhados ao CEMPAS foram distribuídas de forma homogênea, tanto temporal quanto espacial ao longo de 22 meses.

Devido à falta de estudos semelhantes na literatura, não foi possível determinar de forma confiável o número mínimo de animais a serem amostrados para que se obtivessem resultados expressivos. De forma empírica, foi estabelecido um número de 300 a 400 animais, considerando-se o tempo do estudo e a experiência prévia da equipe em trabalhos anteriores. Entretanto, ao fim da amostragem dos animais foi realizado um cálculo estatístico utilizando como referência o trabalho publicado por Souza Júnior et al. (2006), o qual possui metodologia similar, considerando as espécies, procedência dos animais e técnicas de diagnóstico. Foi utilizado o site OpenEpi (www.openepi.com), considerando uma prevalência de 12,6% e intervalo de confiança de 95%, obtendo-se assim um número mínimo de 163 animais, indicando que a quantidade inicialmente proposta era suficiente para a realização do estudo.

A colheita das amostras biológicas foi realizada a campo, no mesmo local da captura dos animais, bem como no CEMPAS, durante os procedimentos ambulatoriais. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao Núcleo de

Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) da FMVZ - UNESP - Botucatu, para serem armazenadas e analisadas.

O estudo foi realizado segundo a aprovação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), mediante autorização emitida pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO), nº 33162-2. O estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMVZ - UNESP - Botucatu (protocolo nº 10/2012).

Captura dos animais

Para a captura dos animais foram selecionados fragmentos florestais localizados na Fazenda Lageado, na Fazenda Edgardia e no Jardim Botânico do Instituto de Biociências, todos pertencentes à UNESP – Botucatu (Figuras 2, 3 e 4). O principal critério adotado para a seleção destes locais foi a extensão territorial – capaz de suportar grandes populações de animais silvestres – além da facilidade de acesso e conhecimento prévio da fauna existente.

As capturas foram realizadas mensalmente, entre abril de 2012 e janeiro de 2014, com duração variável de 4 a 10 dias/mês, dependendo das condições climáticas e da disponibilidade da equipe. Foram empregadas armadilhas do tipo *tomahawk* (Gabrisa®), de metal galvanizado, dobráveis, medindo 40 x 40 x 70 cm. De 5 a 20 armadilhas eram utilizadas em cada local de captura (pontos vermelhos nos mapas), dependendo do tamanho do fragmento florestal e inclinação do terreno. As armadilhas eram instaladas pela manhã, sob a sombra, iscadas com banana e/ou carne crua (cabeça de frango) e verificadas na manhã do dia seguinte.

Animais encaminhados ao CEMPAS

A casuística do CEMPAS foi acompanhada diariamente. As amostras biológicas foram colhidas durante os procedimentos ambulatoriais de rotina, no momento em que os animais se encontravam anestesiados. Nos casos em que não foi possível a colheita no momento da admissão do animal, este procedimento foi realizado em um período de até quatro dias após sua chegada ao CEMPAS. Se a amostragem do animal só fosse possível em um período superior a quatro dias, o mesmo não era incluído no estudo. Assim, foi

possível evitar a análise de animais que possivelmente tivessem se infectado durante sua manutenção em cativeiro, uma vez que a soroconversão e eliminação de leptospiros pela urina ocorre após sete dias de infecção (LEVETT, 2001).

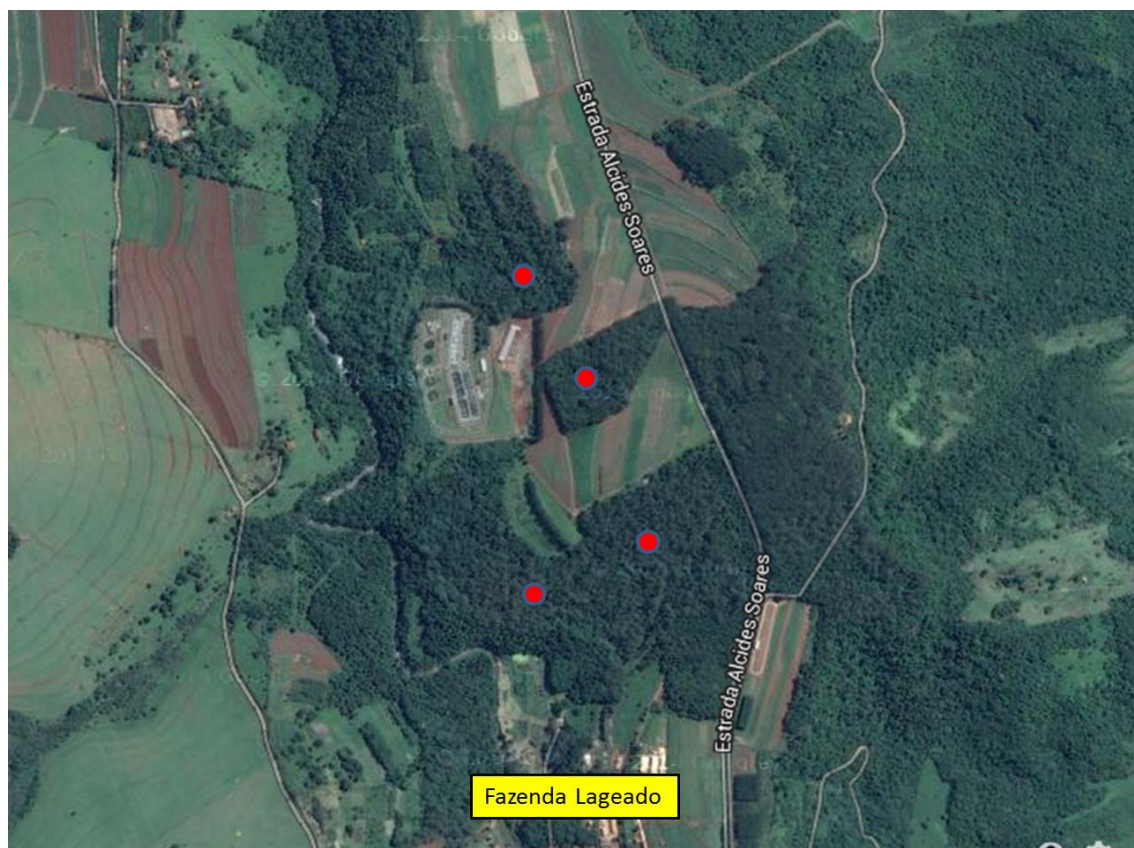


Figura 2. Mapa da Fazenda Lageado, Botucatu, SP. Os pontos vermelhos indicam os locais onde foram instaladas armadilhas para a captura de animais silvestres. Fonte: Google Maps.

Contenção e anestesia dos animais capturados

Os animais capturados em seu ambiente natural foram anestesiados para a colheita de material biológico. A contenção física foi realizada utilizando-se luvas de raspa de couro e/ou puçás, seguida da aplicação do anestésico. Em alguns casos a anestesia foi aplicada por meio de dardos artesanais e zarabatana, para garantir uma maior segurança da equipe e do animal.

A anestesia foi realizada pela associação dos anestésicos cloridrato de quetamina (Dopalen®) e midazolan (Dormire®), utilizando-se doses

apropriadas para cada espécie, conforme a literatura consultada (CUBAS et al., 2006) e a experiência dos profissionais envolvidos. Esta combinação foi escolhida devido à sua eficiência e segurança, considerando-se os procedimentos que foram realizados, além de rápido retorno anestésico.

Os animais foram devidamente identificados com brincos metálicos (Zootech®) modelo ZT 900 7 mm, para evitar a amostragem repetida de um mesmo indivíduo caso ele fosse recapturado.

Após a colheita das amostras, os animais foram colocados novamente no interior das armadilhas, a qual foi coberta por um pano para diminuir o estresse do animal durante sua recuperação, bem como proteger de insetos parasitas. Os animais foram soltos somente após total ausência dos efeitos da medicação anestésica.

