



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS RECEBIDOS PELO CENTRO DE
TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES DO DISTRITO FEDERAL**

FERNANDA VIANA MERGULHÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

MARÇO/ 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS RECEBIDOS PELO CENTRO DE
TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES DO DISTRITO FEDERAL

FERNANDA VIANA MERGULHÃO

ORIENTADOR: PROF. DR. VITOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 160/2019

BRASÍLIA/DF

**LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS RECEBIDOS PELO CENTRO DE
TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES DO DISTRITO FEDERAL**

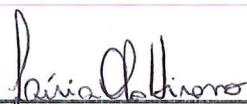
FERNANDA VIANA MERGULHÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:



VITOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES, Doutor (UNB). Orientador



LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRANO, Doutora (UNB).



ANDREY PEREIRA LAGE, Doutor (UFMG).

Brasília/DF, 18 de março de 2019.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MERGULHÃO, F.V. **Leptospirose em mamíferos recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 49 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília, e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

M5591	Mergulhão, Fernanda Viana Leptospirose em mamíferos recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Distrito Federal / Fernanda Viana Mergulhão; orientador Vitor Salvador Picão Gonçalves. -- Brasília, 2019. 49 p.
	Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) -- Universidade de Brasília, 2019.
	1. Zoonose. 2. Leptospira spp.. 3. CETAS. 4. Epidemiologia. 5. Soroaglutinação microscópica. I. Gonçalves, Vitor Salvador Picão, orient. II. Título.



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 21 de junho de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "PREVALÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS SELVAGENS PROVENIENTES DO CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES (CETAS) DO DISTRITO FEDERAL", Protocolo n.º 51/2017, sob responsabilidade do Professor Vitor Salvador Picão Gonçalves foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Espécie Silvestre Brasileira (*sem número definido*). A presente aprovação é válida pelo período de: 3/7/2017 a 1º/3/2019.



Profa. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ary Mergulhão e Fátima Viana, por terem me dado tantas oportunidades de me educar e descobrir minha paixão dentro da Veterinária, a medicina de animais selvagens.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Vitor Gonçalves, pelo acolhimento no laboratório de Epidemiologia Veterinária da UnB e por todo o ensinamento durante estes dois anos. Você é a imagem de um professor e profissional exemplar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos cedida para a pesquisa.

À Médica Veterinária Cátia Dejuste de Paula, por ter tornado meu projeto muito melhor, por todas as correções, risadas e conselhos.

À Universidade de Brasília, por permitir que eu faça parte desse grupo seleto de alunos e proporcionar um ensino de qualidade. Sinto-me orgulhosa de fazer parte da Universidade.

Às companheiras de laboratório Mariana Dornelas e Ana Lourdes, que me ajudaram a entender mais sobre a epidemiologia.

À professora Giane do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária pelo espaço cedido para que eu pudesse trabalhar com as amostras do projeto.

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo, especialmente ao professor Marcos Bryan, à técnica Gisele e ao aluno de doutorado Israel, pelo apoio em toda a parte laboratorial do projeto.

Aos meus pais, Ary e Fátima, por serem incansáveis na busca de me oferecer uma vida e educação melhores, além de me darem conselhos preciosos diariamente, e por todo o carinho e dedicação.

À minha irmã, Karla Viana, por ser um exemplo de determinação e sucesso. Você é um orgulho para nós.

Ao meu namorado Fábio Menezes, por me apoiar e estar ao meu lado nos momentos de alegria, de dificuldades, preocupações e pela ajuda na formatação do trabalho. Sem seu carinho seria tudo muito mais difícil.

À minha amiga Flávia Fialho, que sempre me apoiou profissionalmente e teve um papel importante no meu ingresso para o mestrado.

À Adriana Depieri, esposa do meu pai, que desde a graduação me apoia e aconselha na parte acadêmica da minha profissão.

Aos tratadores do CETAS-DF, especialmente ao Thiago Aguiar e Oswaldo, por me ajudarem no manejo dos animais e me receberem com muito carinho e respeito.

À Elizeth Bernardes, que coordenou o CETAS-DF durante anos, e me abriu as portas para que eu pudesse realizar a pesquisa.

A todos os funcionários do IBAMA que, de alguma forma, contribuíram para a realização do projeto.

Sumário

Lista de Figuras	10
Lista de tabelas	11
Lista de Gráficos	12
Introdução	13
Capítulo I	14
A Leptospirose	14
A Bactéria.....	15
Patogenia.....	17
Sinais Clínicos.....	17
Aspectos epidemiológicos da doença	18
Diagnóstico	19
Tratamento.....	21
Controle e Prevenção	22
A Leptospirose em animais silvestres	23
Referências Bibliográficas.....	26
Capítulo II	30
Resumo.....	30
Abstract.....	32
Introdução	33
Materiais e Métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	38
Conclusão	45
Referências Bibliográficas.....	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Página
Figura 1. <i>Leptospira</i> spp. em microscopia de campo escuro	15
Figura 2. Crescimento de <i>Leptospira</i> spp. em meio semissólido EMJH, formando o anel característico	19
Figura 3/A. Reação positiva da soroaglutinação microscópica observada em microscopia de campo escuro. Nota-se a formação de aglutinados entre o antígeno e anticorpos da amostra testada	20
Figura 3/B. Reação negativa da soroaglutinação microscópica	20
CAPÍTULO II	
Figura 4. Momento da entrada de animais resgatados pelo Batalhão de Polícia Militar Ambiental do Distrito Federal no CETAS-DF	35
Figura 5. Animais anestesiados para a obtenção de amostras biológicas	36

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Antibióticos de eleição e protocolos terapêuticos recomendados para o tratamento da leptospirose em diferentes espécies	22
Tabela 2. Antígenos do gênero <i>Leptospira</i> spp. empregados no teste de soroaglutinação microscópica	37
Tabela 3. Relação de espécies atendidas e número de amostras de soro sanguíneo e urina referente a cada espécie	39
Tabela 4. Tabela referenciando os locais de captura no Distrito Federal e a quantidade de animais capturados	42
Tabela 5. Frequência de títulos de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp. em relação ao sorovar encontrado e à espécie correspondente	43

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Descrição das instituições responsáveis pela entrega dos animais durante o período do estudo.	41

Introdução

A crescente urbanização no Brasil fez com que o ambiente natural dos animais silvestres ficasse cada vez mais reduzido, gerando maior proximidade destes com os animais domésticos e o homem. Este contato pode gerar perdas irreparáveis à fauna silvestre, desde transmissão de patógenos, como leptospirose, até a extinção de espécies (DASZAK et al., 2001).

O Distrito Federal possui uma área territorial de 5.779,999 km², correspondente a aproximadamente 0,1% do território nacional. Dentro da região estão localizadas grandes reservas naturais que, ao longo do tempo, com a expansão urbana, se aproximaram de residências e margearam as cidades. Essa configuração espacial favorece o contato entre animais silvestres, domésticos e o homem (ICMBio, 2018).

Para que possam ser elaboradas estratégias de controle de doenças infecciosas, é importante que se conheça a situação epidemiológica da região. No caso da leptospirose em animais silvestres no Distrito Federal, os estudos são escassos e a situação ainda é pouco conhecida. Isso provavelmente se deve ao fato da dificuldade de captura das espécies na natureza, dos altos custos envolvidos no trabalho, além da demanda de mão de obra especializada para a realização da pesquisa.

O presente trabalho teve como objetivos estimar a frequência de leptospirose em mamíferos silvestres recém-chegados no CETAS-DF, utilizando as técnicas de soroaglutinação microscópica e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), além de determinar o sorovar mais provável e a espécie de mamífero que o apresenta com maior frequência. Os dados obtidos permitem também mapear a origem dos mamíferos que são encaminhados ao CETAS e relacionar os achados com a frequência de leptospirose.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

A Leptospirose

A leptospirose, doença infecciosa distribuída mundialmente, é uma zoonose bacteriana de grande importância, que afeta muitas espécies de animais selvagens, domésticos e o homem. Estudos sobre este agente em animais selvagens identificaram a presença de *Leptospiras* spp. em diferentes espécies, principalmente em mamíferos, os quais podem atuar como reservatório para a doença. Roedores e pequenos marsupiais parecem ser as fontes de infecção de maior importância (CORREA et al., 2004).

No Brasil, existem estudos mostrando diferentes sorovares em diversas espécies de animais selvagens de cativeiro e vida livre, em animais domésticos e no homem (OLIVEIRA et al., 2013). Em animais domésticos as perdas produtivas podem ser consideráveis, já que a leptospirose normalmente está associada a abortamentos, infertilidade dos reprodutores, mortalidade neonatal e reabsorção fetal (FAINE, 1982).

O contato entre os animais selvagens, domésticos e o homem, cria novas oportunidades de transmissão de doenças e pode causar perdas econômicas na produção animal e levar ao aparecimento de zoonoses em humanos (SANCHES & LAVÍN, 2014). O estudo de doenças em animais selvagens adquiriu tal grau de importância que a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) incorporou as doenças infecciosas nestes animais em suas diretrizes (OIE, 2010). O monitoramento da saúde dos animais selvagens é considerado um componente importante nos programas de controle ou erradicação de doenças e nas políticas de saúde pública e animal, para a gestão e conservação de espécies selvagens (JORGE et al., 2010).

