

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ANAHI SOUTO VIEIRA

**LEVANTAMENTO DE *Leptospira* spp EM ANIMAIS SILVESTRES DO
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE POR MEIO DE TECNICAS
SOROLOGICAS E MOLECULARES**

**SURVEY *Leptospira* spp OF WILD ANIMALS IN THE PANTANAL SUL-
MATO-GROSSENSE THROUGH SEROLOGICAL AND MOLECULAR
TECHNIQUES**

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL- BRASIL
FEVEREIRO DE 2009**

ANAHI SOUTO VIEIRA

**LEVANTAMENTO DE *Leptospira* spp. EM ANIMAIS SILVESTRES DO PANTANAL
SUL-MATO-GROSSENSE, POR MEIO DE TÉCNICAS SOROLÓGICAS E
MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2009

Anahi Souto Vieira

“Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres do Pantanal sul-mato-grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares”

“Survey of *Leptospira* spp. in wild animals of the Pantanal sul-mato-grossense through serological and molecular techniques”

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Animal

APROVADA: 27/02/2009



Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin
Orientadora



Dra. Raquel Soares Juliano



Dra. Grácia Maria Soares Rosinha

“EM TUDO QUE Á NATUREZA OPERA, ELA NADA FAZ BRUSCAMENTE.”

Lamarck

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a construir esta dissertação, em especial:

Minha família, ao Lu e amigos, por partilharem de momentos de alegria e segurança, e pela paciência nos momentos de irritação e ansiedade.

A Dra. Aiesca Oliveira Pellegrin, por ser minha orientadora, e ter me ajudado a entender as leptospiros, ter acreditado em mim e enxergado um potencial que nem eu mesma via. Agradeço o incentivo e por demonstrar satisfação com meu trabalho e amadurecimento.

A Dra. Carina Elisei de Oliveira por ser, mais que uma co-orientadora, uma amiga; agradeço pela atenção, disposição e por todas as horas dedicadas a me ajudar. Agradeço o incentivo e o modo carinhoso com que me acolheu, como se eu fosse de fato sua orientada. Muito obrigada.

A Dra. Grácia Maria Soares Rosinha, por permitir o uso do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte. Obrigada pela disponibilidade em me tirar duvidas e dar sugestões, pela preocupação verdadeira com os problemas enfrentados e pela ajuda em solucioná-los.

Ao Dr. Guilherme de Miranda Mourão, Walfrido Tomás, Rita de Cássia Bianchi, Natalie Olifiers, Ísis Meri Medri, Fabiana Lopes Rocha, Carlos André Zucco, Vitor Rademacher Martins e Carolina Ribas, pela apoio na obtenção das amostras, pois sem estas este trabalho não teria realizado

Ao Dr. Silvio Arruda Vasconcelos, por realizar os testes de SAM no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do departamento de medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da USP e a Dra. Ádina Cléa Botazzo Delben que deu o suporte ao inicio desta linha de pesquisa e fez o primeiro isolamento de leptospira em animal silvestre no Pantanal.

A todos os colegas do laboratório, que de uma forma ou de outra sem eles o laboratório não funcionaria, sem a cooperação de todos seria muito difícil a realização deste trabalho. E a todas as pessoas, que embora anônimas, participaram de alguma forma na construção desta dissertação, seja direta ou indiretamente. Tenham certeza de que foram muito importantes para mim e que jamais serão esquecidas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
dATP	2'-desoxinucleotídeo de Adenina-5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxinucleotídeo de Citocina-5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxinucleotídeo de Guanina-5'-trifosfato
DNA	Acidodesoxirribonucleico
dTTP	2'-desoxinucleotídeo de Citocina-5'-trifosfato
E.U.A	Estados Unidos da America
ELISA	Enzime linked immunoassay
Fg	Fentograma
IAGRO	Agência Estadual de Defesa Sanitária e Vegetal do Estado de Mato Grosso do Sul
Ig-G	Imunoglobulina G
Ig-M	Imunoglobulina M
LPS	Lipopolissacarideos
MG	Miligrama
µl	Microlitro
mL	Mililitro
µM	Milimolar
Mm	Milímetro
Ng	Nanograma
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OTUs	Unidades taxonômicas operacionais
P.A	Para Análise
PB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAM	Soroaglutinação Microscópica
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

Introdução		
Figura 1	Micrografia eletrônica de <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae	14
Artigo I		
Figura 1	Estirpes de leptospiros isoladas de animais segundo código de identificação, espécie animal de onde foi isolada, Instituição(ões) que participaram do isolamento, espécie, sorogrupo e sorovar identificados.	46
Figura 2	Sensibilidade analítica da PCR. Linha 1: Pb (marcado de pares de base 1Kb plus Invitrogen®), Linha 2 a 7: controle positivo em diluições variando de 10^{-1} – 10^{-7}	50
Figura 3	Filogenia de <i>Leptospira</i> spp. construída a partir do alinhamento de sequências parciais do gene <i>16S</i>	52
Artigo II		
Figura 1	Estirpes de leptospiros isoladas de animais segundo código de identificação, espécie animal de onde foi isolada, Instituição(ões) que participaram do isolamento, espécie,	63
Figura 2	Resultado da PCR em gel de agarose 1% para detecção de <i>Leptospira</i> spp. em mamíferos silvestres utilizando uma sequência parcial do gene <i>16S</i>	67
Figura 3	Resultado da PCR em gel de agarose 1% para a detecção de <i>Leptospira</i> spp das culturas de <i>Leptospira</i> em meio líquido, utilizadas na bateria SAM	69
Figura 4	Resultado da PCR em gel de agarose 1% da diluição seriada do DNA controle positivo até $1:10^{-7}$	69
Figura 5	Identidade no Blast N, sequência parcial do gene <i>16S</i> , do isolado de <i>C. thous</i> 21 com <i>L. interrogans</i> Copehnageni.	70
Figura 6	Identidade no Blast N, sequência parcial do gene <i>16S</i> , do isolado de <i>C. thous</i> 39 com <i>L. interrogans</i> Serjroe.	71
Figura 7	Filogenia de <i>Leptospira</i> SSP.	72

LISTA DE QUADROS

Introdução		
Quadro 1	Classificação de <i>Leptospira</i> spp. baseado em sorogrupos e sorovares	17
Quadro 2	Sorovares comuns de <i>Leptospira</i> e seus hospedeiros naturais e acidentais	18
Artigo I		
Quadro 1	Número de acesso no <i>GenBank</i> de <i>Leptospira</i> spp. Correspondente, utilizado para a construção da árvore filogenética para análise parcial do gene 16 S	49
Quadro 2	Número de animais examinados, porcentagem de reagentes no teste de SAM e positivos na PCR	50
Artigo II		
Quadro 1	Número de acesso no <i>GenBank</i> de <i>Leptospira</i> spp. Correspondente, utilizado para a construção da árvore filogenética para análise parcial do gene 16 S	66
Quadro 2	Número de animais utilizados em cada teste e porcentagem de animais positivos	67
Quadro 3	Reações aproveitadas e o percentual de variantes sorológicas mais prováveis no SAM	68

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	Identificação dos indivíduos da espécie <i>N. nasua</i> submetidos aos testes de PCR e SAM para <i>Leptospira spp</i> e os resultados encontrados	79
Apêndice B	Sorogrupo, sorovar mais provável das reações aproveitadas e titulação no teste de SAM para <i>Leptospira spp</i> em indivíduos da espécie <i>N. nasua</i>	80
Apêndice C	Sorogrupo, sorovar mais provável das reações aproveitadas e titulação no teste de SAM para <i>Leptospira spp</i> em indivíduos da espécie <i>C. thous</i>	80
Apêndice D	Identificação dos indivíduos da espécie <i>C. thous</i> que foram submetidos aos testes de PCR e SAM para <i>Leptospira spp</i> e os resultados encontrados	81
Apêndice E	Identificação dos indivíduos da espécie <i>T. panchyurus</i> que foram submetidos aos testes de PCR e SAM para <i>Leptospira spp</i> e os resultados encontrados	82
Apêndice F	Sorogrupo, sorovar mais provável das reações aproveitadas e titulação no teste de SAM dos <i>O. bezoarticus</i> .	82
Apêndice G	Identificação dos indivíduos da espécie <i>O. bezoarticus</i> que foram submetidos aos testes de PCR e SAM para <i>Leptospira spp.</i> e os resultado encontrados	83

RESUMO

Vieira A.S. Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres do Pantanal sul-mato-grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares. Brasil. 2009. 83p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