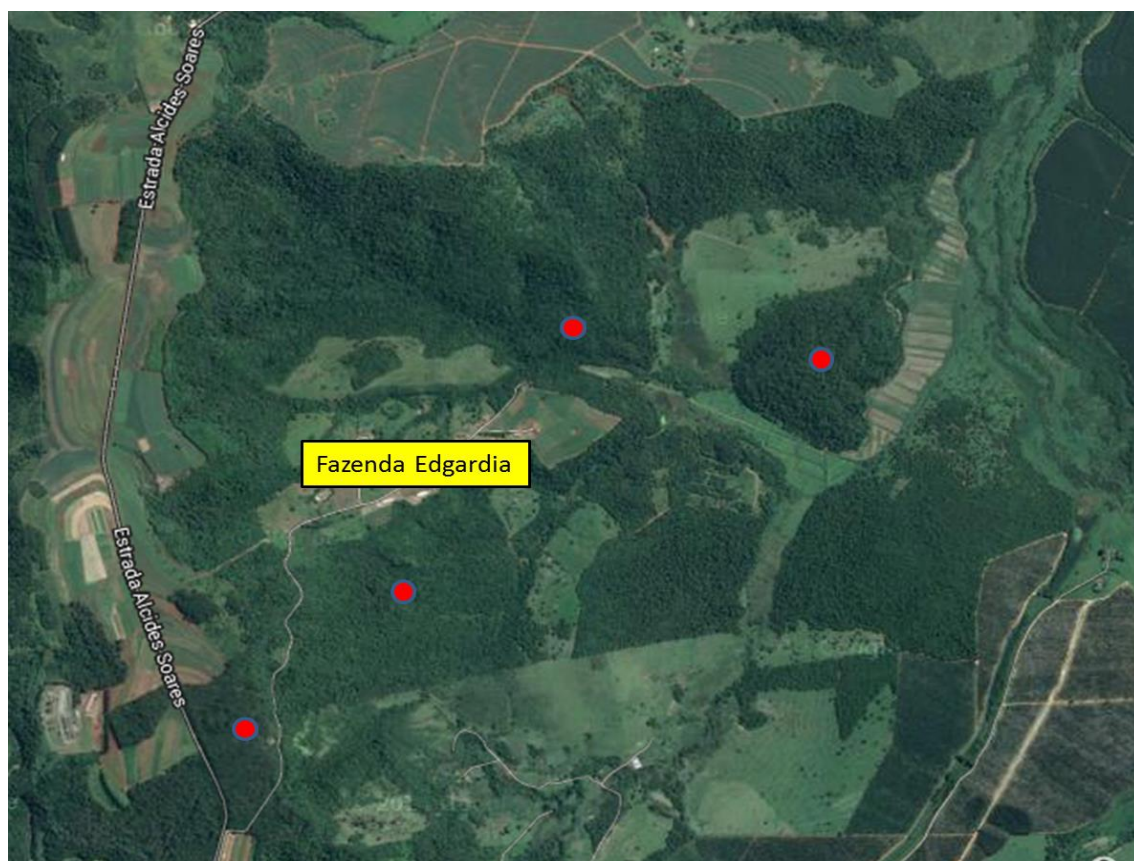


Figura 3. Mapa da Fazenda Edgardia, Botucatu, SP. Os pontos vermelhos indicam os locais onde foram instaladas armadilhas para a captura de animais silvestres. Fonte: Google Maps.



Figura 4. Mapa do Jardim Botânico da UNESP, Botucatu, SP. O ponto vermelho indica o local onde foram instaladas armadilhas para a captura de animais silvestres. Fonte: Google Maps.

Avaliação da saúde dos animais

Foi realizada uma avaliação do estado de saúde dos animais com o objetivo de investigar a presença de alterações clínicas compatíveis com leptospirose. Para tanto, foram realizados exames laboratoriais específicos (os quais são descritos em detalhe nos tópicos seguintes); e exame físico, o qual foi realizado imediatamente após a anestesia. O exame físico foi direcionado aos principais sinais clínicos observados na leptospirose em animais domésticos: icterícia, febre, hemorragias em mucosa e baixo escore corporal (GREENE et al., 2006). Os dados obtidos do exame físico e dos exames laboratoriais complementares foram comparados com os resultados do diagnóstico de leptospirose por meio de testes estatísticos, os quais são descritos em maiores detalhes nos tópicos seguintes.

Colheita e preparo das amostras

Amostras de sangue e de urina foram colhidas de cada animal. Para a colheita de sangue, foi realizada a punção de vasos periféricos, enquanto que a urina foi colhida ou por cistocentese, ou por sondagem uretral ou por micção natural. As amostras de sangue de cada animal foram divididas em duas alíquotas: uma para hemograma e outra para a obtenção de soro. As amostras de urina foram armazenadas na própria seringa utilizada para a colheita.

Após o transporte do material para a FMVZ – UNESP – Botucatu, uma das amostras de sangue foi imediatamente encaminhada ao Serviço de Laboratório Clínico Veterinário, do Departamento de Clínica Veterinária, para a realização do hemograma. O restante do material foi encaminhado ao Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. A segunda amostra de sangue foi centrifugada e o soro obtido armazenado em freezer a -80°C para posterior análise. As amostras de urina foram lavadas em solução salina tamponada (SST) estéril, pH 7,6, previamente ao congelamento, com o objetivo de remover proteínas e íons que pudessem interferir na reação de qPCR. Para tanto, cada amostra de urina foi centrifugada a 12.851rcf, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado em SST utilizando-se um agitador automático do tipo vórtex (IKA®) por aproximadamente 10s. O procedimento foi repetido mais uma vez e o *pellet* ressuspendido em uma solução final de 1ml de SST, obtendo-se assim uma alta concentração celular na urina, a qual foi armazenada a -80°C para posterior análise.

Exames complementares

Os exames complementares ao exame físico dos animais realizados foram hemograma e dosagem de enzimas hepáticas/renais. O hemograma foi realizado utilizando o equipamento pocH-100ivTM Diff (Roche®), conforme as instruções do fabricante, no qual foram mensurados hemácias, hemoglobina e leucócitos totais. O diferencial leucocitário foi feito por esfregaço sanguíneo utilizando o corante Wright. A leitura de hematócrito foi realizada em capilar pelo método do microhematócrito, enquanto que a determinação das proteínas plasmáticas totais foi realizada por refratometria.

A avaliação do perfil hepático e renal foi realizada pela dosagem sérica dos seguintes componentes do sangue: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamyl-transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubinas, proteínas totais séricas, albumina, uréia, creatinina e creatino quinase (CK, para a validação da AST). Todas as mensurações foram realizadas no espectrofotômetro COBAS Mira Plus (Roche®), segundo o protocolo de análise nos kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante.

Exame sorológico

As amostras de soro foram testadas para anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995). Foi utilizada uma bateria de antígenos vivos, mantidos e repicados semanalmente em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (DIFCO Laboratories®), a 28°C, constituída de 24 sorovares, quatro variantes do sorovar Hardjo e uma cepa local isolada de cão (sorovar Canicola), totalizando 18 sorogrupos (Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Shermani, Andamana e Semarang). Cada amostra foi inicialmente diluída em SST pH 7,6 na proporção 1:100, misturada separadamente com cada um dos 29 antígenos em placas de fundo chato (96 orifícios) e incubadas a 37°C por uma hora. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro (Zeiss®) com aumento de 100x. Foram consideradas positivas amostras que apresentaram 50% ou mais de leptospiros aglutinados. Em seguida, as amostras reagentes foram novamente testadas – conforme anteriormente descrito – somente para o antígeno reagente, em diluições seriadas na razão de dois (1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600) para obter-se o título final. Como controle negativo foi utilizada SST pH 7,6. No caso das amostras que apresentaram reação para mais de um sorovar, foi considerado como reagente somente aquele que apresentou maior título.

Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Previamente à reação de qPCR, as amostras de urina foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®). O protocolo foi realizado segundo as instruções do fabricante e o material obtido foi armazenado a -20°C por até 10 dias. Em seguida foi realizada a PCR em tempo real (qPCR – *quantitative PCR*) para a detecção do DNA genômico específico para o gênero *Leptospira*. A análise foi desenvolvida utilizando-se o equipamento StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems®) e o sistema SYBR®Green para detecção de fluorescência. Os *primers* empregados foram o Lep1 e Lep2 (MERIEN et al., 1992), os quais correspondem a sequência do gene 16S rRNA da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, e que resultam em um produto de 331pb. Como controle positivo foi utilizado o mesmo antígeno empregado na SAM, pertencente ao sorovar Hardjo, enquanto que para o controle negativo foi utilizado a amostra de SST pH 7,6 empregada na etapa de extração de DNA.

O ensaio foi realizado em placas descartáveis (Applied Biosystems®), nas quais foram adicionados em cada orifício 10µl de Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 7,6µl de água MilliQ estéril, 0,2µl de cada *primer* e 2µl da amostra a ser testada, totalizando 20µl por reação. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Em seguida, a placa foi selada, inserida no equipamento e submetida às seguintes condições: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min, e uma etapa final para a curva de dissociação (*melting curve*) de 55min (60°C a 95°C). O sinal de fluorescência foi obtido ao longo dos ciclos de amplificação e analisados pelo *software* do equipamento (StepOne Software v2.1). Foram consideradas positivas amostras cuja curva de dissociação apresentou variação de até um grau *Celsius* em relação ao controle positivo.

Análise estatística

Frequências absolutas e relativas das diferentes variáveis foram calculadas. Os intervalos de confiança 95% foram calculados para medidas de prevalência como estimativas de precisão dos valores obtidos sempre que possível. No caso de número amostral reduzido ou valores das estimativas

próximos dos extremos, o cálculo foi baseado na distribuição binomial para evitar intervalos menores do que 0 ou maiores do que 1 (DOHOO et al., 2009). Nos demais casos, os intervalos foram calculados considerando-se probabilidades aproximadas da distribuição normal.

Aplicou-se o teste do Qui-quadrado com o objetivo de estudar possíveis associações entre o local de origem dos animais (área urbana x mata ou Fazenda Lageado/Edgardia x Jardim Botânico) e o resultado (positivo x negativo) para qualquer uma das técnicas (SAM ou qPCR). Esta análise foi realizada somente entre indivíduos da mesma espécie, evitando-se a análise entre exemplares de diferentes espécies. Assim, foi possível constituir grupos homogêneos e livres de interferências intrínsecas à variável “espécie” – considerada uma possível fonte de viés. Também foram excluídas da análise espécies com poucos indivíduos amostrados e/ou com tendência para somente um tipo de local de origem, com o objetivo de aumentar a validade da análise. O resultado obtido na SAM e/ou qPCR foi utilizado como variável dependente, enquanto que o local de origem como variável independente. Em casos de significância estatística ($P < 0,05$), valores de *odds ratio* e seus limites de confiança para o intervalo de 95% foram calculados para designar o tamanho do efeito observado. As análises foram conduzidas no software R (CRAWLEY, 2013).