A bactéria

As *Leptospiras* spp. são bactérias do Filo Spirochaetes, Classe Spirochaetes, Ordem Spirochaetales, Família Leptospiraceae e Gênero *Leptospira*, que possuem uma morfologia bem característica, com comprimento de 4 a 20 μm , largura de 0,1 a 0,15 μm , espiras curtas de 0,5 μm e regulares, com extremidades encurvadas e um formato das letras C, J ou S. Quando vistas em microscópio, exibem movimento rápido, rotatório, sobretudo ao nível das extremidades encurvadas, a parte central se mantém mais ou menos fixa, que resulta em um aspecto em oito. O método de escolha para o exame bacterioscópico é a microscopia de campo escuro (Figura 1) (BIER, 1990).

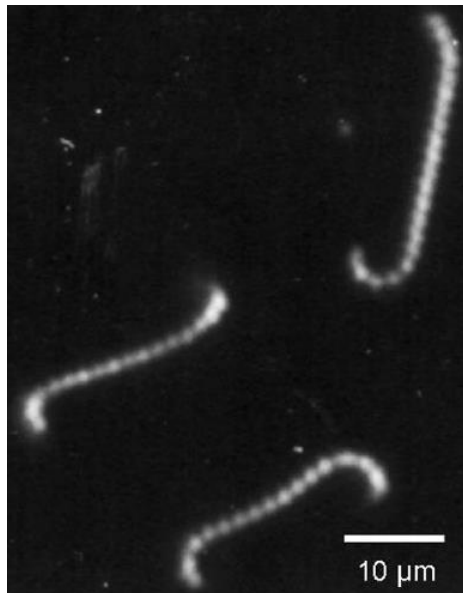


Figura 1 - *Leptospira* spp. em microscopia de campo escuro (ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

Com relação ao seu metabolismo, são aeróbios obrigatórios com um crescimento ótimo à temperatura de 28 a 30 °C e produzem catalase e oxidase. Além disso, crescem em meios simples enriquecidos com vitaminas (vitaminas B2 e B12 são fatores de crescimento), gordura de cadeia longa, ácidos e sais de amônio, ácidos graxos de cadeia longa são utilizados como a única fonte de carbono e são metabolizados por β -oxidação (BIER, 1990).

A classificação da *Leptospiras* spp. resumiu-se, por muitos anos, em dividir a bactéria em dois gêneros através de características bioquímicas: *Leptospira interrogans*, compreendendo todas as estirpes patogênicas, e *Leptospira biflexa*, contendo as linhagens saprófitas que foram isoladas do ambiente. A *Leptospira biflexa* foi diferenciada da *Leptospira interrogans* pelo crescimento a 13 °C, crescimento na presença de 8-azaguanina (225 mg/ml). Tanto a *Leptospira interrogans* quanto a *Leptospira biflexa* foram divididas em numerosos sorovares definidos por aglutinação após absorção cruzada com antígeno homólogo. Mais de 60 sorovares de *L. biflexa* foram registrados. Dentro da espécie *Leptospira interrogans* são reconhecidos mais de 200 sorovares (LEVETT, 2001).

Estudos em nível molecular observaram uma grande variabilidade genética, que reorganizou a classificação das *Leptospiras* spp. Com relação às patogênicas são relatadas dez espécies: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. terpstrae*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi* e *L. alstonii*, que são capazes de infectar e causar doença em humanos e animais. As cinco espécies intermediárias são *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae*, que foram isoladas de humanos e animais e podem ser a causa de uma variedade de manifestações clínicas leves. Por fim, as espécies saprófitas são a *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii* e *L. yanagawae*, que são bactérias ambientais e não causam doença em seres humanos ou animais (BOURHY et al., 2014; GUEDES, 2017).

Nos últimos anos, um projeto de genoma pan- *Leptospira*, apoiado pelo Centro de Sequenciamento de Genoma do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) forneceu aos pesquisadores sequências genômicas completas que permitiram grandes análises genômicas comparativas. Dentro das espécies patogênicas foram possíveis identificar ainda mais subclusters de patogenicidade variável (THIBEAUX et al., 2018).

Recentemente, em um estudo feito por Thibeaux et al. (2018), foram identificadas e descritas 12 novas espécies de *Leptospiras* spp. A *L. ellisii*, *L. barantonii* e *L. adler* foram agrupadas como patogênicas. *L. perolatii*, *L. neocaledonica*, *L. saintgironisae*, *L. haakeii* e *L. hartskeerlii* foram classificadas como intermediárias e as espécies *L. harrisiae*, *L. levettii*, *L. brenneri* e *L. macculloughii* foram consideradas saprófitas.

Patogenia

As *Leptospira* spp. penetram no organismo do animal através de ferimentos na pele ou mucosas da boca, nariz e conjuntiva ou por via venérea, através do coito, ou por via transplacentária durante o período de leptospiremia no animal prenhe. A bactéria alcança o fígado através de vasos linfáticos, onde se multiplicam durante aproximadamente cinco dias, seguido pela leptospiremia (estágio febril), também conhecida como fase precoce da doença. Nesta fase, é possível encontrar o agente em vários órgãos, embora rins e fígado sejam os mais atingidos (OLIVEIRA, 1984; BRASIL, 2014). Quando infecta os rins, a bactéria coloniza os túbulos renais e pode se tornar uma infecção crônica que resulta em uma eliminação intermitente do agente pela urina por anos e, provavelmente, pela vida inteira de um rato infectado com *L. icterohaemorrhagiae* (BUXTON & FRASER, 1977).

A infecção, no geral, resulta da exposição à urina de animais portadores, e, por isso, é de extrema importância conhecer os sorovares prevalentes em uma população e os hospedeiros que permitem a manutenção do ciclo da doença. Assim, é possível um entendimento epidemiológico e a montagem de estratégias preventivas (OLIVEIRA et al., 2013).

Sinais clínicos

A leptospirose pode atingir animais de qualquer idade, raça ou sexo, se não houver imunização prévia. A maioria dos animais com doença clínica superaguda normalmente apresenta vômito, diarreia, taquipneia, anorexia, depressão, hiperestesia muscular generalizada, febre, mucosas pálidas, petéquias, equimoses, melena e epistaxe devido à trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada (NELSON & COUTO, 2001).

Os sinais clínicos variam de acordo com a idade e o estado imunológico do animal, fatores ambientais que afetam a sobrevivência da leptospira e virulência da cepa infectante. O hospedeiro primário geralmente não apresenta sinais clínicos nem a doença de forma grave, mas o hospedeiro incidental pode manifestar a doença de forma aguda e morrer (TILLEY & SMITH JR., 2003).

Na fauna silvestre, os sinais clínicos mais relatados são a baixa da fertilidade, nascimento de animais debilitados, aborto e afecções oculares. É importante conhecer mais informações sobre a leptospirose nesses animais para que se possa entender melhor o ciclo da doença (LUNA et al., 1996).

Aspectos epidemiológicos da doença

A leptospirose ocorre em todo o território nacional em todos os meses do ano, mas com maior frequência em períodos chuvosos. Em áreas urbanas, principalmente nas grandes cidades, apresenta um caráter epidemiológico mais grave, devido a aglomerações populacionais de baixa renda, que vivem à beira de córregos, em locais com infraestrutura sanitária precária e com infestações de roedores, fatores que favorecem o aparecimento de pacientes (BRASIL, 2014).

No Brasil, no primeiro semestre de 2018 foram confirmados 1876 casos de leptospirose humana, 229 na região Norte, 605 na região Sudeste, 655 na região Sul, 279 na região Nordeste e 38 casos na região Centro-Oeste. O número total de óbitos pela doença no país foi de 155 pessoas, quatro dessas na região Centro-Oeste (BRASIL, 2018).

Em animais selvagens, a epidemiologia da doença pode ser alterada por fatores de origem natural ou antrópicos, como o crescimento da atividade agropecuária em um determinado local, fragmentação de *habitat*, poluição e ação humana. A seleção natural faz com que os patógenos sejam selecionados a se adaptarem nas condições presentes. A infecção em animais silvestres pode ocorrer por conta do contato com animais domésticos e vice-versa (MARVULO & CARVALHO, 2014).

Diagnóstico

O diagnóstico da doença baseia-se na associação dos sinais clínicos e testes laboratoriais. O isolamento de *Leptospira* spp. pode ser feito a partir de diferentes amostras e técnicas (GUEDES, 2017). No sangue é detectada durante os primeiros sete a dez dias da infecção, e a partir da urina durante aproximadamente duas semanas após a infecção inicial, tanto por cultura em meio líquido quanto por inoculação natural.

Para fazer a cultura, o sangue, a urina ou tecidos do animal podem ser utilizados e colocados em meios como Korthof's, Schuffner's ou Fletcher's com 20% de soro de coelho a 37 °C de forma aeróbica até que a colônia fique visível. Isso pode demorar de três a quatro semanas, e depois são incubados na temperatura de 29 a 32 °C (BUXTON & FRASER, 1977). As colônias de *Leptospira* spp. formam um anel de crescimento bem característico, de 1 a 3 cm abaixo da superfície (Figura 2), nos meios semissólidos de Fletcher ou EMJH (Ellinghausen modificado por Johnson e Harris) (OLIVEIRA, 1984).