A leptospirose é uma zoonose que acomete tanto os animais domésticos, como silvestres e também o homem, implicando em grandes perdas econômicas para a produção de bovinos de corte e leite no Brasil sendo que no Pantanal brasileiro, as condições ecológicas são altamente favoráveis a manutenção dessa doença. Os objetivos deste trabalho foram detectar a presença de mamíferos silvestres infectados pela *Leptospira* spp. na sub região da Nhecolândia, no Pantanal sul-mato-grossense, identificando os principais sorovares circulantes e testar um ensaio da polimerase em cadeia para a detecção desse agente, estimando sua sensibilidade analítica. Foram coletadas amostras de sangue de 266 animais silvestres capturados as quais foram submetidas aos testes de soroaglutinação microscópica e ensaio da polimerase em cadeia. Os sorovares predominantes entre as espécies foram: Pomona e Butembo para *O. bezoarticus*; Hardjobovis para *C. thous*, Icterohaemorrhagiae para *L. pardalis* e *T. pachyrus* e Pomona para *N. nasua*. A frequência encontrada por meio da soroaglutinação microscópica (SAM) e do ensaio da polimerase em cadeia (PCR) foram, respectivamente, de 10,2% e 15,38% para *T. pachyrus*, 34,21% e 38,46% para *C. thous*, 34,09%, 28,12% para *N. nasua*, 5,9% e 2,4% para *O. bezoarticus* and 14,28% (SAM) para *L. pardalis*. Os resultados demonstram que a *Leptospira* spp. circula entre os animais silvestres dessa região e que as duas técnicas empregadas foram eficazes na detecção do agente causador da leptospirose nos animais silvestres.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, Animais Silvestres, Pantanal, PCR

ABSTRACT

Vieira A.S. Survey of *Leptospira* spp. in wildlife of Pantanal sul-mato-grossense, through serological and molecular techniques. Brazil. 2009. 83p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Leptospirosis is a zoonosis that affects domestic animals, as well as the wildlife, and as well men, resulting in great economic losses for the production of beef and dairy cattle in Brazil, specially and in the Brazilian Pantanal where the ecological conditions are highly favorable to the maintenance of this disease. The objectives of this study were to detect the presence of wild mammals infected with *Leptospira* spp. in the Nhumirim sub-region of southern Pantanal, identifying circulating serovars and to test a polymerase chain reaction assay for the detection of the agent, estimating its analytical sensitivity.

A total of 266 blood samples were collect from captured wildlife, and a microscopic soroagglutination and polymerase chain reaction assay were performed. The predominant serovars among the captured species were: Pomona and Butembo for *O. bezoarticus*; Hardjobovis for *C.thous*, Icterohaemorrhagiae for *L. pardalis* and *T. pachyrus* and Pomona for *N. nasua*. The frequency found by the microscopic soroagglutination (SAM) and polymerase chain reaction assay (PCR) were 10.2% and 15.38% for *T. pachyrus*, 34.21% and 38.46% for *C. thous*, 34.09% and 28.12% for *N. nasua*, 5.9% and 2.4% for *O. bezoarticus* and 14.28% (SAM) for *L. pardalis* . The results showed that *Leptospira* spp. circulates among wildlife of this region and that the two techniques, SAM and PCR, are effective in detecting the causative agent of leptospirosis in wildlife.

INDEX TERMS: Leptospirosis, Wildlife, Pantanal, PCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Leptospirose	14
2.1.2 Sorovares	16
2.2 Pantanal	18
2.3 Espécies	19
2.3.1 Mamíferos silvestres: Dieta e uso de habitat	20
2.4 Leptospirose no Pantanal	23
2.4.1 Leptospirose em bovinos no Pantanal	24
2.5 Diagnostico de <i>Leptospira</i> spp.	25
2.6 Árvore Filogenética	28
REFERÊNCIAS	28
ARTIGO I	41
INTRODUÇÃO	43
MATERIAIS E MÉTODOS	44
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS	54
ARTIGO II	57
INTRODUÇÃO	59
MATERIAIS E MÉTODOS	61
RESULTADOS	67
DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE	79

INTRODUÇÃO

Atualmente, a preocupação com a transmissão de doenças entre animais domésticos e silvestres se tornou freqüente entre a comunidade conservacionista, devido ao impacto que a introdução e a transmissão de doenças podem causar nas populações de vida selvagem. Por outro lado, o valor econômico, a importância epidemiológica e a conservação das espécies da fauna nativa tem sido constantemente ignorados pelo agronegócio e, muitas vezes, subestimados pelas autoridades sanitárias. Dentre os fatores mais importantes na transmissão de doenças de animais domésticos e silvestres estão à expansão agrícola, conflitos regionais, instabilidade política e translocação de animais (BENGIS et al., 2002).

O relatório da 67ª Sessão do Grupo de Trabalho sobre doenças da vida selvagem da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) apontou que a vigilância em saúde nas populações selvagens é um assunto que vem ganhando cada vez maior importância, podendo vir a interferir como barreira não tarifária para o comércio internacional de commodities. A presença ou ausência de uma infecção nestas populações não pode ser declarada como presente ou ausente, por um país ou região a menos que corroborada por uma adequada amostragem e análise estatística que gere resultados confiáveis e irrefutáveis e nesse caso, a noção de ausência de evidências é mais importante que a evidência da ausência, sendo a mesma tão relevante para populações selvagens como para os animais de produção. Doenças que acometem as populações de animais silvestres na maioria das vezes só podem ser controladas nas espécies domésticas, geralmente pela imunização de animais susceptíveis, beneficiando também as populações silvestres, por interferirem em seu ciclo de transmissão.

A leptospirose é uma enfermidade de distribuição cosmopolita, sendo uma das mais importantes doenças causadoras de perdas reprodutivas nos animais domésticos e, ao mesmo tempo importante zoonose, de morbidade já bem conhecida (BARR e ANDERSON, 1993).

A transmissão de *Leptospira* spp. pode ocorrer de três maneiras: direta, indireta e acidental. A direta ocorre pelo contato do indivíduo susceptível, com urina infectada, descarga uterina pós-aborto e fluídos placentários, contato sexual e por via transplacentária, sendo esta a principal forma de manutenção da leptospirose dentro de um rebanho (ELLIS, 1994). A forma indireta ocorre pela exposição do animal a um ambiente contaminado ou por inseminação

artificial, e a forma acidental ocorre quando outras espécies domésticas ou silvestres que servem de reservatórios transmitem o agente, de forma indireta, aos animais de produção (ALT e BOLIN, 1996).

O diagnóstico da infecção pela *Leptospira* spp. é realizado principalmente pela detecção de anticorpos por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) e isolamento do agente em meio de cultura. Esse último é um método muito demorado e sem muito sucesso, pois a bactéria é muito fastidiosa. Ultimamente, tem sido relatados vários trabalhos utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico de leptospirose em humanos e animais domésticos, por ser mais sensível e apresentar um resultado mais rápido, permitindo uma imediata tomada de decisão (GERRISTSEN et al.,1991; REDSTONE e WOODWARD,1996;VAN EYS et al.,1989).

Na atualidade, está bem estabelecido que países que conduzem vigilância e monitoramento de doenças e agentes em populações silvestres e ferais tem maiores condições de compreender e, portanto interferir, na cadeia epidemiologia de doenças infecciosas e zoonoses específicas dentro de seus territórios, estando melhor embasados para intervenções que protejam simultaneamente a biodiversidade, os rebanhos de produção e as populações humanas. Neste contexto, este trabalho é importante pelo fato da região do Pantanal ser ocupada por propriedades rurais, que adotam praticas extensivas para a pecuária de corte, onde bovinos e animais silvestres convivem de forma simpátrica. Dessa forma, o conhecimento dos principais agentes que circulam entre as diferentes populações é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle das doenças, que possam afetar simultaneamente a produtividade dos rebanhos domésticos e a conservação das espécies da fauna pantaneira.

Os objetivos deste trabalho foram detectar a presença de mamíferos silvestres infectados pela *Leptospira* spp. na região do Pantanal, identificando os principais sorovares circulantes e testar um ensaio da polimerase em cadeia para a detecção desse agente, estimando sua sensibilidade analítica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial, exceto regiões polares, sendo particularmente prevalente em países de clima tropical a subtropical, principalmente nos períodos de altos níveis pluviométricos (RADOSTITS et al., 2000).

Animais de várias espécies, tanto silvestres como domésticos, podem se tornar portadores dessa espiroqueta que se localiza preferencialmente nos túbulos renais, contribuindo para a disseminação deste microorganismo na natureza, através da eliminação pela urina (LEVETT, 2001). A eliminação de *Leptospira* spp., pela urina dos portadores, pode variar de poucas semanas a vários meses, entre os animais domésticos e a vida toda pelos roedores (WEBSTER et al., 1995).

A leptospirose é uma zoonose causada por uma bactéria gran negativa, espiralada, flexível, móvel, delgada e de tamanho 0,1 a 0,2µm de largura por 6 a 20 µm de comprimento (Fig. 1) e composta de um cilindro protoplasmático que se enrola ao redor de um filamento axial central. O envelope externo é composto por lipopolissacarídeos (LPS) e mucopeptídeos antigênicos (FAINE et al., 1999).