Foi realizada a associação de possíveis alterações clínicas com a infecção por *Leptospira* spp., buscando avaliar o impacto da doença na saúde nos animais estudados. Para esta análise foram utilizados somente os animais com resultado positivo na qPCR e/ou com títulos iguais ou maiores que 800 na SAM. Estes critérios foram adotados porque são indicativos de infecção recente e ativa (LEVETT, 2001). Animais com títulos inferiores a 800 não foram incluídos nesta análise, pois podem indicar tanto infecção passada como recente (mas em evolução) e, diante da incerteza, optou-se pela sua exclusão.

Alterações clínicas compatíveis com leptospirose foram consideradas quando pelo menos um dos seguintes parâmetros foi observado: presença de um ou mais sinais clínicos durante o exame físico; leucocitose com neutrofilia no hemograma; e aumento de duas ou mais enzimas hepáticas e/ou renais no exame bioquímico. Foi aplicado o Teste Exato de Fisher para comparar a

proporção de alterações clínicas em animais com resultado positivo e negativo para leptospirose, segundo os critérios mencionados acima. Este teste foi selecionado devido à pequena amostragem dos animais incluídos nesta análise (n=25, conforme descrito em “Resultados”), pois permite uma menor margem de erro em relação ao Teste do Qui-quadrado. Os dados foram analisados no programa STATA versão 13.0 (STATACORP, 2013). O nível de significância estatística foi de 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

Animais

No total foram amostrados 309 animais, distribuídos em 16 espécies: gambá de orelha branca (*Didelphis albiventris*, n=195), quati (*Nasua nasua*, n=56), ouriço cacheiro (*Sphiggurus villosus*, n=13), tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, n=6), furão (*Galictis cuja*, n=6), tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*, n=5), veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*, n=5), tatu galinha (*Dasypus novencinctus*, n=4), raposa (*Lycalopex vetulus*, n=4), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*, n=4), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, n=3), onça parda (*Puma concolor*, n=2), macaco prego (*Sapajus nigritus*, n=2), lebre europeia (*Lepus europaeus*, n=2), mão pelada (*Procyon cancrivorus*, n=1) e irara (*Eira barbara*, n=1).

Exame sorológico

Na SAM foram positivos 50 animais, correspondendo a uma prevalência de 16,1% (95% IC: 12,0 – 20,2). As espécies que apresentaram maior positividade foram: furão (83,3%; 95% IC: 35,8 – 99,5), cachorro do mato (75%; 95% IC: 19 – 99), lobo guará (66,6%; 95% IC: 9 – 99) e raposa (50%; 95% IC: 6 – 93). Também apresentaram alta positividade irara (100%) e mão pelada (100%), mas como somente um exemplar de cada espécie foi amostrado, estes resultados possuem baixa validade. Os sorogrupos reagentes foram: Semaranga (n=18), Djasiman (n=9), Australis (n=7), Sejroe (n=5), Icterohaemorrhagiae (n=5), Grippotyphosa (n=3), Canicola (n=3), Autumnalis (n=3), Shermani (n=2) e Panama (n=1), conforme indica a tabela 1. Quatro animais foram positivos para mais de um sorogrupo. Os títulos apresentados foram 100 (n=16), 200 (n=21), 400 (n=5), 800 (n=5) e 1600 (n=3). Os demais resultados obtidos na SAM estão sumarizados na tabela 2.

Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Foram positivos na qPCR 17 animais, correspondendo a uma prevalência de 5,5% (95% IC: 2,9 – 8,0). Cada uma das amostras positivas apresentou curva de amplificação e de dissociação nos três ensaios. As espécies que

apresentaram positividade foram: gambá de orelha branca (3,5%; 95% IC: 0,9 – 6,2), macaco prego (100%; 95% IC: não calculado), ouriço cacheiro (15,3%; 95% IC: 1,9 – 45,4), quati (8,9%; 95% IC: 1,4 – 16,4) e tatu galinha (25%; 95% IC: 0,6 – 80,5). Os resultados estão sumarizados na tabela 1.

Associação da SAM e qPCR

Ao considerar as duas técnicas de diagnóstico como complementares, 64 animais foram positivos, correspondendo a uma prevalência total de 20,7% (95% IC: 16,1 – 25,2). Dessa forma, as prevalências de indivíduos positivos para cada espécie foram semelhantes às obtidas considerando-se somente a SAM, conforme indica a tabela 1. Entre os 64 animais positivos por pelo menos uma das técnicas de diagnóstico, somente três foram positivos tanto pela SAM como pela qPCR.

Avaliação clínica dos animais

Segundo os critérios definidos no presente estudo, 25 animais de 9 espécies apresentavam infecção recente e ativa no momento da amostragem: gambá de orelha branca (n=7), quati (n=7), cachorro do mato (n=3), macaco prego (n=2), ouriço cacheiro (n=2), tamanduá mirim (n=1), tatu galinha (n=1), lobo guará (n=1) e guaxinim (n=1). Foram observadas alterações clínicas em quatro animais: aumento dos níveis de bilirrubina (1,73 mg/dl) e AST (978 U/l) em um gambá, baixo escore corporal em um tamanduá mirim, aumento dos níveis de ALT (53 U/l) e AST (237 U/l) em um macaco prego e leucocitose com neutrofilia (30.000 neutrófilos/ μ l) em um lobo guará. Para a análise estatística, 24 animais negativos tanto na qPCR como pela SAM foram utilizados como grupo controle negativo. Estes foram selecionados de forma aleatória, porém resguardando similaridades com o grupo de animais positivos em relação ao número de exemplares de cada espécie: gambá de orelha branca (n=9), quati (n=9), ouriço cacheiro (n=2), cachorro do mato (n=1), tamanduá mirim (n=1), lobo guará (n=1) e tatu galinha (n=1). Entre estes animais, três apresentaram alterações clínicas compatíveis com leptospirose: leucocitose com neutrofilia em um gambá de orelha branca e em um quati (18.500 e 25.800 leucócitos/ μ l, respectivamente), e um cachorro do mato apresentou baixos níveis de proteína

total (1,7 g/dl) e albumina (1 g/dl), e altos níveis de ALT (129 U/l). Não foi observada uma diferença estatística significativa entre os grupos positivos e negativos para o diagnóstico de leptospirose ($P=0,99$).

Análise estatística

Foi analisada a associação entre a positividade para diagnóstico de leptospirose e a origem dos animais. Foram utilizadas somente as espécies gambá e quati, devido à maior representatividade de exemplares amostrados. No caso dos gambás, foi observada uma maior prevalência nos indivíduos provenientes da mata em relação aos da área urbana, com uma razão de chances de 3,87 (conforme indica a tabela 3). Em relação aos quatis, embora todos os animais amostrados fossem provenientes da mata (e nenhum da área urbana), o mesmo tipo de análise foi realizada adotando-se como critério de classificação as localidades onde não havia sobreposição de território ocupado pelos animais, ou seja, não seria possível que qualquer um dos quatis frequentasse ambos os locais que foram comparados. Dessa forma, foi analisado se havia diferença na prevalência de infecção em quatis de regiões distintas, mas com características ambientais semelhantes. Assim, os locais de origem para esta análise foram classificados em (1) Jardim Botânico e (2) Fazenda Lageado/Edgardia, localizados a uma distância aproximada de 7 km e separados pela área urbana de Botucatu. Não foi observada diferença significativa na positividade entre os diferentes locais de origem dos quatis ($P=0,88$), conforme indica a tabela 4.

TABELA 1. Frequência absoluta, relativa (%) e prevalência de animais silvestres positivos para o diagnóstico de leptospirose na região de Botucatu, SP.

ESPÉCIE	N	SAM (%)	LI95%-LS95%	qPCR (%)	LI95%-LS95%	SAM + qPCR (%)	LI95%-LS95%
Cachorro do mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	4	3 (75,0)	0,19-0,99	0 (0,0)	-	3 (75,0)	0,19-0,99
Furão (<i>Galictis cuja</i>)	6	5 (83,3)	0,35-0,99	0 (0,0)	-	5 (83,3)	0,35-0,99
Gambá de orelha branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	195	16 (8,2)	0,04-0,12	7 (3,5)	0,00-0,06	22 (11,2)	0,06-0,15
Irara (<i>Eira barbara</i>)	1	1 (100,0)	-	0 (0,0)	-	1 (100,0)	-
Lebre (<i>Lepus europaeus</i>)	2	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-
Lobo guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	3	2 (66,6)	0,09-0,99	0 (0,0)	-	2 (66,6)	0,09-0,99
Macaco prego (<i>Sapajus nigritus</i>)	2	0 (0,0)	-	2 (100,0)	-	2 (100,0)	-
Mão pelada (<i>Procyon cancrivorus</i>)	1	1 (100,0)	-	0 (0,0)	-	1 (100,0)	-
Onça parda (<i>Puma concolor</i>)	2	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-
Ouriço cacheiro (<i>Sphiggurus villosus</i>)	13	0 (0,0)	-	2 (15,3)	0,01-0,45	2 (15,3)	0,01-0,45
Quati (<i>Nasua nasua</i>)	56	17 (30,3)	0,18-0,42	5 (8,9)	0,01-0,16	21 (37,5)	0,24-0,50
Raposa (<i>Lycalopex vetulus</i>)	4	2 (50,0)	0,06-0,93	0 (0,0)	-	2 (50,0)	0,06-0,93
Tamanduá bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	6	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-
Tamanduá mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	5	1 (20,0)	0,00-0,71	0 (0,0)	-	1 (20,0)	0,00-0,71
Tatu galinha (<i>Dasypus novencinctus</i>)	4	1 (25,0)	0,00-0,80	1 (25,0)	0,00-0,80	1 (25,0)	0,00-0,80
Veado catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>)	5	1 (20,0)	0,00-0,71	0 (0,0)	-	1 (20,0)	0,00-0,71
TOTAL	309	50 (16,1)	0,12-0,20	17 (5,5)	0,02-0,08	64 (20,7)	0,16-0,25

N: número de animais amostrados de cada espécie

SAM: Soroaglutinação Microscópica

qPCR: PCR em tempo real

LS95%: limite superior

LI95%: limite inferior

*intervalo de confiança de 95%

TABELA 2. Frequência absoluta de animais silvestres reagentes para diferentes sorogrupos de *Leptospira* spp. pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) na região de Botucatu, SP.