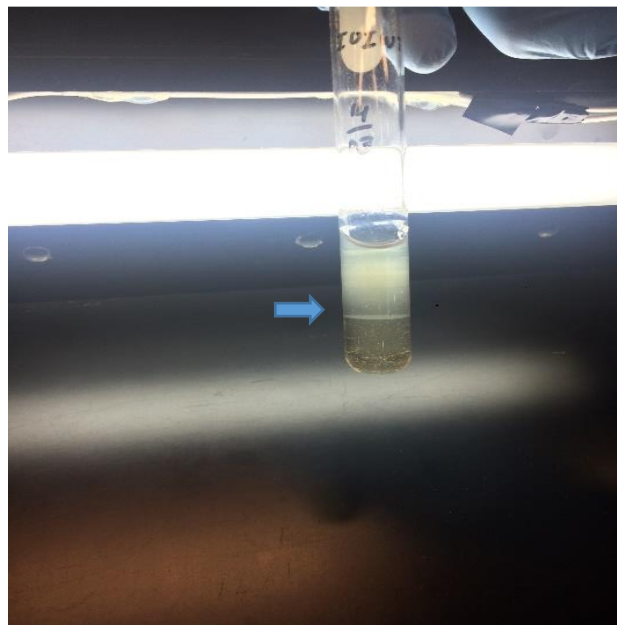


Figura 2 – Crescimento de *Leptospiras* spp. em meio semissólido Ellinghausen modificado por Johnson e Harris, com o anel característico (ARQUIVO PESSOAL).

Para fins diagnósticos, também é possível a inoculação das amostras suspeitas em ratos, camundongos ou preás. O material biológico suspeito é centrifugado com solução salina e inoculado por via intraperitoneal nos animais teste. A inoculação também pode ser feita em pele escarificada (BUXTON & FRASER, 1977).

A soroaglutinação microscópica (SAM) é uma técnica muito utilizada para diagnóstico e baseia-se na aglutinação de antígenos com seus sorovares conhecidos. Através de sucessivas diluições das amostras, observa-se a aglutinação ou a lise do microorganismo (Figura 3). Em testes positivos é possível notar que os soros menos diluídos terão aglutinação de leptospiras e nas mais diluídas observa-se a lise da bactéria (BUXTON & FRASER, 1977). O título se torna positivo após uma semana, com picos em 3 a 4 semanas, e mantém-se positivo por meses tanto após a infecção natural como vacinação. A principal vantagem dessa técnica é poder detectar o sorogrupo envolvido na infecção, porém, a desvantagem é a necessidade de se trabalhar com pessoas treinadas e disponibilidade de cepas de leptospiras vivas (SHERDING, 1998).

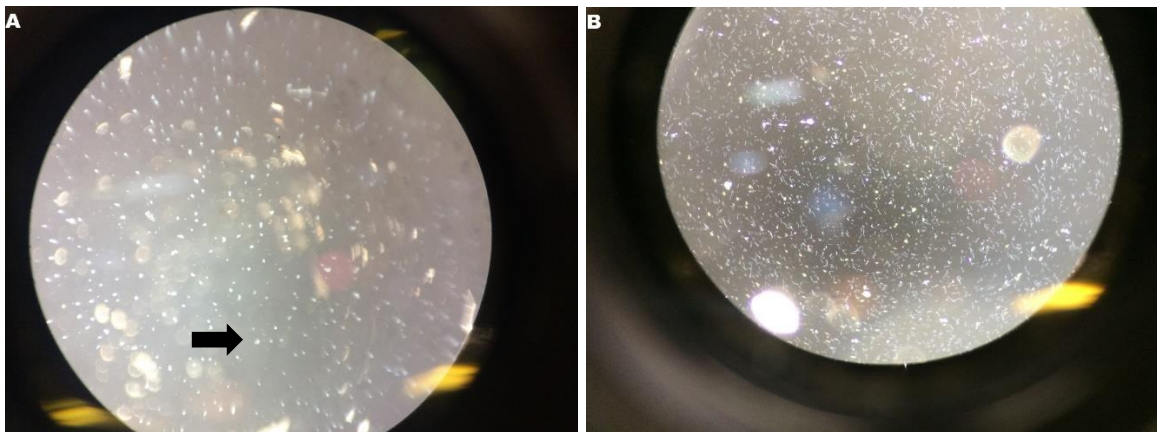


Figura 3 – A) Reação positiva na soroaglutinação microscópica observada em microscópio de campo escuro. Nota-se a formação de aglutinados entre o antígeno e anticorpos da amostra testada referenciado. **B)** Reação negativa na soroaglutinação microscópica (ARQUIVO PESSOAL).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) possui alta sensibilidade e especificidade, tornando-se um método de diagnóstico cada vez mais utilizado em seres humanos e animais. Atualmente, a junção da técnica de isolamento em meio de cultura que possui baixa sensibilidade e alta especificidade, com a PCR tem sido recomendada para a identificação da *Leptospira* spp. em amostras clínicas (VIEIRA et al, 2017). Esta técnica permite ampliar pequenas quantidades do DNA da bactéria em diferentes amostras, ainda que o animal não apresente sinais clínicos da doença. Porém, a desvantagem é um custo maior comparado a técnica de soroaglutinação microscópica (BAL et al., 1994).

Tratamento

A seleção do antibiótico deve ser baseada na condição clínica do animal, na segurança do fármaco com a espécie a ser tratada e a variedade de formas a ser administrada para facilitar o tratamento e evitar o estresse do animal. No geral, o uso de antibióticos durante a leptospirose aguda facilita a recuperação e elimina o agente do sangue e tecidos. A continuidade da terapia a partir da recuperação clínica do paciente ajuda na prevenção ou eliminação da bactéria no trato urinário (BOLIN, 2003).

Na tabela 1, Corrêa (2007) cita alguns protocolos terapêuticos para o tratamento da doença. Segundo a autora, o tratamento com antibióticos é efetivo durante os primeiros sete a dez dias da infecção e reduz o avanço da leptospirose e a presença de sequelas.

Tabela 1: Antibióticos de eleição e protocolos terapêuticos recomendados para tratamento da leptospirose em diferentes espécies.

Grupo animal	Fármaco	Dose
Herbívoros	Estreptomicina	12,5 mg/kg, q 12h, por 3 dias.
	Tetraciclina	10-15 mg/kg, q 12h, por 3 dias.
Suínos	Diidroestreptomicina	25 mg/kg, q 24h, por 3 dias
Carnívoros	Oxitetraciclina	20-40 mg/kg, q 3 a 5 dias
	Penicilina benzatina	100.000 U/kg, q 24h, por 3 dias
	Diidroestreptomicina	11 mg/kg, q 8h, por 3 dias
Primatas	Doxiciclina	5-13 mg/kg, q 24h, por 3 dias
	Oxitetraciclina	20.000-60.000 UI/kg, q 24h, por 3 dias
	Penicilina Benzatina	40.000 UI/ kg, q 72h

Fonte: Corrêa, 2007.

Controle e prevenção

O controle da leptospirose está ligado à cura ou eliminação de animais portadores, emprego de medidas de higiene e vacinação do plantel. Quando a fonte de infecção é identificada (alimentos contaminados, existência de ratos), medidas de desinfecção, drenagem e combate a roedores devem ser consideradas (OLIVEIRA, 1984). Urina infectada, água contaminada e hospedeiros reservatórios devem ser evitados, de forma que as superfícies contaminadas devem ser limpas com detergentes e desinfetantes. Todos os sorotipos que infectam os mamíferos devem ser considerados zoonóticos para os humanos (NELSON & COUTO, 2001).

Os animais silvestres tendem a mascarar sintomas de doenças e isso representa um risco quando se pensa em espécies de cativeiro. Por isso, os protocolos de biossegurança devem ser rigorosamente seguidos, para diminuir os riscos tanto para os profissionais envolvidos quanto para animais (MARVULO & CARVALHO, 2014). A quarentena é um meio importante de prevenção à entrada de agentes infecciosos em um zoológico ou criadouro. A criação de um local destinado

ao programa de quarentena dos animais não deve ser vista apenas como um prédio, e sim como um conjunto de medidas preventivas para que tudo ocorra com eficácia (SILVA & FELIPPE, 2014).

O controle de animais sinantrópicos é um dos maiores problemas em um protocolo de biossegurança, principalmente quando se trata de animais cativos. O controle de roedores é importante, mas muito difícil de se fazer quando se refere a um zoológico. Alguns animais já estão em processo de sinantropização, como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o saruê (*Didelphis albiventris*), o que gera um desafio ainda maior no controle de prevenção (SILVA & FELIPPE, 2014).

A leptospirose em animais silvestres

As alterações antrópicas de *habitat* causadas pela expansão da agricultura e urbanismo são as principais responsáveis pela extinção de espécies da fauna selvagem e pela aproximação do ser humano com essas populações (VERDADE, 2014). O monitoramento de doenças que acometem animais silvestres deve ser considerado tão importante quanto a vigilância e controle de doenças em animais domésticos. Isso se deve ao fato de esses animais atuarem como sentinelas de doenças animais, o que permite um manejo dessas doenças em animais domésticos (OIE, 2018).