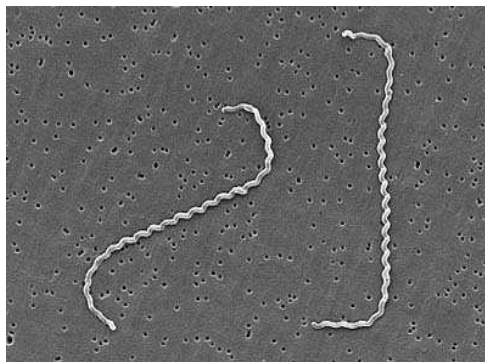


Figura 1 - Micrografia eletrônica de *Leptospira interrogans* sorovar *Icterohaemorrhagiae* (LEVETTI, 2001).

As bactérias do gênero *Leptospira* se desenvolvem em pH próximo da neutralidade, 7,2 – 7,4 em condições quentes e úmidas. É sensível a luz solar direta, pH ácido e as temperaturas

inferiores a 7°C ou superiores a 37°C, aos desinfetantes comuns e antissépticos (LEMOS e ALMEIDA, 2005).

Os reservatórios são os animais sinantrópicos, domésticos e silvestres, sendo estes essenciais para a persistência dos focos da infecção. Os seres humanos são hospedeiros acidentais terminais dentro da cadeia de transmissão (BRASIL, 2005).

É uma zoonose de alta importância, pois acarreta vários prejuízos, não só em saúde pública, devido à alta incidência de casos humanos, como também econômicos, em virtude dos altos custos hospitalares dos pacientes, da perda de dias de trabalho e das alterações na esfera reprodutiva dos animais infectados (BRASIL, 2005).

No Brasil, durante o período de 1985 a 1997, foram notificados 35.403 casos humanos infectados, variando de 1.594 casos anuais (1987) a 5.576 (1997) e 3.821 óbitos, variando de 215 (1993) a 404 (1988). A letalidade da doença, no mesmo período variou de 6,5% em 1996, a 20,7% em 1987, uma média de 12,5% ao ano, dependendo dentre outros fatores, do sorovar infectante, da gravidade, da forma clínica, da precocidade do diagnóstico, do tratamento e da faixa etária do paciente (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2009).

A leptospirose em humanos pode variar desde uma infecção subclínica, apresentando febre normalmente bifásica, cefaléia, mialgia, vômitos, dores abdominais e diarreia até desenvolver uma forma icterica, sendo esta mais severa (FAINE et al., 1999; GEBRIEL, 2006).

Em bovinos, a doença afeta o trato reprodutivo, causando sequelas crônicas, como aborto, nascimento de filhotes debilitados, partos prematuros, retenção de placenta e metrites, infertilidade, inclusive de touros, e esterilidade (ELLIS, 1994; LEMOS e ALMEIDA, 2005). Outro sintoma importante em bovinos é a agalaxia, caracterizada pela redução na produção de leite conhecida pela síndrome da queda da produção de leite (ELLIS, 1983).

Nos suínos, a leptospirose se caracteriza por aborto no terço final de gestação, repetição de cio, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de leitões fracos, baixo número de leitões, descarga vulvar e morte embrionária (ELLIS, 1989). Sinais clínicos como anorexia, perturbação de equilíbrio, hemoglobinúria, convulsões, transtornos gastrointestinais, paralisia progressiva, queda de produção de leite e perda de peso também são observados em suínos domésticos (FAINE et al., 1999).

Em equinos, normalmente apresenta febre, acompanhada de anorexia, icterícia nefrite e complicações oculares. Em sua forma subclínica ela pode determinar casos de aborto, nascimento de animais prematuros e debilitados (FAINE et al., 1999; HONG et al., 1993).

Em artiodactilos e perissodactilos silvestres portadores da *Leptospira spp* foram relatados quadros clínicos caracterizados por aborto, nascimento de filhotes debilitados e baixos índices de fertilidade, sendo que em perissodactilos também foram observados transtornos oculares (MIRANDA, 2008).

2.1.2 Sorovares

O gênero *Leptospira* compreende bactérias morfologicamente similares, mas antígenicamente distintas quanto testadas por meio de soroaaglutinação microscópica, sendo dessa forma, classificadas em diferentes sorovares (Quadro 1). Segundo a classificação taxonômica clássica, com base em sorogrupos, sorovares e na patogenicidade, este gênero pode ser dividido em dois grandes grupos: *Leptospira interrogans* (patogênica) e *L. biflexa* (saprófita), resultando em 23 sorogrupos constituídos por cerca de 250 sorovares de *Leptospiras* patogênicas (FAINE et al., 1999).

Em 1987, foi proposta uma nova classificação baseada na hibridização por homologia do DNA. O gênero *Leptospira* foi reclassificado, segundo características genotípicas, em oito genomoespécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. santarosai* e *L. weilii*. As leptospiras saprófitas ou de vida livre estão representadas por três genomoespécies: *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii* (KMETY e DIKKEN, 1993).

Com a identificação genética, o gênero *Leptospira* passou a ser classificado em 16 novas espécies, com isso sorovares antígenicamente relacionados, ou mesmo subtipos do mesmo sorovar, podem pertencer a diferentes espécies. Por exemplo, subtipos antígenicamente indistinguíveis do sorovar Hardjo (*Hardjobovis* e *Hardjoprajitno*) são classificados em *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*, respectivamente (LEVETTE, 2001).

Cada sorovar de *Leptospira* tem um hospedeiro natural, que atua como reservatório do agente e hospedeiros acidentais, que podem sofrer com infecções esporádicas (Quadro 2).

Quadro 1 - Classificação de *Leptospira* spp. baseado em sorogrupos e sorovares

Sorogrupo	Sorovar
Australis	Australis
	Bratislava
Autumnalis	Autumnalis
	Butembo
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Icterohaemorrhagiae
Ballum	Castellonis
Bataviae	Bataviae
Canicola	Canicola
Celledoni	Whitcombi
Cynopteri	Cynopteri
Grippotyphosa	Grippotyphosa
Hebdomadis	Hebdomadis
Javanica	Javanica
Panama	Panamá
Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes
Shermani	Shermani
Tarassovi	Tarassovi
Sejroe	Hardjobovis
	Hardjoprajitno
	Wolffi
Semaranga	Patoc
Djasiman	Sentot

Fonte: adaptado de FAINE et al., 1999.

Os bovinos são infectados pelos sorovares Hardjo, Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, sendo que o sorovar Hardjo é o mais adaptado a espécie bovina (COSTA et al., 1998; ELLIS et al., 1994). Uma vez introduzido em um rebanho, este sorovar estabelece níveis variáveis de infecção, podendo persistir por longos períodos (HATHAWAY et al., 1986), sendo independente da estação climática ou do sistema de produção adotado na propriedade (ELLIS, 1994).

Quadro 2 - Sorovares comuns de *Leptospira* e seus hospedeiros naturais e acidentais

Sorovares	Hospedeiro natural		Hospedeiro acidental
	Nome científico	Nome vulgar	
Hardjo	Bovidae	Bovinos	ovinos e homem
Bratislava	Suidae e Equidae	suínos e eqüinos	
Pomona	Suidae, Mephitidae, Procyonidae e Didelphidae	suínos, doninha-fedorenta, mão-pelada e gambás	ovinos e bovinos
Autumnalis	Muridae	Rato	cães, homem
Grippotyphosa	Procyonidae, Didelphidae e Sciuridae	mão-pelada, gambá e esquilo	ovinos e bovinos
Icterohaemorrhagiae	Muridae	rato-pardo	bovinos e suínos

Fonte: Adaptado de FIGUEREDO, 2007.

Leptospira interrogans sorovar Pomona tem como hospedeiro natural o suíno, que é responsável por ocorrências epidêmicas no homem e em outras espécies domesticas (RENDE et al., 2007). O sorovar Pomona está relacionado com problemas reprodutivos em suínos, assim como os sorovares Bratislava, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Autumnalis, sendo que o sorovar Wolffi causa anemia hemolítica grave (RENDE et al., 2007).

Leptospira interrogans sorovar Australis tem sido detectada em equínos de tração animal, porém estes animais não apresentam sintomatologia clínica (MACIEL et. al., 2008; PINHO et al., 2007).

A introdução do sorovar Copenhageni na bateria de antígenos tem mostrado alta frequência de reação em cães, animais de produção, silvestres e no homem (RODRIGUES, 2008). Seus hospedeiros naturais são *Rattus norvegicus* ou *Rattus rattus* (WHO/FAO/OIE 2008). No homem a forma pulmonar causada por este sorovar se caracteriza por hemorragias intersticiais e alveolares, podendo esse desenvolver a doença clássica de Weil.

2.2 Pantanal

O Pantanal é uma imensa planície sedimentar com área de 138.183 Km², abrangendo os estados de Mato Grosso (35,36%) e Mato Grosso do Sul (64,64%). A região é sujeita a inundações periódicas que regulam todo o ecossistema, com implicações sobre os sistemas biológicos e sócio-econômicos. Está subdividido em 11 sub-regiões, de acordo com suas

características hidrológicas, fitofisionômicas e edáficas, sendo as maiores o Paiaguás (19,6%) e a Nhecolândia (19,48%), situadas no Mato Grosso do Sul e Barão de Melgaço (13,15%) e Poconé (11,63%) situadas no Mato Grosso (SILVA et al., 1995).