ESPÉCIE	SOROGRUPO
Cachorro do mato	Australis (n=2), Djasiman (n=1)
Furão	Shermani (n=2), Semarang (n=2), Djasiman (n=1), Australis (n=1), Canicola (n=1)
Gambá	Semarang (n=14), Autumnalis (n=1), Canicola/Icterohaemorrhagiae (n=1) Grippotyphosa (n=1),
Irara	Djasiman (n=1)
Lebre	-
Lobo guará	Canicola (n=1), Djasiman (n=1)
Macaco prego	-
Mão pelada	Icterohaemorrhagiae (n=1)
Onça	-
Ouriço cacheiro	-
Quati	Australis (n=4), Sejroe (n=4), Icterohaemorrhagiae (n=3), Djasiman (n=2), Grippotyphosa (n=2), Autumnalis (n=2), Panama (n=1), Semarang (n=1)
Raposa	Djasiman (n=2)
Tamanduá bandeira	-
Tamanduá mirim	Sejroe (n=1)
Tatu galinha	Djasiman (n=1)
Veado catingueiro	Semarang (n=1)
TOTAL	Semarang (n=18), Djasiman (n=9), Australis (n=7), Sejroe (n=5), Icterohaemorrhagiae (n=5), Grippotyphosa (n=3), Canicola (n=3), Autumnalis (n=3), Shermani (n=2), Panama (n=1)

*n: número de animais positivos

TABELA 3. Frequência absoluta e relativa (%) de gambás positivos para o diagnóstico de leptospirose na região de Botucatu, SP, de acordo com o local de origem.

Resultado	Urbano (%)	Mata (%)	X^2	P	OR	LS95%	LI95%
Positivo	9 (6,7)	13 (21,7)	9,338	0,002	3,87	1,553	9,654
Negativo	126 (93,3)	47 (78,3)					

X^2 : Valor do Teste de Qui-quadrado

P : significância exata em P (*two-tailed*)

OR: Razão das chances (*Odds Ratio*)

LS95%: limite superior

LI95%: limite inferior

*intervalo de confiança de 95%

**grau de liberdade=1

TABELA 4. Frequência absoluta e relativa (%) de quatis positivos para o diagnóstico de leptospirose na região de Botucatu, SP, de acordo com o local de origem.

Resultado	L/E (%)	JB (%)	X^2	P	OR	LS95%	LI95%
Positivo	14 (36,8)	7 (38,8)	0,022	0,883	-	-	-
Negativo	24 (63,2)	11 (61,2)					

L/E: Fazenda Lageado e Fazenda Edgardia

JB: Jardim Botânico

X^2 : Valor do Teste de Qui-quadrado

P : significância exata em P (*two-tailed*)

OR: Razão das chances (*Odds Ratio*)

LS95%: limite superior

LI95%: limite inferior

*intervalo de confiança de 95%

**grau de liberdade=1

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Foi observada uma grande diversidade de animais silvestres infectados por *Leptospira* spp. na região de Botucatu, SP, corroborando com estudos previamente realizados no Brasil, tanto em espécies domésticas como silvestres. O presente estudo destacou-se principalmente pela utilização de técnicas moleculares, que permitem não somente indicar a infecção por leptospiros (assim como a sorologia), mas também indicar o potencial dos animais como fontes de infecção. Embora somente fragmentos específicos de DNA sejam detectados pela qPCR, a presença do respectivo micro-organismo na amostra é muito provável.

Vários sorogrupos foram detectados como responsáveis pela infecção, demonstrando a diversidade de leptospiros na região estudada, bem como múltiplos ciclos epidemiológicos da enfermidade. Foi observada uma maior positividade do sorogrupo Semaranga em gambás, revelando uma alta prevalência da infecção para este sorogrupo, o qual é considerado saprófita (LEVETT, 2001). Porém, no caso particular do sorogrupo Semaranga, reações cruzadas com outros sorogrupos patogênicos podem ocorrer com frequência (MAUERMANN et al., 1993), contestando a verdadeira identidade das leptospiros responsáveis pela evidência sorológica. Outros estudos devem ser realizados para elucidar a causa da alta positividade do sorogrupo Semaranga nos gambás, visto que outras espécies foram capturadas nos mesmos locais e apresentaram resultados distintos.

Ademais, observou-se que gambás localizados na mata apresentaram maiores chances de se infectar em relação aos gambás provenientes da área urbana, havendo uma alta prevalência do sorogrupo Semaranga nos animais das duas procedências. É muito provável que os gambás, independente da origem, compartilham o mesmo ciclo epidemiológico, porém, apresentam diferentes prevalências de infecção de acordo com o ambiente que habitam. Diversos fatores podem estar envolvidos nesta hipótese, contudo, o contato com o solo parece um aspecto importante a ser questionado, considerando a natureza saprófita deste sorogrupo. Na mata há uma maior quantidade de matéria orgânica no solo do que nas áreas urbanas e, dessa forma, as chances

dos gambás se infectarem neste ambiente são maiores. Estes resultados são muito semelhantes aos encontrados por Faria et al. (2008) em Salvador, Bahia, onde sete gambás (*Didelphis* spp.) capturados na área urbana foram analisados, e cinco apresentaram positividade para o sorogrupo Semaranga.

A baixa prevalência observada no presente estudo também corrobora com os dados publicados por Ullmann et al. (2012b), que não identificaram gambás (*Didelphis* spp.) soropositivos entre os 17 exemplares analisados na cidade de Sorocaba, SP. Os resultados obtidos contradizem uma das principais hipóteses inicialmente elaboradas no início do estudo, na qual os gambás provenientes da área urbana apresentariam elevada soroprevalência, principalmente para o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Tal suposição se deve à frequência com que a leptospirose ocorre nas áreas urbanas, onde os roedores sinantrópicos são os maiores reservatórios de leptospiros, principalmente do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Como os gambás ocupam o mesmo nicho ecológico que os roedores neste tipo de ambiente, seria muito provável a existência de um elo de transmissão entre estas espécies. Os resultados indicam que os gambás não representam um importante reservatório de leptospiros patogênicos na região de Botucatu, o que contradiz a crença popular de que os gambás são grandes transmissores de zoonoses, assim como os roedores.

Em relação aos quatis, não foi observada diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados, resultado este esperado diante da semelhança das características ambientais compartilhadas entre os grupos. Ao contrário do que foi observado nos gambás, não existe a predominância de um determinado sorogrupo infectando esta espécie. Um dos poucos estudos com quatis que permitem a comparação com os resultados aqui apresentados foi realizado por Junior et al. (2003) no estado de Tocantins. Entre os 31 animais estudados, 12,9% foram soropositivos para o sorogrupo Javanica. Considerando a prevalência observada de quatis positivos (30,3%), a proporção de indivíduos positivos pela qPCR (8,9%) e a diversidade de sorogrupos reagentes na SAM, é muito provável que esta espécie seja uma importante fonte de infecção.

Foram amostradas três espécies da família Canidae (cachorro do mato, raposa e lobo guará), nas quais se observou uma alta prevalência pela SAM. Ao agrupar os indivíduos das três espécies supracitadas, obteve-se uma prevalência total de 63,3% (7/11). Apesar do baixo número de canídeos estudados, estes resultados não devem ser subestimados, pois nenhum viés foi identificado no processo de amostragem – todos os 11 animais eram provenientes de regiões distintas e foram capturados em intervalos regulares ao longo do período do estudo.

Poucos trabalhos envolvendo canídeos silvestres foram realizados, demonstrando basicamente a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. para diversos sorogrupos (DEEM e EMMONS, 2005; JORGE et al., 2011; SCIALFA et al., 2013). Um importante estudo foi publicado por Jorge et al. (2011), no qual foi analisada uma quantidade expressiva de animais na região do Pantanal, também se obtendo prevalências elevadas para vários sorogrupos. No presente estudo, embora os canídeos avaliados tenham exibido alta prevalência de animais positivos na SAM, nenhum foi positivo pela qPCR. Esse fato poderia ser explicado pelo pequeno número de animais amostrados, pela eliminação intermitente das leptospiros pela urina ou ainda pela baixa eficiência destas espécies como reservatórios. Capturar canídeos silvestres de vida livre envolve muitas dificuldades de ordem prática, o que dificulta a obtenção de muitas amostras. Novos trabalhos devem ser realizados com um número mais significativo de exemplares desta família a fim de complementar os resultados aqui apresentados, confirmando assim a alta positividade de canídeos silvestres em relação a outras espécies, bem como a grande diversidade de sorogrupos responsáveis pela infecção.