O manejo e controle de doenças de animais de vida livre representam um desafio. Os sintomas muitas vezes não são facilmente percebidos como em animais domésticos. A preocupação com os animais silvestres e com a introdução de doenças infecciosas nessas populações é crescente no mundo todo. Isso ocorre, pois, além de ameaçar a fauna silvestre local, também pode afetar diretamente os animais domésticos e o homem (OIE, 2010).

Alguns estudos foram feitos no Brasil com animais cativos e de vida livre para avaliar a prevalência de leptospirose nos locais pesquisados. Em zoológicos, instituições destinadas à manutenção de animais da fauna selvagem, a diversidade de espécies de fora de seu habitat natural, em variadas condições, representa um ambiente propício a doenças, incluindo as zoonóticas como a leptospirose (PIMENTEL, 2009).

Na região de Nhecolândia, no Mato Grosso do Sul, foram examinadas 315 amostras de soros sanguíneos de animais silvestres de vida livre ou domésticos em estado feral, por meio da prova de soroaglutinação microscópica para leptospirose. Dessas amostras, 67 foram de bois baguás (*Bos taurus indicus*), 39 de porcos-monteiros (*Sus scrofa*), 39 de búfalos (*Bubalus bubalis*), nove de quatis (*Nasua nasua*), 41 de veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), dez de veados-mateiros (*Mazama americana*) e 110 amostras de ovinos (*Ovis aries*).

Em 12 animais que vieram a óbito, seis porco-monteiro, quatro veados-campeiros e dois ovinos, foram realizadas tentativas de isolamento de leptospira do fígado e dos rins por cultura em meio semissólido. Fragmentos desses órgãos foram submetidos a exame histopatológico e também a exame para detecção das *Leptospira* spp. pela técnica de imuno-histoquímica. Do total das amostras, 64 (20,3%) foram reagentes para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. patogênica, dentre eles 16 búfalos (*Bubalus bubalis*), 27 boi baguás (*Bos taurus indicus*), sete porcos monteiro (*Sus scrofa*), 10 ovinos (*Ovis aries*) e quatro veados- campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), e 251 (79,7%) não foram reagentes (GIRIO et al., 2004).

Fontana (2011) pesquisou anticorpos contra *Leptospira* spp. em 151 porcos-monteiro (*Sus scrofa domesticus*) das regiões da Nhecolândia e Abobral do Pantanal sul-mato-grossense, para estimar o risco de transmissão da leptospirose para os rebanhos bovinos locais. Das amostras coletadas, 108 foram positivas na sorologia, sendo que os principais sorovares encontrados foram *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* e *Autumnalis*.

Em 2009, também no Pantanal-sul-mato-grossense, Vieira et al. (2009) fizeram um levantamento de infecção por *Leptospira* spp. em mamíferos silvestres da região, através da soroaglutinação microscópica (SAM) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Dos 146 animais testados na SAM, 34 foram reagentes, sendo que os sorovares encontrados com maior frequência foram *Hardjobovis* (28%), *Icterohemorrhagiae* (12%), M-110/2006 (isolado de *Cerdocyon thous*; 16%), *Canicola* (L014 isolada de *Bos taurus*, 4%), *Whitcombi* (4%), *Pomona* (20%), *Autumnalis* (12%) e *Copenhageni* (M9/99 isolada de *Rattus norvegicus*, 4%). No PCR, das 70 amostras testadas, 21 foram positivas.

Oliveira et al. (2013) realizaram uma revisão bibliográfica de 80 trabalhos publicados com o objetivo de relatar os achados de *Leptospira* spp. em espécies

domésticas, de criação, sinantrópicas e silvestres. Dentre os dois últimos citados, os autores descreveram como reservatórios de *Leptospira* spp. o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*), considerado como o reservatório do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, o rato d'água (*Nectomys squamipes*) para o sorovar *Australis*, o preá (*Cavia aperea azarae*) para sorovar *Icterohaemorrhagiae* e as capivaras (*Hidrochoerus hidrochoeris*) relatadas como reservatórios dos sorovares patogênicos *Bratislava* e *Noguchii*.

Nos marsupiais da ordem Didelphimorfia, os gambás (*Didelphis marsupialis* e *Didelphis virginianus*) foram descritos com títulos para os sorovares *Ballum*, *Bataviae*, *Icterohaemorrhagiae*, *Szwajizam* e *Grippotyphosa* e também foram sugeridos como reservatórios da bactéria. Em um estudo feito com 343 morcegos da região de São Paulo, constatou-se uma prevalência de 7,8% de animais positivos, demonstrando também um potencial reservatórios nessas espécies (BESSA et al., 2010).

Vieira et al. (2019) conduziram um estudo na Mata Atlântica brasileira no qual capturaram 128 mamíferos das Ordens Rodentia e Didelphimorphia para a pesquisa de *Leptospira* spp., a partir de amostras de sangue e rins, por meio das técnicas de soroaglutinação e PCR. Um total de 28% de amostras foram positivas para o *lipL32* no PCR e quatro espécies patogênicas da bactéria foram identificadas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* e *L. noguchii*. Destacou-se, portanto, o papel dos pequenos mamíferos como portadores da bactéria na Mata Atlântica, assim como potenciais fontes de infecção para seres humanos e animais domésticos.

O verdadeiro papel dos animais silvestres como fonte de infecção de leptospirose para seres humanos e animais domésticos e seu impacto na saúde pública é controverso na literatura. Alguns trabalhos sugerem que espécies de vida livre são fontes primárias de infecção para outras espécies, sendo que outros afirmam que as estirpes circulantes na população de animais silvestres são improváveis de representar uma ameaça para animais domésticos. A diversidade de espécies selvagens que desempenham o papel de reservatório da doença é ampla. O controle e erradicação da leptospirose nesses animais é improvável, mas não deve ser negligenciado (VIEIRA et al., 2018).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA A. P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Veterinary microbiology** Vol. 140, n.3, p. 287-296, 2010.
- BAL, A., E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection os Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis os Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BESSA, T.; SPICHLER, A.; CHAPOLA, E. G. B.; HUSCH, A. C.; ALMEIDA, M. F.; SODRÉ, M. M. S.; SACRAMENTO, D. R.; VINETZ J. M. The contribution of bats to leptospirosis transmission in São Paulo City, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, vol. 82, n. 2, 2010.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 30ed, São Paulo: Melhoramentos, 1234p. Pp. 738-747, 1990.
- BISCOLA, N. P; FORNAZARI, F.; SAAD, E.; RICHINIPEREIRA, V. B.; CAMPAGNER, M. V.; LANGONI, H.; BENEDITO B.; RUI S. F. J. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospire in snakes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 3, n. 9, p.806-811, 2011.
- BOLIN, C. A. Leptospirosis. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and Wild Animal Medicine**. 5ed, St. Louis, Missouri: Saunders, 782 p. p.699-702, 2003.
- BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 64, n.12, p. 4061–4067, 2014.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Leptospirose: diagnostico e manejo clinico**. Ministério da Saúde,44p., 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirose/9805-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 28 de dezembro, 2018.
- BUXTON, A.; FRASER, G. **Animal Microbiology**. v.1, Londres: Blackwell, 357p., p.253- 259, 1997.
- CORRÊA, S. H. R. Leptospirose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 1ed, São Paulo: Roca, 1354p., p.736-739, 2007.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F. NETO, J., S., F. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v 41, p. 179-183, 2004.

CUBAS, Z. S. Biossegurança Na Manipulação De Animais Silvestres - Biossegurança em zoológicos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, suplemento 1, v. 11, p.174-177, 2008

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta tropica**, v. 78, n.2, p. 113-116, 2001.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 171 p., 1982.

FONTANA, I. **Avaliação do papel do porco monteiro na cadeia epidemiológica da leptospirose em sub-regiões do Pantanal Sul-Mato-Grossense**. 2011. 61 f. Tese (mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L. G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA, R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, T. M. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.165-169, 2004.

GUEDES, I. B. **Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento- Pará**. 2017. 74 f. Tese (mestrado em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

IBAMA. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre/cetas/o-que-sao-os-cetas#sobre-os-cetas> >. Acesso em: 26 de dezembro de 2018.

ICMBio. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/213-parque-nacional-de-brasilia.html>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2018.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LUNA-ALVAREZ, M. A.; MOLES-CERVANTES, L. P.; TORRES-BARRANCA, J. I. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio em El zoológico de Chapultepec de La Ciudad de México. **Veterinaria Mexico**, v.27, n.3, p. 229-234, 1996.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de Pequenos Animais**. 2ed, Rio de Janeiro: Guanabara, 1084p., p.1002-1003, 2001.

MARVULO, M. F. V.; CARVALHO, V. M. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2ed. 2740p., p. 2194-2204, 2014.

OLIVEIRA, S.J. Leptospira. In: GUERREIRO, M. G. et al. **Bacteriologia Especial com Interesse em Saúde Pública e Animal**. Porto Alegre, 642 p, p.463- 479, 1984.

OLIVEIRA, S. V.; ARSKY, M. L. N. S; CALDAS, E. P. “Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica”. **Saúde**, Santa Maria, v.39, n.1, p.9-20, 2013.