O clima é do tipo quente e chuvoso no verão e ameno e seco no inverno (CADAVID GARCIA, 1984). A precipitação anual se encontra na ordem de 1.000 á 1.400 mm, concentrada entre os meses de dezembro a março. Os solos são na maioria hidromórficos (92%), com textura arenosa (65%), destacando-se as Areias Quartzosas. A fertilidade é baixa em 72% dos solos. As águas são o principal fator que regula a distribuição da vegetação, criando paisagens peculiares a essa região (AMARAL, 1987).

O Pantanal é um ecossistema de grande biodiversidade, onde se encontra umas das maiores concentrações de fauna selvagem do planeta, com uma biodiversidade de 3.500 espécies de plantas, 652 espécies de aves, 177 espécies de répteis, 40 espécies de anfíbios, 102 espécies de mamíferos, 264 espécies de peixes (LOURIVAL et al., 2000). Um dos aspectos interessantes ocorrência de alta densidade de muitas espécies de grandes vertebrados brasileiros, não encontrados em nenhum outro lugar do continente.

2.3 Espécies

Apesar de inúmeros inventários realizados no Pantanal, a sua fauna de mamíferos ainda é pouco conhecida, principalmente ao que se refere aos mamíferos de pequeno porte, como roedores, marsupiais e morcegos, porém mesmo entre animais de maior porte a ocorrência ou distribuição de algumas espécies ainda é incerta (RODRIGUES et al., 2002). As informações tem se tornado disponíveis sob forma de levantamentos e mapeamentos populacionais em grande escala para algumas espécies de mamíferos silvestres como para o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), cervo-do-pantanal, (*Blastoceros dichotomus*), capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (MIRANDA, 2008; MOURÃO et al., 2000).

O Pantanal abriga algumas espécies em densidades superiores ao do cerrado (MOURÃO et al., 2000; TOMÁS et al., 2001) e o monitoramento em longo prazo dessas populações tem sido importante para identificar tendências de alterações no número de indivíduos, e com isso traçar estratégias para a conservação da fauna do Pantanal (RODRIGUES et al., 2002).

A crescente preocupação mundial com a conservação do ambiente natural tem destacado o Pantanal como a única região do mundo, explorada economicamente, sem alterações ambientais importantes e irreversíveis na sua fauna silvestre rica e abundante.

Pelo fato da região ser explorada por meio de um sistema extensivo de pecuária de corte há quase dois séculos é necessário um estudo do efeito da introdução de doenças pelos animais domésticos, bem como do papel dos animais silvestres como reservatórios de doenças que possam ser transmitidas para os rebanhos bovinos. Nesse sentido, são de particular interesse a brucelose, leptospirose, a febre aftosa, as babesioses e helmintoses em cervídeos; a tripanossomíase nas capivaras e a leishmaniose em canídeos selvagens (CATTO, 2000).

2.3.1 Mamíferos silvestres: Dieta e uso de habitat

Os tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) utilizam uma grande variedade de habitat, como florestas úmidas, cerrados, pantanais e mata decídua. No Brasil, a espécie ocorre em todos os biomas desde Amazônia até os campos sulinos (FONSECA et al., 1996), limitando-se as regiões tropicais e subtropicais da América.

Apesar de ampla distribuição, em todo território nacional, são poucas as áreas onde se consegue observar tamanduás-bandeira com frequência. Dados de levantamentos aéreos no Pantanal indicam que os tamanduás-bandeira foram avistados sempre em baixa densidade (0,035 indivíduos/Km²) tendo sido estimado um índice de abundância de 5.000 espécimes (RODRIGUEZ et al., 2002). Eles se alimentam quase que exclusivamente de formigas e cupins e sua estratégia alimentar baseia-se em vários períodos muito breves; supondo-se que estes animais não esgotem os cupinzeiros e formigueiros (MIRANDA, 2008).

O tatu peba (*Euphactus sexcinctus*) utiliza uma grande variedade de habitats, como formações abertas e bordas de florestas. No Brasil ocorre em todos os biomas (FONSECA et al., 1996). Sua alimentação é onívora, com uma grande variedade itens, incluindo desde material vegetal, invertebrados, carniças até pequenos vertebrados como anuros, serpentes, aves e roedores. No Pantanal da Nhecolândia ele é o maior predador dos ninhos de ema (MEDRI, 2008). Possui uma visão pobre, porém um olfato bem desenvolvido para localizar os alimentos e perceber os predadores (WETZEL, 1985). Eles possuem hábitos solitários com exceção da época de acasalamento e das fêmeas com seus filhotes (MEDRI, 2008).

O cachorro-do-mato ou lobinho (*Cerdocyon thous*) é um canídeo de médio porte pesando entre quatro a seis quilos de hábitos predominantemente noturnos. Esta espécie tem uma dieta onívora sendo os principais itens consumidos na estação seca os pequenos mamíferos (roedores murídeos) e alguns reptéis, e na estação chuvosa frutos e insetos (SANTOS-JUNIOR e MACEDO, 2007). A espécie se distribui pela Colômbia, Venezuela, Brasil (nordeste, centro-oeste, sudeste e sul), Paraguai, Uruguai e norte da Argentina; no Brasil, podendo ser encontrado em ambientes abertos, naturais ou alterados (JUAREZ e MARINHO-FILHO, 2002; FACURE e GIARETA, 1996). Dentre os mamíferos da fauna pantaneira, o *C. thous* é um dos mais frequentemente observados no campo, sendo conhecido como cachorro do mato, raposa, lobinho, lobete e graxaim do mato (SILVA et al., 2004).

O quati (*Nasua nasua*) pertence ao filo chordata, a Classe Mammalia, a ordem carnívora e a Família Procyonidae (QUEIROZ et al., 2008). A espécie se distribui desde o sul da Colômbia até o norte da Argentina e Uruguai, exceto na planície venezuelana, se restringindo a América do Sul (BISBAL, 1986). São animais onívoros e oportunistas e o tamanho das áreas de uso pode ser influenciado pela variação no percentual de carne, frutos e insetos ingeridos (BISBAL, 1986; JUAREZ e MARINHO-FILHO, 2002; GOMPPER, 1995). As fêmeas vivem em bando e os machos isolados, se aproximando na época de reprodução (GOMPPER, 1995).

A onça pintada (*Panthera onca*) é o maior felino das Américas, e encontra-se na lista de animais ameaçados de extinção da União Internacional para a Conservação da Natureza (MORATO et al., 1998). Sua distribuição estendia-se antes da destruição da maior parte de seu habitat do Arizona, passando pela Califórnia e Novo México nos Estados Unidos, até o Rio Negro na Argentina. Atualmente, esta espécie, pode ser considerada praticamente extinta na América do Norte, terras baixas do México, El Salvador, Uruguai e regiões desenvolvidas do Brasil (LEITE, 2000; MORATO et al., 1998). Predador de topo de cadeia, sua alimentação inclui o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), queixadas (*Tayassu pecari*) e caititus (*Tayassu tajacu*), antas (*Tapirus terrestris*), lontras (*Lontra longicaudis*), macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*) e jabutis (*Geochelone* sp.), além de presas domésticas, como cães e os bovinos (SCHALLER e VASCONCELOS, 1978).

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é um felino de médio porte, pesando entre 11 a 16 kg, sendo considerado o maior dos pequenos gatos pintados do continente americano (MURRAY e

GARDNER, 1997). Esta espécie é encontrada apenas no continente americano, ocorrendo desde o sul dos EUA (Texas) até o norte da Argentina, porém não habita altitudes maiores que 1200m. Não existem registros desta espécie nas áreas altas do Peru ou em qualquer lugar do Chile (MURRAY e GARDNER, 1997). No Brasil, ocorre em todas as regiões, à exceção do sul do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA e CASSARO, 1999). Essa espécie ocorre em uma diversidade de habitats, florestas tropicais úmidas, florestas semidecíduas, áreas alagadas e matas ciliares.

As jaguatiricas são animais carnívoros que, embora estejam aptas a caçar em árvores, estudos de sua dieta indicam que elas são caçadoras mais eficientes no chão. Alimentam-se de uma variedade de presas como aves, serpentes, lagartos, peixes e até caranguejos, porém, suas principais presas são mamíferos de pequeno porte (até 1 kg), especialmente pequenos roedores silvestres de hábitos noturnos (CONCONE et al., 2005).

Os roedores do gênero *Trichomys* (rato do campo) pertencem à família Echimyidae e são encontrados no cerrado, caatinga e pantanal brasileiros (ROQUE et al., 2005). Este gênero foi considerado monoespecífico durante muito tempo, apesar dos inúmeros trabalhos mostrando diferenças morfométricas e cromossômicas entre populações geograficamente distintas. Apenas a partir da análise em conjunto de dados moleculares, cariotípicos e de distribuição geográfica foi possível concluir que o gênero *Trichomys* possui pelo menos cinco espécies crípticas, geograficamente separadas (ROQUE et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

O *Trichomys pachyurus* se localiza na parte oeste do Brasil, no Mato Grosso do Sul e norte de São Paulo. No cerrado são encontrados em áreas abertas com extrato herbáceo, arvoredos de cerrado fechado e em matas invadidas por pastagens, enquanto no Pantanal são encontrados em pequenas cordilheiras e regiões de gramíneas e pastagens (ROQUE et al., 2005).