Quanto aos furões e iraras, espécies incluídas na família Mustelidae, é possível extrapolar os mesmos aspectos discutidos sobre os canídeos, onde foi observada uma alta prevalência na SAM e ausência de positivos pela qPCR em um número reduzido de indivíduos amostrados. Na literatura, os dados sobre leptospirose em furões e iraras são praticamente inexistentes, embora sejam espécies abundantes e de ampla distribuição geográfica no Brasil.

Somente três animais apresentaram resultado positivo tanto pela SAM como pela qPCR, indicando uma baixa concordância entre os testes de

diagnóstico. Outros estudos mostram resultados similares (FORNAZARI et al., 2012; HAMOND et al., 2014), o que pode ser justificado pelos diferentes propósitos de cada técnica. Animais apresentando anticorpos anti-*Leptospira* spp. não necessariamente possuem o agente em seu organismo e, assim, o resultado da qPCR será negativo. Ainda, caso o animal seja soropositivo e portador renal, a eliminação de leptospiras pela urina é intermitente, dificultando assim a probabilidade de detecção do DNA na amostra.

Outro fator associado à baixa concordância dos testes de diagnóstico é o sorovar da leptospira responsável pela infecção. Caso este sorovar não tenha sido incluído na bateria de antígenos empregados na SAM, o resultado será negativo. Apesar desta limitação, a SAM ainda é considerada o diagnóstico sorológico de eleição para leptospirose (LEVETT, 2001; ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010) e, no presente trabalho, foi utilizada uma grande diversidade de sorovares – superior a muitos estudos publicados na literatura.

Em relação à qPCR, esta técnica tem sido empregada com frequência para o diagnóstico de leptospirose, apresentando alta sensibilidade e especificidade (AHMED et al., 2009; WU et al., 2014). Embora a qPCR seja recomendada para a amplificação de produtos de até 150pb, em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório foi constatada uma boa eficiência desta técnica para produtos de 331pb, apresentando sensibilidade diagnóstica maior que a PCR convencional quando utilizados os mesmos *primers* e amostras (FORNAZARI et al., 2012).

No presente estudo, foram observadas alterações clínicas compatíveis com leptospirose, mas não foi possível determinar sua causa. É possível que estas alterações estivessem associadas à infecção por *Leptospira* spp. mas, diante da inespecificidade dos sinais clínicos desta doença, não tenha sido possível comprovar esta correlação devido as alterações observadas no grupo controle negativo. Por outro lado, é provável que a infecção por leptospiras não tenha causado as alterações observadas, pois animais silvestres de vida livre possuem diversas enfermidades de natureza infecciosa e parasitária, as quais podem estar associadas aos achados clínicos observados. Esta observação também justificaria as alterações clínicas observadas no grupo controle. A infecção assintomática é muito comum nos animais domésticos e no homem

(LEVETT, 2001), e é possível que o mesmo desfecho ocorra nas espécies silvestres analisadas. Outro importante fator responsável pela dificuldade em se observar sinais clínicos em animais de vida livre – independente do agente etiológico – é a seleção natural. Animais doentes têm dificuldade em obter alimento, escapar de predadores e procurar abrigo. Como consequência, o quadro clínico rapidamente resulta em óbito, impossibilitando a amostragem do animal. Pelos resultados obtidos, a leptospirose possui baixa morbidade nos animais silvestres da região de Botucatu.

Uma importante ferramenta que poderia complementar os resultados aqui apresentados é a caracterização genética das leptospiros a nível de espécie. Nos últimos anos, foram desenvolvidas várias técnicas com esse objetivo. Victoria et al. (2008) identificaram uma região de 245pb altamente conservada no genoma das leptospiros e que permite esta classificação. Após o sequenciamento dos pares de bases desta região, estas são analisadas por meio de técnicas de bioinformática, permitindo assim classificar as leptospiros em nível de espécie. Outros estudos têm utilizado esta região com sucesso (DIETRICH et al., 2014). Esta ferramenta poderia indicar diferentes ciclos epidemiológicos da leptospirose nos animais silvestres estudados, complementando assim as análises baseadas a nível de sorogrupo. As 17 amostras obtidas no presente estudo estão sendo submetidas a este tipo de análise, entretanto, ainda não foi concluída.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Os animais estudados apresentaram soroprevalência de 16,1% (50/309) para diversos sorogrupos, havendo uma maior positividade para o sorogrupo Semaranga;
- A presença do DNA de leptospiros na urina indica a eliminação do agente no ambiente e, conseqüentemente, o papel dos animais silvestres como reservatórios;
- Não foi observada associação entre a infecção por *Leptospira* spp. e a presença de sinais clínicos compatíveis com leptospirose;
- Há uma grande diversidade de espécies de mamíferos infectados por *Leptospira* spp. na região de Botucatu, SP;
- Existem diferenças significativas na prevalência de infecção entre espécies, havendo maior positividade em indivíduos das famílias Canidae e Mustelidae;
- Os gambás apresentaram alta prevalência de infecção por leptospiros saprófitas;
- Fatores ambientais estão envolvidos na maior prevalência da infecção em gambás provenientes da mata em relação aos localizados em áreas urbanas.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; De La PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, v.140, n.(3-4), p.287-296, 2010.

AHMED, A.; ENGELBERTS, M.F.M.; BOER, K.R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R.A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE*, v.4, n.9, p.e7093, 2009.

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

CANN, K.F.; THOMAS, D.R.; SALMON, R.L.; WYN-JONES, A.P.; KAY, D. Extreme water-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol. Infect.*, v.141, p.671-686, 2013.

CLEAVELAND, S.; MLENGEYA, T.; KAARE, M.; HAYDON, D.; LEMBO, T.; LAURENSEN, M.K.; PACKER, C. The Conservation Relevance of Epidemiological Research into Carnivore Viral Diseases in the Serengeti. *Conserv. Biol.*, v.21, n.3, p.612-622, 2007.

COLEGROVE, K.M.; LOWENSTINE, L.J.; GULLAND, F.M.D. Leptospirosis in Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) Stranded along the California Coast. *J. Wildl. Dis.*, v.41, n.2, p.426-430, 2005.

CORRÊA, S.H.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A.A.; DIAS, R.A.; BARROS, M.A.; GUIMARÃES, V.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.41, n.3, p.189-193, 2004.

CRAWLEY, M.J. *The R book*. Chichester, UK: Wiley, 2013. 1076p.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de Animais Selvagens*. 1ª ed. São Paulo: ROCA, 2007. 1040p.

DEEM, S.L.; EMMONS, L.H. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noël Kempff Mercado National Park, Bolivia. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.36, n.2, p.192-197, 2005.

DEFILIPPO, F.; LUPPI, A.; MAIOLI, G.; MARZI, D.; FONTANA, M.C.; PAOLI, F.; BONILAUDI, P.; DOTTORI, M.; MERIALDI, G. Outbreak of Type C Botulism in Birds and Mammals in the Emilia Romagna Region, Northern Italy. *J. Wildl. Dis.*, v.49, n.4, p.1042-1046, 2013.

DELANEY, M.A.; COLEGROVE, K.M.; SPRAKER, T.R.; ZUERNER, R.L.; GALLOWAY, R.L.; GULLAND, F.M. Isolation of *Leptospira* from a phocid: acute renal failure and mortality from leptospirosis in rehabilitated Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*), California, USA. *J. Wild. Dis.*, v.50, n.3, p.621-627, 2014.

DIETRICH, M.; WILKINSON, D.A.; SOARIMALALA, V.; GOODMAN, S.M.; DELLAGI, K.; TORTOSA, P. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Molec. Ecol.*, v.23, p.2783-2796, 2014.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary epidemiologic research*. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada: VER Inc., 2009. 865p.

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

FARIA, M.T.; CALDERWOOD, M.S.; ATHANAZIO, D.A.; McBRIDE, A.J.A.; HARTSKEERL, R.A.; PEREIRA, M.M.; KO, A.I.; REIS, M.G. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.*, v.108, p.1-5, 2008.

FORNAZARI, F.; Da SILVA, R.C.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; BESERRA, H.E.O.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LANGONI, H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J. Microbiol. Methods*, v.90, n.3, p.312-316, 2012.

GAMAGE, C.D.; KOIZUMI, N.; PERERA, A.K.; MUTO, M.; NWAFOR-OKOLI, C.; RANASINGHE, S.; KULARATNE, S.A.; RAJAPAKSE, R.P.; KANDA, K.; LEE, R.B.; OBAYASHI, Y.; OHNISHI, M.; TAMASHIRO, H. Carrier status of leptospirosis among cattle in Sri Lanka: a zoonotic threat to public health. *Transbound. Emerg. Dis.*, v.61, n.1, p.91-96, 2014.