OIE (World Organization for Animal Health). *Training Manual on Wildlife Diseases and Surveillance*. Paris, 43p., 2010.

OIE (World Organization for Animal Health). Disponível em: < <http://www.oie.int/en/for-the-media/editorials/detail/article/improving-wildlife-surveillance-for-its-protection-while-protecting-us-from-the-diseases-it-transmit> >. Acesso em 16 de dezembro de 2018.

PIMENTEL, J. S. et al. “Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe”. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.12, p.1009-1014, 2009.

SANCHES, I. M.; LAVÍN, S. Métodos de Vigilância Epidemiológica em Fauna Selvagem. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2ed., 2014. 2740p. p.2394-2400, 2014.

SHERDING, R.G. Leptospirose, brucelose e outras doenças infecciosas bacterianas. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. *Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais*. 1ed, São Paulo: Roca, 1591p., 1998.

SILVA, J. C. R.; FELIPPE, P. A. N. Biossegurança. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2ed. 2740p., p.2152-2175, 2014.

THIBEAUX, R.; GIRAULT, D.; BIERQUE, E.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; RETTINGER, A.; DOUYÈRE, A.; MEYER, M.; IRAOLA, G.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revising the Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

TILLEY, L. P.; SMITH JR, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos**. 2ed, Barueri, São Paulo: Manole, 2003. 1423p. Pp. 894- 895, 2003.

VERDADE, L. M. A exploração da fauna silvestre no brasil: jacarés, sistemas e recursos humanos. **Biota Neotropica**, Piracicaba, v.4, n.2, 2014.

VIEIRA, A. S. **Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres do Pantanal-sul-matogrossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares.** 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

VIEIRA, A. S.; D'ANDREA, P. S.; VILELA, R. V.; LORETTO, D.; JAEGER, L. H.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LILENBAUM, W. Pathogenic *Leptospira* species are widely disseminated among small mammals in Atlantic Forest biome. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1-7, 2019.

VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, p. 229-238, 2018.

CAPÍTULO II

Leptospirose em mamíferos recebidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres do Distrito Federal

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose difundida mundialmente e afeta diferentes espécies de animais silvestres, representando um risco à saúde pública, animal e à biodiversidade. Este trabalho teve como objetivo descrever a presença de *Leptospira* spp. em mamíferos recém-chegados ao CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) do Distrito Federal e correlacionar as espécies e suas distribuições geográficas de captura. Durante o período de novembro de 2017 a novembro de 2018, foram colhidas amostras de 114 mamíferos entregues na instituição. Dessas, 113 foram de soro sanguíneo e 39 de urina, submetidas aos testes de soroglutinação microscópica (SAM) e reação em cadeia da polimerase (PCR), respectivamente. O local de captura dos indivíduos foi registrado no momento de sua entrada. Foram excluídos da pesquisa os animais que chegaram no CETAS-DF em risco de óbito. O *Didelphis albiventris* e o *Callithrix penicillata* representaram as espécies encaminhadas com maior frequência ao CETAS-DF durante o período do estudo. Os animais advêm, principalmente, das regiões da Asa Sul e Lago Sul. A presença de saruês (*Didelphis albiventris*) e saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) nos centros urbanos indica a adaptação dessas espécies nesses ambientes. O Distrito Federal possui um elevado número de unidades de conservação, facilitando a introdução de espécies silvestres na cidade. Oito soros testados para leptospirose foram reagentes para três sorovares diferentes (8/113; 7%), com titulações variando de 100 a 200. Entre os saruês (*Didelphis albiventris*), 6,9% (5/72) foram reagentes ao sorovar *Copenhageni* com titulação variando de 100 a 200, e um reagente ao sorovar *Icterohaemorrhagiae* (1/72=1,4%). Dentre as outras espécies positivas, um tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) e um ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*) foram reagentes ao sorovar *Butembo* com titulação 100. Das amostras de urina testadas, nenhuma foi positiva no PCR. Os resultados demonstram que a frequência de animais

positivos foi baixa, com títulos baixos, indicando exposição ao agente infeccioso, mas não necessariamente infecção ativa.

Palavras-chave: Zoonose, *Leptospira* spp., CETAS, epidemiologia, soroglutinação microscópica.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis that is widespread worldwide and affects different species of wild animals, posing a risk to public health, animal health and biodiversity. The aim of this work was to describe the presence of *Leptospira* spp. in mammals recently arrived at the CETAS (Wildlife Triage Center) of the Federal District, to characterize the species and their geographic distribution of capture. During the period from November 2017 to November 2018, samples of 114 mammals were collected in the institution. Of these, 113 were of blood serum and 39 of urine, submitted to microscopic agglutination test (MAT) and polymerase chain reaction (PCR), respectively. The place of capture of the individuals was registered at the time of their entry. Animals that arrived at CETAS-DF at death risk were excluded from the study. *Didelphis albiventris* and *Callithrix penicillata* represented the species most frequently referred to CETAS-DF during the study period. The animals came mainly from the regions of Asa Sul and Lago Sul. The presence of white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) and black-tufted marmosets (*Callithrix penicillata*) in urban centers indicates the adaptation of these species in these environments. The Federal District has a high number of conservation units, facilitating the introduction of wild species in the city. Eight sera tested for leptospirosis were reagents for three different serovars (8/113, 7%), with titers varying from 100 to 200. Among the white-eared opossums (*Didelphis albiventris*), 6.9% (5/72) were serovar reagents *Copenhageni* with titers varying from 100 to 200, and one reagent to the serovar *Ichterohaemorrhagiae* (1/72 = 1.4%). Among the other positive species, one armadillo (*Dasybus novemcinctus*) and one porcupine (*Coendou prehensilis*) were reactive with to the *Butembo* serovar with titer 100. None of the urine samples tested were positive in the PCR. The results demonstrate that the frequency of positive animals was low, with low titers indicating exposure to the infectious agent, but not necessarily active infection.

Keywords: Zoonosis, *Leptospira* spp., CETAS, epidemiology, microscopic agglutination test.

Introdução

A leptospirose é uma zoonose causada por bactéria da Ordem Spirochaetales, Família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*, que possui morfologia característica, em forma de espiral e com as extremidades encurvadas. Na classificação, baseada no genoma, são descritas 22 espécies de *Leptospira*, sendo dez espécies patogênicas, cinco intermediárias e sete espécies saprófitas, contidas em 20 sorogrupos com mais de 300 sorovares (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2017).

As espécies patogênicas são as que comumente causam doença clínica nos animais e no homem, as intermediárias causam sinais clínicos brandos e não tiveram sua virulência determinada em ensaios experimentais, e as saprófitas, que somente são isoladas do ambiente. A classificação em patogênica, intermediária e saprófita, além dos aspectos clínicos-epidemiológicos, também se baseia na sequência do gene *rRNA 16S* (PICARDEAU, 2017).

Recentemente, em um estudo feito por Thibeaux et al (2018), foram identificadas e descritas 12 novas espécies de *Leptospira* spp. A *L. ellisii*, *L. barantonii* e *L. adler* foram agrupadas como patogênicas. *L. perolatti*, *L. neocaledonica*, *L. saintgironsiae*, *L. haakeii* e *L. hartskeerlii* foram classificadas como intermediárias e as espécies *L. harrisiae*, *L. levettii*, *L. brenneri* e *L. macculloughii* foram consideradas saprófitas.

A leptospirose é uma doença que acomete o ser humano, animais carnívoros, primatas, roedores e marsupiais. Esses animais silvestres podem se tornar portadores e disseminar a bactéria no ambiente (OLIVEIRA et al., 2013).

A dinâmica de ocupação desordenada das cidades tem implicações ambientais e sociais. O desmatamento e degradação ambiental levam à invasão de animais que procuram alimentos e novos *habitat*, integrando a fauna urbana. Esse é o caso de espécies como o *Didelphis albiventris*, *Sapajus apella*, *Callithrix penicillata*, *Hydrochoerus hydrochaeris*, entre outros (SEMA, 2013).

Os Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) fazem parte do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e são responsáveis por receber animais entregues voluntariamente, oriundos de resgate ou de apreensão de fiscalização. Uma vez que os animais dão entrada no local, os CETAS os recuperam e destinam por meio de soltura ou encaminhamento para

empreendimentos de fauna devidamente autorizados. O CETAS do Distrito Federal está localizado na Floresta Nacional de Brasília e é um importante local de assistência aos animais silvestres da região (IBAMA, 2019).

Diversas pesquisas foram feitas no Brasil e no mundo para se conhecer a situação epidemiológica da leptospirose em animais silvestres. Oliveira et al (2013) revisaram 80 publicações relacionadas aos principais reservatórios de leptospirose, e concluíram que qualquer animal é suscetível à doença e pode atuar como fonte de infecção. Mesquita et al (2018) e Castro et al. (2018) realizaram recentemente estudos epidemiológicos da doença com marsupiais nos estados do Rio de Janeiro e Pará, identificando animais positivos para leptospirose. Não foram encontrados estudos publicados relacionados a animais silvestres e a doença no Distrito Federal.