O gênero *Oecomys* (rato do campo) apresenta roedores de hábitos noturnos e solitários, alimentando-se de frutas e sementes verdes. Estes roedores utilizam todos os níveis da floresta inclusive o solo. Estas espécies estão distribuídas pelas florestas tropicais e subtropicais da América do Sul (MIRANDA, 2007).

Os cervídeos pertencem à Ordem Artiodactyla, família Cervidae, e estão mundialmente dispersos. No Brasil, os cervídeos são encontrados em vários biomas como o Cerrado, Pantanal e Chaco (RODRIGUES et al., 2002). No Pantanal sul-mato-grossense encontramos quatro

espécies de cervídeos: *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-Pantanal), *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro), *Mazama americana* (veado-mateiro) e *Mazana gouazopira* (veado-catingueiro), sendo que cada uma tem um habitat preferencial.

As populações de *O. bezoarticus* estão localizadas principalmente na região central do Pantanal, na região da Nhecolândia e Paiaguás, com maior número de animais em áreas de campos e vazantes, estimando-se uma densidade de 0.57 grupos/Km (MOURÃO et al., 2000 e TOMÁS et al., 2001). Esta espécie de cervídeo tem maior densidade na região do Pantanal, quando comparada a região de cerrado brasileira (RODRIGUES et al., 2002). Eles alimentam-se principalmente de gramíneas, mas também ingerem ervas, arbustos e até flores. O período de atividade de pastoreio do veado-campeiro pode ser tanto diurno quanto noturno, com variação individual no ritmo de atividade (ZUCCO, 2007).

Originalmente, os veados-campeiros tinham uma ampla distribuição geográfica na América do Sul, abrangendo todos os ambientes abertos: savanas, campos e os pampas. Atualmente a espécie está restrita a populações isoladas na Argentina, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Brasil (TOMÁS et al., 2001). As populações da espécie estão diminuindo devido a vários fatores como a alteração do hábitat, introdução de animais domésticos e fauna exótica e à caça, embora ainda seja relativamente abundante no Pantanal (DEMARÍA et al., 2004; ZUCCO, 2007).

2.4 Leptospirose no Pantanal

No Pantanal, as condições ecológicas são altamente favoráveis a ocorrência de leptospirose bovina, uma vez que o agente sobrevive mais tempo em áreas alagadas e de temperaturas elevadas (LINS et al., 1986).

Alguns trabalhos com leptospirose em animais silvestres vem sendo desenvolvidos nas Américas mas no Brasil a enfermidade é pouco estudada em espécies silvestres, deixando uma possível lacuna no estudo da cadeia epidemiológica, o que dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle dessa doença em regiões ecologicamente favoráveis e com grande densidade de animais silvestres (GIRIO et al. 2003).

Segundo VASCONCELLOS et al., (1997) e FIGUEREDO (2007), o sorovar predominante no Estado de Mato Grosso do Sul em bovinos é o Hardjo. MATHIAS et al., (1999)

encontraram *O. bezoarticus* reagentes para Hardjo, Wolffi e Mini. GIRIO et al., (2003) verificaram em cinco espécies silvestres a presença de *Leptospira*, sendo os sorovares mais frequentes Pomona (búfalo e ovino), Wolffi (boi baguá), Icterohaemorrhagiae (ovino, veado-campeiro e suínos) e Copenhageni (veado-campeiro e suíno).

PAES et al., (2008) examinaram 75 amostras de soro de *S. scrofa* feral (porco monteiro) por meio de SAM, detectando 9,3% de amostras reagentes para *Leptospira* spp., sendo mais frequentes os sorovares Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Shermani e Patoc.

No Pantanal de Mato Grosso, MIRANDA (2008) encontrou três de seis *M. tridactyla* (tamanduá-bandeira), positivos para *Leptospira* spp., sendo que os sorovares mais prováveis foram Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bataviae e Shermani.

2.4.1 Leptospirose em bovinos no Pantanal

Nos animais de produção, a maior importância da leptospirose é de ordem econômica, por influenciar o potencial reprodutivo do rebanho. Nos bovinos, especificamente, as perdas econômicas causadas pela leptospirose estão direta ou indiretamente relacionadas às falhas reprodutivas como a infertilidade, o abortamento e à queda da produção de carne e leite, além de custos com despesas de assistência veterinária, vacinas e testes laboratoriais (FAINE et al., 1999; VASCONCELLOS, 1993).

Entre os sorovares incidentais mais frequentes destacam-se Icterohaemorrhagiae, Pomona e Canicola, causando sintomas clínicos graves como icterícia, hemorragias e morte, devido a sua elevada patogenicidade. Em fêmeas prenhes o abortamento ocorre em grande número de animais do rebanho afetado.

Em 1992 foi realizado um levantamento em propriedades localizadas na região da Nhecolândia, onde foi encontrado um percentual de 47% em matrizes e 61% em touros soro reagentes para *Leptospira* spp., com maior número de reações para os sorovares Hardjo e Wolffi (PELLEGRIN et al., 1992). Posteriormente, em 1999, outro trabalho foi realizado, mostrando que a prevalência do sorovar Hardjo foi de 38,88% e a frequência de animais reagentes nas propriedades estudadas variou de 10 a 84%. Os sorovares mais frequentes foram Hardjo, Wolffi e Sejroe, todos pertencentes ao sorogrupo Sejroe e os sorovares mais prevalentes de outros

sorogrupos foram: Tarassovi, Mini, Bratislava, Bataviae e Hebdomadis (PELLEGRIN et al., 1999).

No Pantanal a estrutura fundiária é dependente do regime hidrológico, portanto, quanto maior a região alagada de uma fazenda esta precisa de uma maior área de produção, se não está propriedade não se torna economicamente viável. PELLEGRIN et al., (1999), mostra a relação entre tamanho de propriedade e frequência de animais reagentes para *Leptospira* spp.

2.5 Diagnóstico de *Leptospira* spp.

A leptospirose pode ser muitas vezes assintomática, porém quando ocorrem manifestações clínicas em humanos ela pode ser confundida com o vírus da influenza, dengue e meningite, o que dificulta o seu diagnóstico clínico. Com os animais domésticos ocorre o mesmo problema, pois os sinais não são patognômicos (FAINE et al., 1999). Em bovinos, a síndrome hemolítica deve ser diferenciada da anaplasmose e babesiose, como de outros agentes que causam anemia hemolítica. Causas de aborto, natimortos e/ou infertilidade incluem brucelose, campilobacteriose, clamidioses e tricomonoses e devem também ser consideradas para diagnóstico clínico diferencial (HUNTER, 2005).

Em vista da dificuldade do diagnóstico clínico, é necessário utilizar um diagnóstico laboratorial. O Ministério da Saúde preconiza os seguintes exames laboratoriais: isolamento, soroaglutinação microscópica (SAM), ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para IgM e macroaglutinação, dependendo da fase evolutiva em que o paciente se encontra (BRASIL, 2005).

Devido à dificuldade de isolamento do agente, o principal método de diagnóstico da leptospirose é a pesquisa de anticorpos, podendo ser empregados testes sorogrupo-específicos, que compreendem as provas de soroaglutinação microscópica (SAM) e suas variações em relação ao tipo de antígeno empregado, vivo ou inativado (LEMOS e ALMEIDA, 2005).

Na fase aguda ou septicêmica, durante o período febril podemos visualizar leptospiros no sangue, através do exame direto, de cultura de meios apropriados ou a partir de inoculação em animais de laboratórios.

A dificuldade de isolar o agente da leptospirose através de amostras clínicas e fluídos corpóreos tem sido reportada em vários estudos (HARKIN et al., 2003). O cultivo de *Leptospiras* para isolamento é usado apenas para confirmação diagnóstica, uma vez que demora cerca de 10

semanas para ser conclusivo, o que garante apenas um diagnóstico retrospectivo (BRASIL, 2005).

Os meios utilizados para cultivo e isolamento são meios enriquecidos com soro de coelho ou albumina sérica bovina (BSA), além de meios livres de proteínas. Meios líquidos são convertidos em semi-sólido pela incorporação de 0,2% de agar e para forma sólida com a adição de 1% de agar. O meio semi-sólido é mais utilizado para isolamento de estirpes e manutenção de culturas de estoque. Nesse meio, o crescimento é visualizado pela formação de um ou mais anéis de crescimento (anel de Dinger). A ausência de anéis não significa necessariamente ausência de *Leptospiras*. O meio sólido é utilizado para clonar estirpes e para isolar *Leptospiras* de fontes contaminadas (FAINE, 1982).