GEBREYES, W.A.; DUPOUY-CAMETZ, J.; NEWPORT, M.J.; OLIVEIRA, C.J.B.; SCHLESINGERS, L.S.; SAIF, Y.M.; KARIUKI, S.; SAIF, L.J.; SAVILLE, W.; WITTUM, T.; HOET, A.; QUESSYS, S.; KAZWALAS, R.; TEKOLA, B.; SHRYOCK, T.; BISESI, M.; PATCHANEE, P.; BOONMAR, S.; KING, L.J. The Global One Health Paradigm: Challenges and Opportunities for Tackling Infectious Diseases at the Human, Animal, and Environment Interface in Low-Resource Settings. *Plos Negl. Trop. Dis.*, v.8, n.11, 2014.

GREENE, C.E.; SYKES, J.E.; BROWN, C.A.; HARTMANN, K. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2006. Chap. 44, p.402-417.

GUERRA, M.A. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals*, v.41, n.5, p.295-297, 2013.

GULLAND, F.M.D.; KOSKI, M.; LOWENSTINE, L.J.; COLAGROSS, A.; MORGAN, L.; SPRAKER, T. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981 -1994. *J. Wildl. Dis.*, v.32, n.4, p.572-580, 1996.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A.P.; PESTANA, C.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet. Res. Commun.*, v.38, n.1, p.81-85, 2014.

JANCLOES, M.; BERTHERAT, E.; SCHNEIDER, C.; BELMAIN, S.; MUNOZ-ZANZI, C.; HARTSKEER, R.; COSTA, F.; DENIS, J.; BENSCHOP, J. Towards a “One Health” Strategy against Leptospirosis. *GRF Davos Planet@Risk*, v.22, n.3, p. 204-206, 2014.

JORGE, R.S.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; VASCONCELLOS, S.A.; LIMA, E.S.; MORAIS, Z.M.; SOUZA, G.O. Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp. in the northern Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.106, n.4, p.441-444, 2011.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEARU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.7, n.10, p.737-746, 2009.

LAROCQUE, R.C.; BREIMAN, R.F.; ARI, M.D.; MOREY, R.E.; JANAN, F.A.; HAYES, J.M.; HOSSAIN, M.A.; BROOKS, W.A.; LEVETT, P.N. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg. Infec. Dis.*, v.11, n.5, p.766-769, 2005.

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

LEVETT, P.N. Systematics of *Leptospiraceae*. In: ADLER, B. *Leptospira and Leptospirosis*. Heidelberg: Alemanha, 2015. chap.2, p.11-20.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; MORAES, I.A.; FERREIRA, A.M.; PISSINATTI, A. Leptospiral antibodies in captive lion tamarins (*Leontopithecus* sp) in Brazil. *Vet. J.*, v.169, n.3, p.462-464, 2005.

LLOYD-SMITH, J.O.; GREIG, D.J.; HIETALA, S.; GHNEIM, G.S.; PALMER, L.J.; LEGER, J.S.; GRENFELL, B.T.; GULLAND, F.M.D. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species?. *BMC Infec. Dis.* v.7, n.125, p.1-11, 2007.

MAUERMANN, U.; WIEGAND, D.; MANZ, D. Use of nonpathogenic *Leptospira* strains as diagnostic antigens for detection of *Leptospira* infection in cattle. *Berl. Munch Tierarztl. Wochenschr.*, v.106, n.9, p.296-299, 1993.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.

Ministério da Saúde. Manual de Leptospirose. Brasília, 1995. 98p.

MIRAGLIA, F.; MORENO, A.M.; GOMES, C.R.; PAIXÃO, R.; LIUSON, E.; MORAIS, Z.M.; MAIORKA, P.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; VASCONCELLOS, S.A. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, n.3, p.501-507, 2008.

PIMENTEL, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; MARVULO, M.F.V.; VASCONCELLOS, A.S.; MORAIS, Z.M.; SILVA, J.C.R.; NETO, J.E. Serological survey of toxoplasmosis and leptospirosis in neotropical wild mammals from Aracaju Zoo, Sergipe, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.29, n.12, p.1009-1014, 2009.

PINNA, M.H.; MARTINS, G.; PINHEIRO, A.C.; ALMEIDA, D.S.; ORIÁ A.P.; LILENBAUM, W. Detection of anti-*Leptospira* antibodies in captive nonhuman primates from Salvador, Brazil. *Am. J. Primatol.*, v.74, n.1, p.8-11, 2012.

PRAGER, K.C.; GREIF, D.J.; ALT, D.P.; GALLOWAY, R.L.; HORNSBY, R.L.; PALMER, L.J.; SOPER, J.; WU, Q.; ZUERNER, R.L.; GULLAND, F.M.D.; LLOYD-SMITH, J.O. Asymptomatic and chronic carriage of *Leptospira interrogans* serovar Pomona in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Microbiol.*, v.164, p.177-183, 2013.

PROENÇA, L.M.; SILVA, J.C.; GALERA, P.D.; LION, M.B.; MARINHO-FILHO, J.S.; RAGOZO, A.M.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; VASCONCELLOS, S.A.; SOUZA, G.O.; PINHEIRO JR, J.W.; SANTANA, V.L.; FRANÇA, G.L.; RODRIGUES, F.H. Serologic survey of infectious diseases in populations of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Águas Emendadas Ecological Station Park. *J. Zoo Wild. Med.*, v.44, n.1, p.152-155, 2013.

REN, S.X.; FU, G.; JIANG, X.G.; ZENG, R.; MIAO, Y.G.; XU, H.; ZHANG, Y.X.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.F.; JIANG, H.Q.; JIA, J.; TU, Y.F.; JIANG, J.X.; GU, W.Y.; ZHANG, Y.Q.; CAI, Z.; SHENG, H.H.; YIN, H.F.; ZHANG, Y.; ZHU, G.F.; WAN, M.; HUANG, H.L.; QIAN, Z.; WANG, S.Y.; MA, W.; YAO, Z.J.; SHEN, Y.; QIANG, B.Q.; XIA, Q.C.; GUO, X.K.; DANCHIN, A.; SAINTS GIRONS, I.; SOMERVILLE, R.L.; WEN, Y.M.; SHI, M.H.; CHEN, Z.; XU, J.G.; ZHAO, G.P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, v.422, p.888-893, 2003.

ROELKE-PARKER, M.E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, S.J.; POSPISCHIL, A.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H.; MWAMENGELE, G.L.; MGASA, M.N.; MACHANGE, G.A.; SUMMERS, B.A.; APPEL, M.J. A canine distemper virus

epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, v.379, n.6564, p.441-445, 1996.

SAITO, M.; MIYAHARA, S.; VILLANUERVA, S.Y.; ARAMAKI, N.; IKEJIRI, M.; KOBAYASHI, Y.; GUEVARRA, J.P.; MASUZAWA, T.; GLORIANI, N.G.; YANAGIHARA, Y.; YOSHIDA, S. PCR and culture identification of pathogenic *Leptospira* sp. from coastal soil in Leyte, Philippines, after a storm surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.80, n.22, p.6926-6932, 2014.

SHNEIDER, M.C.; NAJERA, P.; ALDIGHIERI, S.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; GALAN, D.I.; SIMON, K.; ESPINAL, M. Leptospirose preocupa a região das Américas. *Rev. CFMV*, n.62, p.12-17, 2014.

SCIALFA, E.; BRIHUEGA, B.; VENZANO, A.; MORRIS, W.E.; BOLPE, J.; SCHETTINO, M. First isolation of *Leptospira interrogans* from *Lycalopex griseus* (South American gray fox) in Argentina shows new MLVA genotype. *J Wildl Dis.*, v.49, n.1, p.168-172, 2013.

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

SOUZA JÚNIOR, M.F.; LOBATO, Z.I.P.; LOBATO, F.C.F.; MOREIRA, E.C.; OLIVEIRA, R.R.; LEITE, G.G.; FREITAS, T.D.; ASSIS, R.A. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, n.3, p.292-294, 2006.

StataCorp. 2013. *Stata Statistical Software: Release 13*. College Station, TX: StataCorp LP.

SZONYI, B.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; RAMÍREZ, M.; MORENO, N.; KO, A. An outbreak of severe leptospirosis in Capuchin (*Cebus*) monkeys. *Vet. J.*, v.188, n.2, p.237-239, 2011.

ULLMANN, L.S.; HOFFMANN, J.L.; De MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; Dos SANTOS, L.C.; Da SILVA, R.C.; MOREIRA, N.; GUIMARÃES, A.M.; CAMOSSO, L.G.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W. Serologic survey for *Leptospira* spp. in captive neotropical felids in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *J. Zoo. Wildl. Med.*, v.43, n.2, p.223-228, 2012a.

ULLMANN, L.S.; NETO, R.N.D.; TEIXEIRA, R.H.F.; NUNES, A.L.V.; SILVA, R.C.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LANGONI, H. Epidemiology of leptospirosis at Sorocaba Zoo, São Paulo state, Southeastern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.32, n.11, p.1174-1178, 2012b.

VICTORIA, B.; AHMED, A.; ZUERNER, R.L.; AHMED, N.; BULACHS, D.M.; QUINTEIRO, J.; HARTSKEERL, R.A. Conservation of the S10-spc-a Locus within Otherwise Highly Plastic Genomes Provides Phylogenetic Insight into the Genus *Leptospira*. *Plos One*, v.3,n.7, 2008.