Este trabalho teve como objetivo descrever a presença de *Leptospira* spp. em mamíferos recém-chegados ao CETAS-DF durante o período de novembro de 2017 a novembro de 2018, caracterizar as espécies e suas distribuições geográficas de captura.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado de novembro de 2017 a novembro de 2018, no Centro de Triagem de Animais Silvestres do Distrito Federal, localizado na Floresta Nacional de Brasília. Fizeram parte da pesquisa todos os mamíferos recém-chegados ao local nesse período, com exceção dos que se encontravam em risco de óbito. Para cada animal também foram registrados dados como local de origem do indivíduo e modalidade de entrega no CETAS-DF. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (protocolo nº 51/2017), Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA- protocolo nº 02008.100566/2017-42) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO- 55892).

Os animais eram provenientes de apreensões e resgates realizados pelo Batalhão de Polícia Militar Ambiental (BPMA), Corpo de Bombeiros e outras instituições responsáveis, além de entregas voluntárias feitas por civis da região

(Figura 4). As ações de apreensão fiscalizatória e resgate de animais feridos foram feitas nas regiões do Distrito Federal e entorno.



Figura 4- Momento da entrada de animais resgatados pelo Batalhão de Polícia Militar Ambiental do Distrito Federal no CETAS-DF (ARQUIVO PESSOAL).

Os animais foram contidos fisicamente e anestesiados para a obtenção das amostras biológicas (Figura 5). Os fármacos utilizados foram cetamina (10-30 mg/kg) e midazolam (0,5-2 mg/kg), aplicados por via intramuscular, para a indução anestésica de animais que comprometiam a segurança da equipe no procedimento, e isoflurano, utilizado com vaporizador universal, para a manutenção anestésica de todos os animais. As amostras de sangue e urina foram colhidas no momento de entrada do animal na instituição e uma única vez, com o auxílio de seringas, agulhas e sondas estéreis. O sangue foi colhido por venopunção da jugular, safena lateral ou femoral e o acesso era escolhido de acordo com a espécie. A urina foi obtida por cistocentese ou sondagem vesical.



Figura 5- Animais anestesiados para a obtenção de amostras biológicas. Da esquerda para a direita: cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) e saruê (*Didelphis albiventris*) (ARQUIVO PESSOAL).

O sangue e a urina obtidos foram depositados em tubos estéreis sem anticoagulantes. Em seguida, o sangue foi centrifugado para extração do soro sanguíneo e o material foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras obtidas foram encaminhadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. usando o método de soroprecipitação microscópica, aplicou-se uma coleção de 24 antígenos vivos, entre amostras de referência e estirpes autóctones isoladas no Brasil (Tabela 2).

Tabela 2- Antígenos do gênero *Leptospira* spp. empregados no teste de soroaglutinação microscópica.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Ballum</i> <i>Serjroe</i> <i>Javanica</i> <i>Tarassovi</i> <i>Celledoni</i>	Catellonis Hardjo (Hardjobovis) Javanca Tarassovi Whitcombi
<i>L. interrogans</i>	<i>Australis</i> <i>Autumnalis</i> <i>Bataviae</i> <i>Australis</i> <i>Canicola</i> <i>Icterohaemorrhagiae</i> <i>Sejroe</i> <i>Hebdomadis</i> <i>Pomona</i> <i>Pomona</i> <i>Pyrogenes</i> <i>Icterohaemorrhagiae</i> <i>Djasiman</i>	Australis Autumnalis Bataviae Bratislava Canicola Copenhani Hardjo (Hardjoprajitno) Hebdomadis Pomona Pomona (GR6) Pyrogenes Icterohaemorrhagiae Sentot
<i>L. kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa</i> <i>Autumnalis</i> <i>Cynopteri</i>	Grippotyphosa Butembo Cynopteri
<i>L. noguchi</i>	<i>Panama</i>	Panama
<i>L. santarosai</i>	<i>Shermani</i> <i>Sejroe</i>	Shermani Guaricura

Fonte: Guedes, 2017.

As amostras de soro sanguíneo dos animais foram diluídas na proporção 1:50 em solução salina de Sorensen (pH 7,4). Em seguida, 50 µL das diluições das amostras foram adicionados em microplacas de poliestireno contendo 96 poços. Posteriormente, 50 µL do antígeno foram adicionados aos poços obtendo-se a diluição de 1:100. As microplacas foram incubadas a 28 °C por no mínimo duas horas para a realização da leitura e interpretação.

Cada antígeno foi analisado microscopicamente quanto a sua viabilidade, pureza e autoaglutinação, para controle de validação do teste. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro para a observação das aglutinações, considerando-

se reagentes apenas as amostras que apresentaram no mínimo 50% de leptospiras aglutinadas na diluição 1:100 (FAINE et al., 1999; WHO, 2012).

As amostras de urina foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 200 µL tampão TE. A extração e purificação do DNA das amostras foram realizadas com isotiocianato de guanidina – GT (adaptado de Chomczynski, 1993). Para tal, 450 µL de GT (30 g de isotiocianato de guanidina; 2,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5; 5 mL de EDTA 0,25 M pH 8,0; 50 mL de fenol; água ultrapura qsp 100 mL) foi adicionado a 200 µL de urina, homogeneizadas vigorosamente em agitador de tubos tipo vórtex e incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) por 10 min. Após este período, foi adicionado 100 µL de clorofórmio e homogeneizadas novamente.

Em seguida, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo acrescido de 200 µL de propanol, homogeneizado por inversão e incubado por um período de, no mínimo, duas horas a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 30 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 900 µL de etanol 70%, centrifugado a 12.000 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi novamente eliminado. Secou-se o sedimento em placa aquecida sem agitação a 56°C por 10min, em seguida, foram suspensos em 30 µL de TE e novamente incubados em placa aquecida a 56 °C por 10 min. O material extraído foi armazenado a -20 °C até o momento do uso. Amplificação de DNA para *Leptospira* spp. foi realizada por PCR com os pares de primers Lep1 e Lep2 que amplificam uma região de 330 pb do gene 16S rRNA (rrs) (MÉRIEN et al., 1992) e utilizando o Go Taq Green Master Mix (Promega Brasil). Também foi realizada uma PCR com os primers para o gene LipL32 (STODDARD et al., 2009) que identifica apenas leptospiras patogênicas, gerando um amplicon de 242 pb.

Resultados e Discussão

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram atendidos 114 animais, dos quais foram colhidas 113 amostras de soro sanguíneo e 39 de urina de diferentes espécies para serem submetidos aos testes de soroaglutinação microscópica e PCR, respectivamente, para a pesquisa de anticorpos

anti-*Leptospira* spp. e detecção do DNA da bactéria (Tabela 3). O menor número de amostras de urina deve-se ao fato de que alguns animais eram excessivamente pequenos ou estavam com a vesícula urinária vazia, impossibilitando a colheita. No caso da capivara, o sangue não foi colhido pois o animal foi destinado para soltura imediata no momento que chegou na instituição, o que impossibilitou a contenção química.

Tabela 3- Relação de espécies atendidas e número de amostras de soro sanguíneo e urina referente a cada espécie.

Nome comum	Nome científico	Amostrados	Nº amostras de soro sanguíneo	Nº de amostras de urina
Saruê	<i>Didelphis albiventris</i>	72	72	18
Sagui-de-tufos-pretos	<i>Callithrix penicillata</i>	22	22	9
Ouriço-cacheiro	<i>Coendou prehensilis</i>	4	4	2
Macaco-prego	<i>Sapajus apella</i>	4	4	4
Furão	<i>Galictis cuja</i>	1	1	1
Jaguatirica	<i>Leopardus pardalis</i>	1	1	-
Cutia	<i>Dasyprocta leporine</i>	1	1	-
Preá	<i>Cavia aperea</i>	1	1	1
Tamanduá-mirim	<i>Tamandua tetradactyla</i>	1	1	-
Tapiti	<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	1	1	1
Tatu-galinha	<i>Dasypus novemcinctus</i>	2	2	-
Caititu	<i>Pecari tajacu</i>	1	1	1
Quati	<i>Nasua nasua</i>	1	1	1
Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	1	1	-
Capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1	-	1
Total		114	113	39

Durante o período do estudo observou-se que as espécies de mamíferos encaminhadas com maior frequência ao CETAS-DF foram o saruê (*Didelphis albiventris*), representando 63,15% (72/114) e o sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) com 19,3% (22/114). Os outros mamíferos registrados foram: ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*) 3,5% (4/114), macaco-prego (*Sapajus apella*) 3,5%

(4/114), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) 1,75% (2/114). Furão (*Galictis cuja*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*), cutia (*Dasyprocta leporine*), preá (*Cavia aperea*), tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*), caititu (*Pecari tajacu*), quati (*Nasua nasua*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) representaram 0,88% cada , (1/114).

A presença de animais como os saruês (*Didelphis albiventris*) e os saguis-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) nos centros urbanos revela um quadro de desequilíbrio ecológico causado pela expansão da cidade. A capacidade humana de alteração do meio exige um planejamento constante para que se possa obter um convívio saudável entre animais silvestres e as pessoas.