Em laboratório, a temperatura ótima para o crescimento de saprófitas e patogênicas é de 28 - 30°C. O pH ótimo para crescimento é de 7,2 - 7,6; sendo que condições alcalinas são melhores toleradas que condições ácidas. Condições aeróbias são essenciais, por serem as *Leptospiras* aeróbias obrigatórias, e o crescimento é melhorado por agitação ou aumento da área de superfície (FAINE et al., 1999).

A microscopia de campo escuro consiste na observação da motilidade típica do gênero em amostras clínicas (sangue, líquido cérebro espinhal, urina e fluido peritoneal), através do microscópio de campo escuro. Trata-se de um método simples, mas que pode resultar em falso negativo quando há poucas bactérias na amostra. Quando correlacionado com parâmetros clínicos pode ajudar no diagnóstico precoce da leptospirose, porém não deve ser usado isoladamente (SAMBASIVA et al., 2003).

O ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática) para detecção de anticorpos anti-leptospira é muito sensível mas pouco específico para o diagnóstico do sorovar. Permite a detecção da doença a partir da 1ª semana até um a dois meses após infecção (BRASIL, 2005).

Os anticorpos Ig-M são detectados após a primeira semana de infecção, e os IgG após o início da segunda semana pós-infecção e persistem por longos períodos de tempo. Portanto, animais com leptospirose aguda têm altos títulos de IgM e IgG relativamente baixos. E animais vacinados ou que tiveram infecções anteriores tem altos títulos de IgG. Em bovinos, o principal papel do ELISA seria a identificação de Ig-M para identificação de infecções recentes e para o

rastreamento de rebanhos em regiões onde a vacinação para leptospirose não é praticada (OIE, 2006).

A prova de soroaglutinação microscópica (SAM) é realizada com a utilização de antígenos vivos sendo a técnica considerada pela Organização Mundial de Saúde como “padrão-ouro” para a confirmação do diagnóstico da leptospirose. Além de detectar anticorpos específicos esta técnica é utilizada na identificação e classificação dos sorovares isolados. Os anticorpos podem ser revelados pela aglutinação com soro coletado entre o 8^o e 10^o dia após o início do estado de leptospiremia e alcançam título máximo ao redor de um mês. Títulos entre 100 e 1600, ou mais, são comuns em animais infectados (BRASIL, 2005).

O teste de macroaglutinação é utilizado para triagem em humanos, realizado em soro de pacientes com sintomas clínicos da doença. Detecta anticorpo da classe IgM, sendo que o período ideal da coleta sanguínea é a partir do 7^o dia de início dos sintomas.

O ensaio da polimerase em cadeia (PCR) é um método de detecção da presença do patógeno, direto, rápido, sensível e específico. Este pode ser utilizado diretamente em amostras clínicas como soro, urina, humor aquoso (BALL et al., 1994; MÉRIEN et al., 1992). A PCR tem sido utilizada para diferenciar sequências de bases de DNA revelando diferenças entre *Leptospiras* do mesmo grupo e/ou mesmo sorovares (BOLIN e ALT 1999). Está técnica tem sido utilizada em humanos e animais domésticos, porém não tem seu uso difundido no diagnóstico da doença entre os animais silvestres.

A técnica consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma enzima que pode ser a DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos sintéticos, complementares as extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. Estes oligonucleotídeos, denominado “iniciadores”, funcionam como fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3’ de cada oligonucleotídeo. Cada ciclo de PCR envolve várias etapas: a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92° C a 95°C; anelamento dos oligonucleotídeos por redução de temperatura até o ponto ideal para a formação das pontes de hidrogênio entre cada par de oligonucleotídeo e a fita molde; e extensão da síntese da nova fita de DNA. Uma vez que a replicação do DNA é semiconservativa, ou seja, a DNA polimerase utiliza um molde de fita simples de DNA para sintetizar uma fita complementar, sem o qual a

adição de nucleotídeos é interrompida, as fitas recém-sintetizadas passam a funcionar como molde para o próximo ciclo. Ao final de vários ciclos obtém-se acúmulo exponencial de cópias de região delimitadas pelos oligonucleotídeos (REGITANO e COUTINHO, 2001).

2.6 Árvore Filogenética

O conceito de filogenia surgiu com Darwin, junto com o próprio conceito de ancestrabilidade entre espécies. Assim, as filogenias nada mais são que as indicações das relações de ancestrabilidade supostas para um conjunto de espécies.

A árvore filogenética representa a história evolutiva dos organismos presentes nela, consistindo graficamente de pontos ou nós ligados por linhas (ou ramos), os organismos são denominados táxon, que podem ser famílias, gênero, espécie ou populações. Com frequência são chamados de unidades taxonômicas operacionais ou simplesmente OTUs (MATIOLI, 2001).

A árvore filogenética tem dois tipos de nós, os internos e os terminais. Os nós terminais representam as OTUs estudadas, unidas por ramos cujo nó interno representa o ancestral comum mais recente deste táxon (MATIOLI, 2001).

A árvore filogenética pode ser enraizada, quando possui um ancestral em comum e não enraizada quando não aponta onde está a espécie ancestral de todo o grupo (a raiz da filogenia). Existem vários métodos para se reconstruir uma árvore filogenética como métodos baseados em distância, máxima parcimônia, máxima verossemelhaça, entre outros como métodos geométricos e probabilísticos (MATIOLI, 2001).

REFERÊNCIAS

ALT, D. P.; BOLIN, C. A. **Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar pomona infection in hamsters and swine.** Am. J. Vet. Res. 57(1): 59-62. 1996.

ADÁMOLI, J. Vegetação do Pantanal. In: ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: EMBRAPA CENARGEN. 339 p.il.(EMBRAPA CENARGEN, Documentos, 8). 1987.

AMARAL, J. A. M. Solos do Pantanal In: ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M.**Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: EMBRAPA CENARGEN. 339 p.il. (EMBRAPA CENARGEN, Documentos, 8). 1987.

BALL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. **Detection of Leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis**. J Clin Microbiol 32: 1894-1898. 1994.

BARR, B. C.; ANDERSON, M. L. **Infectious diseases causing bovine abortin and fetal**. Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract. 9: 343-368. 1993

BENGIS, R. G.; KOCK, R. A.; FISHER, J. **Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface**. Rev. Sci. Tech Office Intern. Epizoot. 21(1):53-65. 2002.

BISBAL, F. J. **Food habits of some neotropical carnivoros in Venezuela (Mammalia, carnivore)**. Mammalia. 50(3):329-339. 1986.

BOLIN, C. A; ALT, D. P. **Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis**. Bov Pract. 33(1):50-55. 1999.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6ªed. Brasília: Ministério da saúde. Serie A normas e manuais técnicos. 816p. 2005.

CADAVIS GARCIA, E. A. **O clima no Pantanal Matogrossense**. Corumbá. Embrapa/UEPAE de Corumbá. 42 p. Ilust. (Circular Técnica, 14). 1984.

CATTO, J. B. **Endoparasitos de animais domésticos e silvestres do pantanal: helmintos, acantocéfalos, pentatosmídeo e protozoários**. III Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Os desafios do novo milênio. Corumbá, MS, Brasil. 2000.

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. **Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi***. Arq. Bras. Med. Zootec. 50 (1):11-17. 1998.

CONCONE, H. V.; MAURO, R. A; AGUIAR, L. M. S. **Jagatirica- *Leopardus pardalis*. Fauna e flora do cerrado**. 2005. Disponível em: < <http://www.cnpqc.embrapa.br/series/ema/Ema.htm> >. Acesso em:< 24, janeiro> 2009

DEMARÍA, M. R.; MCSHEA, W. J.; KOY, K.; MARCEIRA, N. O. **Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area consideration in Sam Luis, Argentina**. Biol. Conservation. 115(1):121-130. 2004.

ELLIS, W. A. **Leptospirosis as a cause of reproductive failure**. Vet. Clin. North Am. Food Anim Prac. 10(3): 463-478. 1994.

- ELLIS, W. A. **Leptospira australis** infection in pigs. *Pig Vet. J.* 22: 83-92. 1989.
- ELLIS, W. A. **Recent developments in bovine Leptospirosis.** *Veterinary annual.* Bristol. 23: 91-95. 1983.
- FACURE, K. G.; GIARETTA, A. A. **Food habitats of carnivores in a coastal Atlantic forest of southeastern Brazil.** *Mammalia*, 60(3): 499-502. 1996.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis.** 2º ed. MediSci, Melbourne, Vic. Australia. 272p. 1999.
- FAINE, S. **Guidelines for the control of Leptospirosis.** World Health Organization, Geneva. 171p. 1982.
- FIGUEREDO, A. O. **Leptospirose bovina: prevalência, variáveis de risco e sorovares predominantes em rebanhos de Mato Grosso do Sul, Brasil.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Matogrosso do Sul, Campo Grande, Brasil. 77p. 2007
- FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; COSTA, C. M. R. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil.** *Occasional Papers in Conservation Biology.* 4: 1-38. 1996.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Secretaria de Serviços Integrados da Saúde.** 2009. Disponível em: <http://www.pgr.mpf.gov.br/pgr/saude/doencas/leptospira.htm>. acesso em: 27/01/2009.