WU, Q.; PRAGER, K.C.; GOLDSTEIN, T.; ALT, D.P.; GALLOWAY, R.L.; ZUERNER, R.L.; LLOYD-SMITH, J.O.; SCHWACKE, L. Development of a real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in California sea lions. *Dis. Aquat. Organ.*, v.11,0, n.3, p.165-172, 2014.

ARTIGO
CIENTÍFICO

Artigo científico formatado de acordo com as normas da revista *Journal of Wildlife Diseases* (fator de impacto 1,3 e Qualis CAPES B1) e submetido dia 01/05/2015 (*Manuscript number* 2015-05-111). Neste artigo são apresentados dados parciais da tese, referentes à avaliação clínica dos animais. Os demais dados serão apresentados em outro artigo científico, mais extenso e completo, no qual será incluída a caracterização das leptospiroses (análise que ainda está em andamento).

SHORT COMMUNICATIONS

Title: Health Assessment of Free-Ranging Wild Mammals Infected by *Leptospira* spp. in Brazil

Felipe Fornazari¹ (ff_vet@yahoo.com.br) Corresponding author +55 14 3880-2090 (23)

Pâmela Merlo Marson² (pam.marson@gmail.com)

Carlos Roberto Teixeira³ (teixeiracr@fmvz.unesp.br)

Regina Kiomi Takahira⁴ (takahira@fmvz.unesp.br)

Mariana Serrano Melanchauski⁴ (manysm@hotmail.com)

Marina Mitie de Souza Monobe⁵ (mitie.vets@yahoo.com)

Valdinei Moraes Campanucci da Silva⁶ (neibtu@gmail.com)

Selene Daniela Babboni⁶ (selenebrasil@yahoo.com.br)

Diego Borin Nóbrega⁷ (diegoborin@yahoo.com)

Helio Langoni¹ (hlangoni@fmvz.unesp.br)

¹NUPEZO - Núcleo de Pesquisas em Zoonoses, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., CEP 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Instituto de Biociências, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., CEP 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil

³Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., CEP 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., CEP 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil

⁵Department of Pathobiology and Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, 240 Wise Center Drive, Starkville, Mississippi, USA

⁶Vigilância Ambiental em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Botucatu, Rua Major Matheus 7, CEP 18609-083, Botucatu, São Paulo, Brasil

⁷Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil

Word count: 236

ABSTRACT: Leptospirosis is an important disease of worldwide distribution, responsible for causing severe clinical pictures in humans, domestic and wild animals. Due to the lack of data in wildlife, this study aimed to evaluate the health status of free-ranging wild mammals infected by *Leptospira* spp. in Brazil. Physical examination, hematological, biochemical, serological and qPCR analysis were performed in 309 animal sampled between 2012 and 2014. Those positive in qPCR and/or serology (titer ≥ 800) were selected for health assessment, which resulted in 25 (8.0%) individuals from 9 species (8 by serology and 17 positive by qPCR). Serology was reagent for serogroups Sejroe (n=2), Icterohaemorrhagiae (n=2), Australis (n=2), Djasiman (n=1) and Canicola (n=1). Also, 24 animals negative by both tests were used as negative control, and proportions of the two groups were compared by Fisher's Exact Test. Among the 25 positive animals, four presented clinical disorders compatible with leptospirosis: one white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) had increased levels of bilirubin and AST, one southern tamandua (*Tamandua tetradactyla*) had low body score, one capuchin monkey (*Sapajus nigritus*) had increased levels of AST and ALT and one maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) presented leukocytosis with neutrophilia. There was no positive association between leptospirosis diagnosis and clinical findings ($P=0.99$). Our results suggest that *Leptospira* spp. infection did not cause clinical disorders in the studied animals.

Key words: animal health, *Didelphis albiventris*, leptospirosis, *Nasua nasua*, wildlife disease.

Leptospirosis is a cosmopolitan bacterial disease of great importance. It is caused by spirochetes of *Leptospira* genera, which are able to infect a wide diversity of animal species. Infection occurs mainly by contact with contaminated water or urine of infected animals, and in most cases clinical manifestations are mild or absent. However, in some instances, severe clinical disease may occur, with mortality rates ranging from 5 to 15% (Levett 2001). Overall, leptospirosis is endemic in Brazil, and is frequently associated with epidemic outbreaks (Ko et al. 1999).

Several infectious diseases affect wildlife in nature (Cleaveland et al. 2007; Espie et al. 2009; Megid et al. 2010). Studies assessing the impact of leptospirosis in wildlife are very scarce, although many publications are available regarding the epidemiology of the disease. Despite its low lethality, leptospirosis was reported as an important cause of mortality in both free-ranging and captive wild mammals, especially marine mammals (Cleaveland et al. 2007; Szonyi et al. 2011). In Brazil there is little information about leptospirosis in wildlife, and the few existing studies are limited to the low number of animal species, samples and serologic assays. In the present study we focused on going beyond these limitations, and evaluated a large number of animal species, samples and also performed laboratorial assays directed to diagnosis and clinical assessment. This study presents partial data of a long epidemiological survey that investigated infectious and parasitic diseases in wildlife in Brazil. Here we aimed to evaluate the health status of free-ranging wild mammals presenting current infection by *Leptospira* spp..

The study was realized in Botucatu Municipality (22°53'09" S 48°26'42" W), São Paulo State, Brazil. Between May 2012 and February 2014 animals were sampled by two methods: (1) capture in their natural habitat, using tomahawk traps placed in forest fragments around the city, and (2) following the veterinary assistance of São Paulo State University (Unesp), responsible for the support of wild animals rescued in the region. Only free-ranging mammals were included in the study. License for sampling the animals were provided by ethics committee (CEUA, UNESP, Botucatu nº 10/2012) and government authorities (ICMBio, SISBIO nº 33162-2).

Blood and urine samples were collected, followed by a physical examination focused in symptom typical of leptospirosis: fever, jaundice, mucosal hemorrhage and low body score. Hematological and biochemical analysis were performed by standard methods. Abnormalities and normal parameters of physical examination and laboratory analysis were based on literature published by Levett (2001), Greene et al. (2006) and

Cubas et al. (2014). Serologic and molecular diagnosis of leptospirosis were performed by quantitative PCR (qPCR) and Microscopic Agglutination Test (MAT), respectively. Both techniques were developed as previously described (Fornazari et al. 2012). The criteria to define animals with current infection at moment of sampling was a positive result of qPCR in urine sample, and/or a titer of 800 in MAT (Levett 2001). Individuals included in these criteria were selected and evaluated for the presence of clinical disorders compatible with leptospirosis, which were recorded during health assessment. Also, 24 animals with negative results for MAT and qPCR were used as negative controls. A clinical disorder was considered present when at least one of the evaluated parameters was abnormal – physical examination, hematological analysis and/or biochemical analysis (increase in two or more hepatic/renal enzymes). Relative frequencies of clinical disorders in positive and negative animals for leptospirosis diagnosis were compared using Fisher's Exact Test. Data were analyzed using STATA version 13.0 (StataCorp 2013). Statistical significance was considered at 5% level.

A total of 309 animals were sampled, of which 25 (8.0%) were infected by *Leptospira* spp. according to the criteria mentioned above (17 by qPCR and 8 by MAT). None of the animals were positive by both techniques. MAT was positive for serogroups Icterohaemorrhagiae and Sejroe, with titers 800 (n=1) and 1600 (n=3). The results are summarized in Table 1. Among the 25 positive animals, four presented clinical disorders compatible with leptospirosis: one white-eared opossum had increased levels of bilirubin (1.73 mg/dl) and AST (978 U/L); one southern tamandua had low body score; one capuchin monkey had increased levels of AST (237 U/L) and ALT (53 U/L); and one maned wolf presented leukocytosis with neutrophilia (30,000 leukocytes/ μ l, 29,100 neutrophils). Among the 24 negative animals (see Table 1), three had clinical disorders: one white-eared opossum and one coati presented leukocytosis with neutrophilia (18,514 leukocytes/ μ l, 10,923 neutrophils and 25,800 leukocytes/ μ l, 22,962 neutrophils, respectively); and one crab-eating fox had low levels of total protein (1.7 g/dl), albumin (1.0 g/dl) and elevated ALT (129 U/L). There was no statistically significant correlation between positivity for *Leptospira* spp. infection and clinical disorders ($P=0.99$).

The results indicate that *Leptospira* spp. infection was not responsible for the clinical disorders observed in the studied animals. Although four animals presented clinical findings compatible to leptospirosis, a positive association was not observed

because three animals used as negative controls also presented abnormalities. We were not able to identify the cause of these disorders during the study. Free-ranging animals harbor a great number of microbial agents, and also may develop many other non-infectious diseases, which can be associated with some of the clinical disorders in the studied animals. As it is not possible to perform a complete clinical evaluation, the causes of these clinical findings remain uncertain.