Todos os animais apresentam papéis importantes para a manutenção do equilíbrio e conservação biológica, como predadores, disseminadores de sementes, polinizadores, além de atuarem sobre a vegetação e cadeia alimentar (SEMA, 2013). A fauna silvestre também movimenta a economia, através do turismo que envolve parques naturais e hotéis voltados para essas atividades. A educação ambiental possibilita o maior contato entre jovens e a vida selvagem, por promover uma maior valorização dos animais nos diversos *habitat* (ZAGO, 2008).

A maioria dos saruês (*Didelphis albiventris*) possuem hábitos noturnos e uma dieta onívora, que inclui pequenos vertebrados, artrópodes e frutos. São animais que se adaptam muito bem às cidades por sua dieta variada e por se locomoverem pelo solo e em árvores. *Callithrix penicillata*, sagui-de-tufos-pretos, é a espécie, dentre os primatas que possui maior distribuição no Brasil. Estes animais habitam florestas, matas ciliares e regiões secas como o cerrado. Se alimentam de flores, frutos, néctar, sementes, ovos, filhotes de aves e insetos (SEMA, 2013). Essas duas espécies de mamíferos também foram rotineiramente recebidas em outros locais do Brasil, como Montes Claros (MG), Salvador (BA), São Paulo (SP), Belo Horizonte (MG), Campo Grande (MS) e Juiz de Fora (MG) (ALBANO, 2009; BORGER et al., 2006; BRANCO, 2008; FRANCO et al., 2012, FREITAS, 2014; SILVA, 2015).

Tratando-se dos meios pelos quais os animais foram entregues ao CETAS-DF, a BPMA representou a forma mais frequente de entrada de animais na instituição, com 84% do total (Gráfico 1). O Batalhão de Polícia Militar Ambiental, dentre outras funções, realiza resgates de animais silvestres e fiscaliza denúncias de crimes

ecológicos, representando um papel importante de assistência à fauna silvestre no Distrito Federal.

Em relação ao local de origem dos animais 104 tiveram seu local de resgate registrados, ou seja, 90% dos dados. Desses, 97 foram capturados no Distrito Federal (Tabela 4). Esses números representam um dado satisfatório, visto que muitos CETAS no Brasil não registram a origem dos animais. As regiões do Lago Sul e Asa Sul foram as mais frequentes, representando 14,5% e 13,5%, respectivamente. Além dos animais resgatados no DF, cinco eram provenientes de Goiás e dois da cidade de Unaí, em Minas Gerais.

Gráfico 1- Descrição das instituições responsáveis pela entrega dos animais no Cetas-DF, do período de Novembro de 2017 a Novembro de 2018.

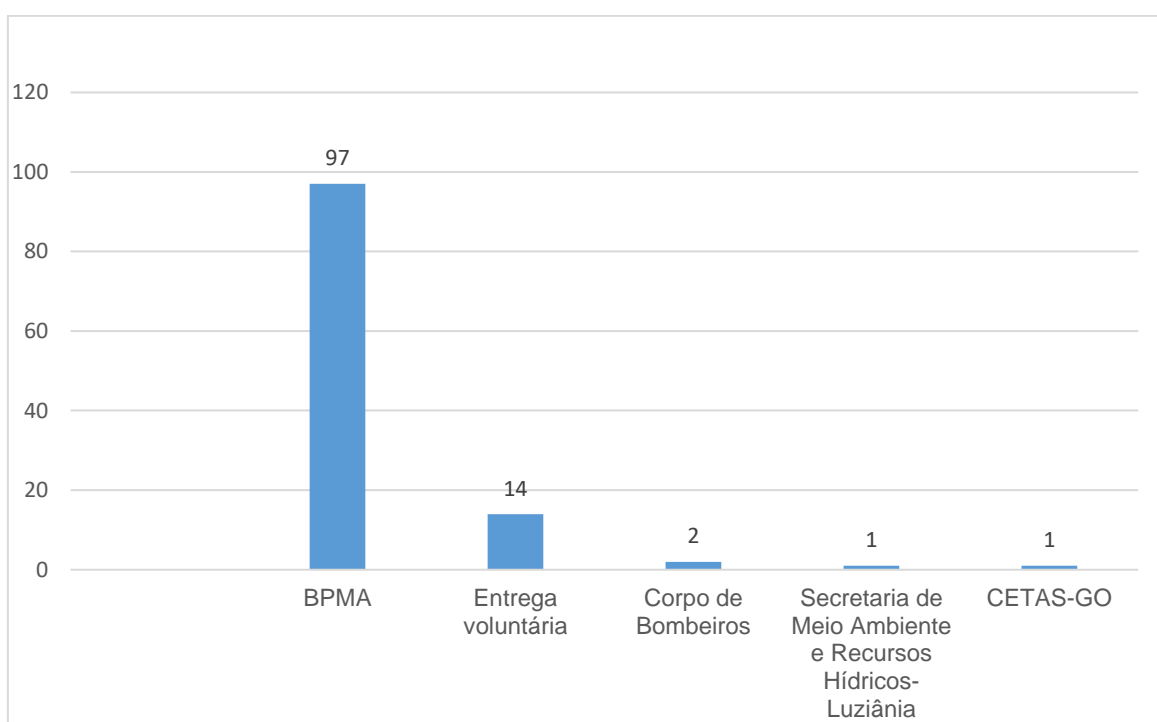


Tabela 4- Locais de captura de animais silvestres encaminhados ao Cetas-DF e a quantidade de animais capturados.

Local de captura	Nº de animais capturados
Lago Sul	15
Sobradinho II	3
Gama	2
Asa Sul	14
Guará	5
Taguatinga	7
Jardim Botânico	8
Riacho Fundo	2
Esplanada dos Ministérios	2
Park Way	3
São Sebastião	1
Lago Norte	4
Asa Norte	9
Vila Planalto	1
Ceilândia	5
Cruzeiro	4
Recanto das Emas	1
Candangolândia	6
Vicente Pires	1
Águas Claras	2
Brazlândia	1
Samambaia	1
Total	97

FREQUÊNCIA DE LEPTOSPIROSE

Das 113 amostras de soro sanguíneo submetidas ao teste de soroaglutinação microscópica, oito foram reagentes para três sorovares diferentes, com titulações

variando de 100 a 200. Observa-se a detecção desses anticorpos em três espécies de mamíferos diferentes (Tabela 5).

Tabela 5- Frequência de títulos em soro sanguíneo de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em relação ao sorovar encontrado e à espécie correspondente.

Espécie	Sorovares	Títulos		Total Positivos	Amostrados	Prop %
		100	200			
<i>Didelphis albiventris</i>	<i>Copenhageni</i>	4	1	5	72	5/72 (6,9%)
	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	-	1		1/72 (1,4%)
<i>Dasyus novemcinctus</i>	<i>Butembo</i>	1	-	1	2	1/2 (50,0%)
<i>Coendou prehensilis</i>	<i>Butembo</i>	1	-	1	4	1/4 (25,0%)
Outras	-	-	-	0	36	0%
Total		7	1	8	113	8/113 (7,0%)

Dos oito animais positivos na SAM, quatro saruês (*Didelphis albiventris*) foram capturados no Lago Sul, um em Vicente Pires, um tatu-galinha (*Dasyus novemcinctus*) no Park Way e um ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*) sem o local de resgate esclarecido. Com relação a faixa etária, quatro saruês (*Didelphis albiventris*) eram filhotes, um jovem e um adulto. Os indivíduos das outras duas espécies também eram adultos. A idade foi caracterizada pelo peso dos animais em relação a cada espécie. Quanto ao sexo dos animais, um filhote e um adulto de saruê (*Didelphis albiventris*) eram fêmeas, todos os outros animais positivos eram machos.

Os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*, pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, encontrados nos saruês (*Didelphis albiventris*) corroboram com publicações revisadas por Oliveira et al. (2013), que sugerem esta espécie como potencial reservatório da espiroqueta. Esses dois sorovares estão intimamente relacionados a ratazana (*Rattus norvegicus*) (FAINE 1999; LATIFAH et al., 2017), sendo o principal sorovar que acomete o ser humano no Brasil (BLANCO et al., 2016). Isto pode estar relacionado ao *Didelphis albiventris* ser praticamente um animal sinantrópico, conseqüentemente compartilhando o mesmo habitat que o *Rattus norvegicus*. O sorovar *Butembo* foi descrito principalmente em animais domésticos

como bovinos, felinos e cães (BLAZIUS, et al., 2005; PARREIRA, 2009; SALDANHA, 2006), e sugerem um possível contato com animais domésticos do Distrito Federal.

A frequência de animais positivos foi baixa e com títulos baixos, indicando uma possível exposição ao agente infeccioso, mas não necessariamente infecção ativa (OIE, 2014). No entanto, Vieira et al. (2019) conseguiram identificar o DNA de *Leptospira* spp. em rim de pequenos mamíferos, inclusive do gênero *Didelphis*, o que indica que mesmo o animal soronegativo ou com títulos baixos pode ser portador renal da leptospira.

Das 39 amostras de urina submetidas ao PCR, dez foram positivas na PCR para gene 16S, mas nenhuma foi positiva na PCR para o gene LipL32. Esses resultados indicam que nenhuma leptospira patogênica foi identificada, uma vez que o gene LipL32 somente está presente em leptospiros classificadas como patogênicas. Os resultados dos testes de sorologia e PCR deste trabalho sugerem que os animais que foram reagentes aos sorovares citados na Tabela 5 tiveram contato com o agente, mas não estavam eliminando a bactéria pela urina no momento da colheita. Deve-se levar em consideração a eliminação intermitente da bactéria, possibilitando um resultado falso negativo no teste.