GEBRIEL, A. M.; SUBRAMANIAM, G.; SEKARAN, S. D. **The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens.** Trop. Biomed. 23(2): 194-207. 2006.

GERRISTSEN, M. J.; OLYHOEK, T.; SMITS, M. A.; BOKHOUT, B. A. **Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype hardjobovis em bovine urine.** J. Clin. Microbiol. 29 (12): 2805-2808. 1991

GIRIO, R. J. S.; PEREIRA, F. L.G.; FILHO, M. M.; MATHIAS, L. A.; HERREIRA R. C. P.; ALESSI, A. C.; GIRIO, M. **Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do agente.** Ciência Rural. 34(1):165-169. 2003.

GOMPPER, M. E. *Nasua narica*. Mammalian species, 487: 1-10. 1995.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T.; PURVIS, T. J.; CHENGGAPA, M. M. **Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 222: 1230-1233. 2003.

HATHAWAY, S.C.; LITTLE, T.W.A. ; PRITCHARD, D.G. **Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations.** Vet. Record. 119:84-86. 1986.

HONG, C. B.; DONAHUE, J. M.; GILE, R. C.; PETRITES-MURPHY, M. B.; POONACHA, K. B.; ROBERTS, A. W.; SMITH, B. J.; TRAMONTIN, R. R.; TUTTLE, P. A.; SWERCZEK T. W. **Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1985 and 1989 following seasons.** J. Vet. Diagn. Invest. 5:560-566. 1993.

HUNTER, P. **Leptospirosis.** In: Cortzer J.A.W. & Tustin R.C. Infectious diseases of livestock. Oxford, 2^a.ed. v.1. p.1445-1456. 2005.

JUAREZ, K. M.; MARINHO-FILHO, J. **Diet, habitat use and home ranges of sympatric canids in Central Brazil.** J. Mamm. 83(4): 925-933. 2002.

KMETY, E.; DIKKEN, H.. **Classification of the species of Leptospira interrogans and the history of its serovars.** A history of the publication of the serovars of leptospire, and a catalogue of their relationships. Groningen, Netherlands University Press Groningen. 1993.

LEITE, M. R. P. **Relações entre onça pintada, onça parda e moradores locais em três unidades de conservação da floresta Atlântica do estado do Paraná, Brasil.** Univ. Fed. Paraná, p. 16-21. .2000.

LEVETT, P. N. **Leptospirosis.** Clin. Microb. Rev.14 (2): 296-326. 2001.

LEMOS, R. A. A; ALMEIDA, A., P., M., G. **Leptospirose bovina.** In: Lemos R.A.A. Leptospirose bovina, campilobacteriose genital bovina, tricomonose bovina, neosporose em bovinos. Campo Grande, MS: Ed.UFMS. 2005.

LINS, Z. C.; LOPEZ, M. L.; MAROJA, O. M. Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição a ciências biológicas e a medicina tropical in: **Epidemiologia da leptospirose com particular referência a Amazônia brasileira**. Belém, Brasil.(2): 733-764. 1986.

LOURIVAL, R. M.; HARRIS, J. R.; MONTAMBAULT. **Introdução ao Pantanal, MS, Brasil**, p.146-151. In P.W. Willink, B. Chernoff, L.E. Alonso, J.R. Montambault & R. Lourival (eds.), Rap bulletin of biological assessment. A biological assessment of the aquatic ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conservation International. Washington, 306p. 2000.

MACIEL, R. M.; LOPES, S. T. A.; MARTINS, D. B.; FRANCISCATO, C.; MERINI, L. P.; COSTA, M. M.; BADKE, M. R. T.; GONÇALES, A. P.; VEIGA, A. P. M.; MUHLEN, R. V. Incidência de aglutininas anti-leptospira em soro de equinos utilizados na tração de carroças no município de Santa Maria - RS. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35. Resumo, Gramados. 2008.

MATIOLI, S. R. Biologia molecular e evolução. 1º Ed. Riberão Preto. Holos. 202 p. 2001.

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

MEDRI, I. M. **Ecologia e historia natural do Tatu-pebá, *Euphactus sexcintus* (linneaus, 1758), no Pantanal da nhecolândia, Mato Grosso do Sul.** Tese de Doutorado, Universidade de Brasilia, Brasil. 187p. 2008.

MÉRIEN, F. P.; AMOURIAUX, P.; PERLOTA, P.; BARANTON, G.; SAIN GIRONS, I. **Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* In clinical samples.** J. Clin. Microbiol. 2219-224. 1992.

MIRANDA, F. R. **Pesquisa de anticorpo para bactéria do gênero *Brucella spp*, *Leptospira spp*, *Clamydophila spp* em tamanduás-bandeira (*Mymecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758), da RPPN SESC Pantanal, Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Nacional das Emas.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 116p. 2008.

MIRANDA, G. B. **Relações filogenética entre as espécies de roedores sul-americanos da tribo *Orizomyini* analisada pelos genes citocromo *b* e *IRBF*.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 180p. 2007.

MOURÃO,G.; COUTINHO, M.; MAURO, R.; CAMPOS, Z.; TOMÁS, W.; MAGNUSSON, W. **Aerial Surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil.** Biol. Conservation. 92:175-183. 2000.

MORATO, R.G.; GUIMARAES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BARNABE, V. H.; BARMABE, R. C. **Colheita e avaliação em semen de onça pintada (*Panthera onca*).** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.35(4): 178-181. 1998.

MURRAY, J. L.; GARDNER, G. L. **Leopardus pardalis**. Mammalian Species 548. 1-10p. 1997.

OIE. World organisation for animal health. **Leptospirosis**. Chapter 2.2.4. 2006. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm. Acesso em 22/01/2009

OLIVEIRA, T. G.; CASSARO, K. **Guia de Identificação dos felinos brasileiros**. 2º Ed. Sociedade de Zoologicos do Brasil. São Paulo. 1999.

PAES, R. C. S; RIBEIRO. O. C.; CARNEIRO MONTEIRO, L. A. R., FIGUEREDO, A. O.; NETO, A. A. C.; OLIVEIRA, J. M.; DA ROSA, G. O.; KEUROGLIAN, A.; PIOVEZAN, U.; HERRERA, H. M. **Enfermidades de ocorrência no porco monteiro (Sus scofa) no Pantanal sul-mato-grossense do Brasil**. In: congresso brasileiro de medicina veterinária.35, Resumos, Gramados. 2008.

PELLEGRIN, A. O.; GUIMARÃES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. **Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense**. Embrapa Pantanal: comunicado técnico 22: 1-9. 1999.

PELLEGRIN, A. O; SERENO, J. R. B; FIGUEIREDO, J. O. **Levantamento sorológico de aglutininas anti-leptospira em bovinos da sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul-matogrossense**. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 22. Resumos, Curitiba. 1992.

PINHO, A. P. B.; MORAES, C. C. G.; SANTOS, R. B.; DIAS, H. L. T.; MENEZES, A. M. C.; OLIVEIRA, A. L.; SILVA, J. S.; SENA, N. M.; VASCONCELLOS, S. A. **Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas ocorrências em eqüídeos de tração da ilha de Maiandeuá (Algadoal), Pará.** Inst. Biol. São Paulo. 69 (2): 113-198. 2007.

QUEIROZ, J. P. A. F.; SOUZA, F. D. N.; LAGE, R. A.; AGRA, E. G. D.; IZABEL, M. A.; GADELHA, I. C. N.; DIAS, C. E. V.; FREITAS, C. I. A. **Registro de pegadas de Quatis (*Nasua nasua*) para monitoramento e educação ambiental utilizando diferentes substratos.** Acta Vet. Bras. 2(1): 11-15. 2008.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine, - A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.** 9ª ed. Saunders Ltd. Title. 1880p. 2000.

REDSTONE, J. S.; WOODWARD, M. J. **The development of a ligase mediated PCR with potential for the differentiation of serovars within *Leptospira interrogans*.** Vet. Microb. 51: 351-362. 1996.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada a produção animal.** Embrapa, Brasil, DF. 29-32. 2001.

RENDE, J. C.; RIGOBELLO, E. C.; MARIN, J. M.; AVILA, F. A. **Infecção experimental em suínos jovens com *Leptospira interrogans* sorovar *woffii*: determinação de parâmetros bioquímicos.** Ciencia Rural. 37(2):458-463. 2007.

RODRIGUES, A. M. A. **Leptosirose canina; diagnostico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni.** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo. 116p. 2008.

RODRIGUES, F. H. G.; MEDRI, I. M.; TOMÁS, W. M.; MOURÃO, G. M. **Revisão do conhecimento sobre ocorrência e distribuição de Mamíferos do Pantanal.** Embrapa Pantanal / Documento 38. 41p. 2002.

ROQUE, A. L. R.; D'ANDREA, P. S.; ANDRADE, G. B.; JANSEN, A. M. **Trypanosoma cruzi: Distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae).** Exp. Parasitol. 111:37-46. 2005.

SCHALLER, G. B.; VASCONCELOS, J. M. C. **Jaguar predation on capybara.** Z. Säugetierkunde. 43:296-301.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. **Leptospirosis in india and the Rest of the World.** Braz. J. Infect. Dis. 7(3): 178-193. 2003.