By our knowledge, this is the second health assessment of wild animals infected by *Leptospira* spp. in Brazil. Medici et al. (2014) evaluated 65 free-ranging lowland tapirs (*Tapirus terrestris*) using a methodology similar to ours. These authors also did not found clinical signs or laboratory findings indicating leptospirosis. Most cases of *Leptospira* spp. infection in domestic animals and humans do not result in severe clinical disease (Levett 2001). Probably the same outcome occurs in wild species, which could explain our results. Besides, if a wild animal develop severe leptospirosis in nature, it will quickly die of hunger, killed by predator, or any other cause that debilitated animals are exposed in the wild. Thus, the probability of sampling sick animals is reduced substantially. This could result in a selection bias, although it is very unlikely that the probability of selection depends on the clinical signs in a different manner for animals with active disease and for controls in this study. Another factor that could explain our results is the infection by non-pathogenic strain of *Leptospira* spp.. Although this is not true for the seropositive animals - which indicated infection by pathogenic serogroups - we must consider that hypothesis for the animals that were positive by qPCR. However, leptospirosis has been considered an important cause of mortality in free-ranging marine mammals since the 1970s, such as California sea lions (*Zalophus californianus*) and Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) (Lloyd-Smith et al. 2007; Delaney et al. 2014). Several outbreaks have been reported in this group of animals, making leptospirosis a relevant issue in programs involving the conservation of these species. Captive animals are also affected by leptospirosis, as documented in colonies of capuchin monkeys (*Sapajus* spp.) and Wied's marmosets (*Callithrix kuhlii*), where typical signs and lesions of the disease were observed, and some cases resulted in death (Baitchman et al. 2006; Szonyi et al. 2011).

In conclusion, leptospirosis is a complex disease and more studies are needed to understand the factors involved in the outcome of *Leptospira* spp. infection in wild animals. Our study showed several wild species presenting current infection by

Leptospira spp. in Brazil. Clinical disorders were present, but not associated with leptospirosis.

We are thankful to the workers and students from Zoonosis Research Nucleus (NUPEZO, UNESP, Botucatu), Center of Wildlife Medicine and Research (CEMPAS, UNESP, Botucatu) and Environmental Health Vigilance Department (VAS, Botucatu city hall, Botucatu) for helping in animal sampling; to the Committee of Ethics on Animal Experimentation (CEUA, UNESP, Botucatu) and Chico Mendes Biodiversity Conservation Institute (ICMBio) for authorizing the study; and to the São Paulo Research Foundation (FAPESP), National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for funding the study and to provide the scholarship of the students involved.

LITERATURE CITED

Baitchman EJ, Calle PP, James SB, Linn MJ, Raphael BL. 2006. Leptospirosis in wiew's marmosets (*Callithrix kuhlii*). *J Zoo Wild Med* 37:182-185.

Cleaveland S, Mlengeya T, Kaare M, Haydon D, Lembo T, Laurenson MK, Packer C. 2007. The conservation relevance of epidemiological research into carnivore viral diseases in the Serengeti. *Conserv Biol* 21:612-622.

Cubas ZS, Silva JC, Catão-Dias JL. 2014. *Tratado de Animais Selvagens*, 2nd Ed. ROCA, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2470 pp.

Delaney MA, Colegrove KM, Spraker TR, Zuerner RL, Galloway RL, Gulland FMD. 2014. Isolation of *Leptospira* from a phocid: acute renal failure and mortality from leptospirosis in rehabilitated northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*), California, USA. *J Wildl Dis* 50:621-627.

Espie IW, Hlokwe TM, Gey van Pittius NC, Lane E, Tordiffe AS, Michel AL, Müller A, Kotze A, van Helden PD. 2009. Pulmonary Infection due to *Mycobacterium bovis* in a black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) in South Africa. *J Wildl Dis* 45:1187-1193.

Fornazari F, Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HEO, Luvizotto MC, Langoni H. 2012. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods* 90:321-326.

Greene CE, Sykes JE, Brown CA, Hartmann K. 2006. Leptospirosis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*, Greene CE, editor. ELSEVIER, St. Louis, Missouri, pp. 402-417.

Ko AI, Galvão Reis M, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD Jr, Riley LW. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354:820-825.

Levett, PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Reviews* 14:296-326.

Lloyd-Smith JO, Greig DJ, Hietala S, Ghneim GS, Palmer L, Leger JS, Grenfell BT, Gulland FMD. 2007. Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species? *BMC Infect Dis* 7:1-11.

Medici EP, Mangini PR, Fernandes-Santos RC. 2014. Health assessment of wild lowland tapir (*Tapirus terrestris*) populations in the atlantic forest and Pantanal biomes, Brazil. *J Wildl Dis* 50:817-828.

Megid J, Teixeira CR, Amorin RL, Cortez A, Heinemann MB, Antunes JMP, Costa LF, Fornazari F, Cipriano JR, Cremasco A, Richtzenhain LJ. 2010. First identification of canine distemper virus in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. *J Wildl Dis* 46:303-305.

StataCorp. 2013. *Stata Statistical Software: Release 13*. College Station, TX: StataCorp LP.

Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI. 2011. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *Vet J* 188:237-239.

Table 1. Free-ranging wild mammals from Brazil with positive result for leptospirosis diagnosis – Microscopic Agglutination Test (MAT) and quantitative PCR (qPCR).

Species	N ^a	Leptospirosis diagnosis		
		qPCR ^b	MAT ^c	Serogroup (titer)
White-eared opossum (<i>Didelphis albiventris</i>)	7	7		
Coati (<i>Nasua nasua</i>)	7	5		Sejroe (1600), Icteroh* (800)
Crab-eating fox (<i>Cerdocyon thous</i>)	3		3	Djasiman (800), Australis (800, n=2)
Capuchin monkey (<i>Sapajus nigritus</i>)	2	2		
Orange-spined hairy dwarf porcupine (<i>Sphiggurus villosus</i>)	2	2		
Maned wolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	1		1	Canicola (800)
Southern tamandua (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	1		1	Sejroe (1600)
Nine-banded armadillo (<i>Dasypus novencinctus</i>)	1	1		
Crab-eating raccoon (<i>Procyon cancrivorus</i>)	1		1	Icteroh* (1600)
Total	25	17	8	

^aTotal number of animals positive for leptospirosis diagnosis (qPCR or MAT)

^bNumber of animals positive only by qPCR

^cNumber of animals positive only by MAT

*Icterohaemorrhagiae

**Animals used as negative controls included 9 white-eared opossums, 9 coatis, two orange-spined hairy dwarf porcupines, one maned wolf, one northern tamandua, one nine-banded armadillo and one crab-eating fox (n=24)

JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES. INFORMATION FOR AUTHORS AND REVIEWERS (Revised August 8, 2013)

Categories of papers published

Short Communications Shorter manuscripts that report completed studies that are narrower in scope than those described in Full-length manuscripts are published as Short Communications. Methodological or descriptive studies that represent significant contributions to the literature may also be considered as Short Communications. These are ≤ 2000 words, including the Literature Cited; not including the title page, abstract, or acknowledgements. The first (title) page should have a Running Head entitled "Short Communications," the full title, the authors' names, affiliations, and complete mailing addresses, and the name, address, phone and fax numbers, and email address of the corresponding author. Provide the word count at the bottom of the title page. The next page should contain: an Abstract (≤ 225 words), 4-8 Key Words (or phrases) in alphabetical order, and then continue right on with the main body of the paper without subheadings, Literature Cited, Tables (each table on a separate page) and Figure Legends. Figures and images should be submitted as separate files.

Manuscript Components

Manuscripts should be composed of the following elements in the below order. Figures or images should be submitted as separate files.

- Title Page

The first page should be a title page containing a Running Head. See description above in Categories of Papers Published for a detailed description of title pages by manuscript type (see a recent issue for format). To avoid delays, authors should ensure that the word count is within the limits specified for the manuscript type.

- Abstract

Abstracts are unstructured. References are not cited and figure or table callouts not allowed. Provide inclusive dates of the study in the Abstract and main body of the text. The abstract and body of the text should provide a clear statement of the objective(s), such as the hypothesis tested or the question addressed. Abstracts should highlight new information made available as a result of the work being described. Provide the genus and species of each organism the first time it is given in the Abstract, and again in the text. **Keywords** Key words are included in Review, Full-length, and Short Communication articles. Four to eight key words should appear in alphabetical order, separated by commas.

- Headers

Headers for Full-length articles include: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Literature Cited. There are no textual heads in Short Communications or Letters except for Literature Cited.

- Acknowledgments

For Reviews, Full-length manuscripts, and Short communications, acknowledgments are placed at the end of the text before the Literature Cited in one indented paragraph. For Short Communications there is no "Acknowledgments" header. Grant and funding information appears in acknowledgments, omitting the number sign and abbreviation ("No."). Honorific titles such as Dr or Ms, and degrees (MD, PhD, etc.) are not included

- Literature Cited

The Literature Cited section of the manuscript should be prepared in appropriate Journal style. References in the body of the text follow the author–year style, with parenthetical entries in chronological, then alphabetical, order. Use BIOSIS journal abbreviations. Many university libraries provide online lists by discipline. In addition, authors may check the Serials Source List for Biological Sciences from Cambridge Scientific Abstracts. • The authors should carefully check that all literature cited appears in the text, and vice versa. • As a rule, use only one literature citation to make each point in the text; omit redundant citations; if multiple citations are required in the text, list them in chronological order, from oldest to most recent separated by semicolons. • Meeting abstracts, unpublished materials, and non-peer reviewed materials generally are not acceptable as citable materials; exceptions must be justified by the authors. • Theses and dissertations, state and federal documents intended for professional distribution, and peer-reviewed proceedings of meetings generally are acceptable citations.

- Tables

Tables should be prepared using the Table function in MS Word. Omit all vertical lines. Do not enclose tables with borders. Footnotes in the table should be identified by superscript lower-case letters. The table caption should appear above the table and should be complete enough to “stand alone” without reference to the text.