Dos animais positivos na SAM, somente um saruê (*Didelphis albiventris*) teve a urina colhida para o PCR. A titulação baixa encontrada na SAM pode representar o início da infecção pela *Leptospira* spp., ou uma titulação de anticorpos adquirida pelo contato com a bactéria em algum momento da vida do animal, resultado que poderia ser confirmado com uma segunda amostra colhida do mesmo indivíduo dez dias após a primeira. No caso deste estudo, não foi possível obter outra amostra de soro sanguíneo pois os animais eram encaminhados para outro destino após sua chegada no CETAS-DF. Não é possível fazer inferência populacional com os dados disponíveis, visto que esses animais não foram obtidos por meio de procedimento amostral aleatório, ou seja, eles podem não representar a situação epidemiológica da região.

Sabe-se que a sorologia em animais silvestres não representa a principal ferramenta de diagnóstico de leptospirose, visto que muitos indivíduos podem carrear e eliminar a espiroqueta pela urina e se apresentarem soronegativos. Demonstra-se, portanto, a importância de se associar métodos moleculares como o PCR a outros meios diagnósticos para resultados mais consistentes, o que leva a

melhor compreensão da epidemiologia da doença em diferentes biomas (VIEIRA et al., 2017).

Em um estudo feito por VIEIRA et al (2019), ressaltou-se a importância do PCR no resultado da pesquisa feita com a mesma doença em animais silvestres, com a taxa de positividade de 30% em tecidos renais coletados. No caso da detecção da bactéria pela urina, deve-se lembrar que o agente é eliminado de forma intermitente, possibilitando um diagnóstico falso negativo da amostra testada. Apesar da limitação da SAM, esse ainda é o método de diagnóstico de eleição para leptospirose, que indica o sorogrupo ou sorovariedade que está infectando o indivíduo.

A infecção por *Leptospira* spp. está amplamente distribuída entre espécies das ordens Rodentia e Didelphimorphia. Desta forma, sabe-se que a espécie *Rattus norvegicus*, em ambientes urbanos, é considerada o principal reservatório da bactéria. No ciclo selvagem da doença, a classificação de uma espécie como “único reservatório” se torna quase impossível em climas tropicais, uma vez que a bactéria está presente em vários animais (VIEIRA et al., 2019).

No presente estudo não foram encontradas alterações clínicas compatíveis com a leptospirose nos animais amostrados. A infecção assintomática é muito comum em animais silvestres, domésticos e no homem. Porém, em animais de vida livre a identificação de uma infecção se torna ainda mais difícil pela capacidade dos animais silvestres de mascararem os sintomas, a fim de não se tornarem uma presa fácil na natureza. Como consequência, muitos quadros clínicos resultam rapidamente em óbito (VIEIRA et al, 2019).

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu caracterizar as espécies de mamíferos que entram com maior frequência no CETAS-DF. Pode-se observar que o saruê (*Didelphis albiventris*) e o sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*) tiveram maior representatividade no período da pesquisa. As regiões do Lago Sul e Asa Sul foram as procedências mais registradas como locais de origem dos animais. Sugere-se que este resultado se deve à adaptação destas espécies a centros urbanos e pela grande quantidade de Unidades de Conservação situadas no Distrito Federal.

Foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* spp. em seis saruês (*Didelphis albiventris*), um tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) e um ouriço-cacheiro (*Coendou*

prehensilis). A frequência de animais positivos foi baixa, com títulos baixos, indicando exposição ao agente infeccioso, mas não necessariamente infecção ativa. A realização de estudos como este contribui para o melhor entendimento do ciclo epidemiológico da doença entre animais silvestres, domésticos e seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA A. P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, vol.140, n.3, p. 287-296, 2010.

ALBANO, A. P. N. **Fungos e micoses em animais silvestres recebidos por Centros de Triagem**. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal). 2009. 82f. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

BLANCO, R. M.; SANTOS, L. F.; GALLOWAY, R. L.; ROMERO, C. Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Disease**. v. 44, p. 34-36, 2016.

BLAZIUS, R. D.; ROMÃO, P. R. T.; BLAZIUS, E. M. C. G.; SILVA, O. S. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, Rio de Janeiro, 2005.

BORGES, R. C.; OLIVEIRA, A.; BERNARDO, N.; COSTA, R. M. M.C. Diagnóstico da fauna silvestre apreendida e recolhida pela Polícia Militar de Meio Ambiente de Juiz de Fora, MG (1998 e 1999). **Revista Brasileira de Zootecias**, v.8, n.1, p. 23-33, 2006.

BRANCO, A. G. **Políticas públicas e serviços públicos de gestão e manejo de fauna silvestre nativa resgatada. Estudo de caso: Prefeitura da Cidade de São Paulo**. 2008. 160p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CASTRO, M. P.; FIGUEIREDO, F. B.; BALASSIANO, I. T.; VERELA, T. M.; PEREIRA, M. M. *Leptospira* spp. in Opossums *Didelphis aurita* from the Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 5, p.1132, 2018.

CHOMCZYNSKI, P. A. Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA. DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p 532-534, 1993.

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

FRANCO, M. R. Animais silvestres apreendidos no período de 2002 a 2007 na macrorregião de Montes Claros, Minas Gerais. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p. 1007-1018, 2012.

FREITAS, A. C. P. **Distribuição espaço-temporal dos animais recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2003 a 2012**. 2014. 77p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

GUEDES, I. B. **Pesquisa de *Leptospira spp.* em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento- Pará**. 2017. 74 f. Tese (mestrado em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

IBAMA. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre/cetas/o-que-sao-os-cetas#sobre-os-cetas> >. Acesso em: 29 de janeiro de 2019.

JORGE, S. **Identificação molecular e perfil sorológico de *Leptospira spp.* isolada de gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) no Sul do Brasil**. 2009. 56f. Dissertação (mestrado. Programa de Pós-Graduação em Veterinária) - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

LATIFAH, I.; ABDUL, H. A.; RAHMAT, M. S.; NADIA, M. F.; UBIL, Z. E.; NASIR, M. A. Isolation by culture and PCR identification of Lip32 gene of pathogenic *Leptospira spp.* in wild rats of Kuala Lumpur. **The Malays Journal of Pathology**, v. 39, p 161-166, 2017.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction goes detection of *Leptospira spp.* in clinical samples. **Journal Clinical Microbiology**, vol. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MESQUITA, G. S. S.; ROCHA, K. S.; MONTEIRO, T. R. M.; ROSÁRIO, M. K. S.; BAIÁ, I. W. M.; PEREIRA, H. S.; CERQUEIRA, V. D.; MORAES, C. C. G. Detection of antibodies against *Leptospira spp.* in free-living marsupials caught in the Eastern Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Pará, v.51, n. 3, p. 368-371, 2018.

OIE. Leptospirosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris. 1343 p., 2014.

OLIVEIRA, S. V.; ARSKY, M. L. N. S.; CALDAS, E. P. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. **Saúde**, Santa Maria, v.39, n.1, p.9-20, 2013.

PARREIRA, I. M. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Leptospira spp.* em felinos domésticos (*Felis catus*) aparentemente sadios da região metropolitana de Goiânia, Goiás.** 2009. 57f. Dissertação (mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2009.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Mèdicine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2017.

SALDANHA, G. B.; CAVAZINIL, N. C.; SILVA, A. S.; FERNANDES, M. B.; BADKE, M. R. T.; PIVETTA, C. G. Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando problemas reprodutivos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1182-1184, Santa Maria, 2007.

SEMA (Secretaria de Meio Ambiente do Distrito Federal). **Biodiversidade, vida no Cerrado.** 54 p., Brasília, 2004.

SEMA (Secretaria de Meio Ambiente). **Cadernos de Educação Ambiental. Fauna Urbana.** São Paulo, 216 p., 2013.

SILVA, N. S. **Espécimes recebidos no centro de triagem de animais silvestres de Salvador/BA durante os anos de 2012 a 2014.** 2015. 46p. Trabalho Final de Curso (Graduação em Medicina Veterinária), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

STODD R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira spp.* though TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

THIBEAUX, R.; GIRAULT, D.; BIERQUE, E.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; RETTINGER, A.; DOUYÈRE, A.; MEYER, M.; IRAOLA, G.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revising the Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

VIEIRA, A. S.; D'ANDREA, P. S.; VILELA, R. V.; LORETTO, D.; JAEGER, L. H.; CARVALHO-COSTA, F. A.; LILENBAUM, W. Pathogenic *Leptospira* species are widely disseminated among small mammals in Atlantic Forest biome. **Transboundary and Emerging Diseases**, p. 1-7, 2019.

VIEIRA, A. S.; PINTO, P.S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Tropical Health and Animal Production**, v.50, p. 229-238, 2017.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. p. 57–72, 2012.

ZAGO, D. C. **Animais da fauna silvestre mantidos como animais de estimação**. 2008. 40 p. Monografia de especialização (Especialista em Educação Ambiental), Programa de Pós-Graduação em Educação Ambiental, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.