SANTOS-JÚNIOR, T. S.; MACEDO M. **Potencial frugívoro e dispersor de sementes por cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous* em uma área de cerrado manejada para o cultivo de Teca, *Tectona grandis*, (Rosário Oeste, MT).** Anais VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu, MG. 2007.

SILVA, J. dos S. V. da; ABDON, M. de M.; SILVA, M. P da. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. Encontro sobre sensoriamento remoto aplicado a estudos no Pantanal. **Livro de resumos**, Corumbá. São José dos Campos, INPE, 1995.p.9-10.

SILVA, R. A. M. S.; LIMA, E. S. S.; SANCHES, V. **Estudos preliminares sobre valor do hematológico do lobinho (*Cerdocyon thous*) do Pantanal, MS**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. 3.p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 56).

TEIXEIRA, B. R.; ROQUE, A. L.; BARREIROS-GOMEZ, S. C.; BORONDIN, P. M.; DANSEM, A. M.; D'ANDREA, P. S. **Maintenance and breeding of *Thrichomys* (Trouessart, 1880) (Rodentia: Echimyidae) in captivity**. Mens Inst Oswaldo cruz. 100(6): 527-530. 2005.

TOMÁS, W. M.; MCSHEA, W.; DE MIRANDA, G. H B.; MOREIRA, J. R.; MOURÃO, G.; LIMA BORGES, P. A. **A survey of pampas deer, *Ozotoceros benzoarticus leucogaster* (Artiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal Wetetland, Brazil using the distance sampling technique**. Anim. Biol. Conserv. 24 (1): 101-106. 2001.

VAN EYS, G. J. J. M.; GRAVEKAMP, C.; GERRISTSEN, M. J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M. T. E.; TER SCHEGGE, J.; TERPSTRA, W. J. **Detection of *Leptospiris* in urine by polymerase chain reaction**. J. Clin. Microbiol. 27 (10): 2258-2262. 1989.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z. M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FAVERO, A. C. M.; FERREIRA-NETO, J. S. **Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipo predominantes em rebanhos**

dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. Arq Inst Biol. 64: 7-15. 1997.

VASCONCELLOS, S. A. **Leptospirose animal.** In: Encontro Nacional em Leptospirose, 3. Rio de Janeiro, Anais... Rio de Janeiro. 62-66p. 1993.

WEBSTER, J. P; ELLIS, W. A.; MACDONALD, D. W. **Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms.** Epidemiol. Infect. 114 (1): 195-201. 1995.

WETZEL, R. M. **The indetification and distribution of recent *Xenarthra* (= *Edentata*) in:** The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. G. G. Montgomery (Ed). Smithsonian Institution. Press Washington D.C. 5-8. 1985.

WHO/FAO/OIE. Collaborating center for reference and research on Leptospirosis. 2008. **Leptospira serovar data sheet. Serovar Copenhageni.** Disponível em: <http://www.health.qld.gov.au/qhcss/documents/copenhageni.pdf> acessado em 30/01/2009

ZUCCO, C. A. **Desenvolvimento de alternativa de baixo custo para monitoramento da atividade de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) com tecnologia GPS no Pantanal Central do Brasil.** Dissertação de mestrado em Ecologia, Universidade Federal do Matogrosso do Sul, Corumbá, Brasil. 62p. 2007.

ARTIGO I

Leptospirose em veado campeiro (*Ozotoceros bezaorticus*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. Sorologia e PCR.

Anahí S. Vieira & Aiesca O. Pellegrin

ABSTRACT.-Vieira A.S., & Pellegrin A.O [Diagnosis of *Leptospira* spp in cervids (*Ozotoceros bezaorticus*) of the Pantanal sul-mato-grossense, by serological and molecular technique (PCR).] Leptospirose em veado campeiro (*Ozotoceros bezaorticus*) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. Sorologia e PCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: Anahi_sv@yahoo.com.br

The leptospirosis reports about wild population living in sympatry with cattle has been increasingly frequent. The diagnostic technique commonly used is the microscopic agglutination test (MAT). The deer are found scattered worldwide, and in Brazil, deer *Ozotoceros bezaorticus* are distributed in greater quantities in Pantanal region, using the same habitats as cattle. This study tested 102 samples of *O. bezaorticus*: 98 by PCR, 51 by SAM and 47 animals were tested by both techniques. The frequency of leptospirosis in deer pampas detected by MAT was 5.9% (3), while PCR was 2.04% (2), presenting an analytical sensitivity of 280 fg/uL. Through sequencing and phylogenetic analysis, isolated *Leptospira* found in pampas deer were identified as *Leptospira interrogans* and by SAM as serovars Pomona and Butembo.

INDEX TERMS: Deer, Leptospirosis, MAT e PCR

RESUMO.- Os relatos de ocorrência da leptospirose em populações silvestres que vivem em simpatria com os bovinos tem sido cada vez mais frequentes. A técnica de diagnóstico mais utilizada é a soroaglutinação microscópica (SAM). Os cervídeos são encontrados dispersos mundialmente, sendo que no Brasil, os veados campeiro (*Ozotoceros bezaorticus*) distribuem-se em maior quantidade na região do Pantanal, utilizando os mesmos habitats que os bovinos. Neste estudo foram testadas 102 amostras de *O. bezaorticus*: 98 foram por meio da PCR, 51 por meio SAM e 47 animais por ambas as técnicas. A frequência de leptospirose detectada nos veados campeiro pela SAM foi de 5,9% (3) enquanto pela PCR foi de

2,04% (2), sendo que esta técnica apresentou uma sensibilidade analítica de 280 fg/μl. Por meio de sequenciamento e análise filogenética, os isolados de *Leptospira* encontrados nos veados campeiros foram identificados como *Leptospira interrogans* e pela SAM como os sorovares Pomona e Butembo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cervídeos, Leptospirose, SAM e PCR

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade de distribuição cosmopolita (Scarcelli et al. 2003), seguramente das mais importantes como causas infecciosas de perdas reprodutivas em bovinos e, ao mesmo tempo, importante zoonose, de morbidade já bem conhecida, tanto no homem como nos animais domésticos. Os relatos de ocorrência em populações silvestres que vivem em simpatria com os bovinos tem sido cada vez mais freqüentes (Mathias et al. 1999, Bengis et al. 2002, Girio et al. 2003, Scarcelli et al. 2003, Deem et al. 2004) e nesse contexto, é de vital importância a pronta detecção da doença nas populações silvestres por meio de testes diagnósticos de elevada acurácia.

Os cervídeos pertencem à Ordem Artiodactyla, família Cervidae, e são encontrados dispersos mundialmente (Emmons & Feer 1990, Eisenberg & Redford 1999), distribuídos em vários biomas como o Cerrado, Pantanal e Chaco (Tiepolo & Tomas 2006).

No Pantanal sul-mato-grossense há quatro espécies de cervídeos, *Blastocerus dichotomus* (Cervo-do-Pantanal), *Ozotoceros bezoarticus* (Veado-Campeiro), *Mazama americana* (Veado-Mateiro) e *Mazana gouazoubira* (Veado-Catingueiro), sendo que cada uma possui um habitat preferencial (Vaughan 1986, Rodrigues 2002, Tomás et al. 2004, Tiepolo & Tomás 2006).

As populações de veado campeiro estão distribuídas por quase todo o Pantanal, com maiores densidades em áreas de campos e vazantes (Mourão et al. 2000, Tomás et al. 2001, Tomas et al. 2004). Esta espécie apresenta maior densidade populacional na região do Pantanal do que no cerrado brasileiro e utiliza o mesmo habitat que os bovinos (Rodrigues et al. 2002).

No Pantanal, as condições ecológicas são altamente favoráveis à ocorrência de leptospirose, pois a temperatura é elevada e a média pluviométrica é de 1200 mm/ano (Garcia & Castro 1986) tais condições são muito propícias a sobrevivência de leptospiros no ambiente (Lins et al. 1986). O Pantanal apresenta uma paisagem composta em forma de mosaico com tipos de vegetação que inclui cerradões e florestas nas “Cordilheiras”, campos úmidos e sazonais, nas partes alagáveis e circulando lagoas; cerrados e campos nas partes intermediárias do relevo (Rodela et al. 2007).

Uhart et al. (2003), na Argentina verificaram que três (21,4%) de 14 *O. bezoarticus* examinados foram positivos para leptospirose. Deem et al. (2004) encontraram quatro *M. gouazoubira* sorologicamente positivos para leptospirose em 11 animais examinados no Chaco boliviano (36,3%).

O diagnóstico da leptospirose é efetuado principalmente pela detecção de anticorpos por meio do Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e do isolamento do agente em meio de cultura. Entretanto, o último procedimento demanda muito tempo e apresenta sucesso limitado já que o crescimento desta bactéria tende a ser fastidioso. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) que nos últimos anos passou a ser empregada para a detecção de leptospiros em humanos e animais domésticos apresenta maior sensibilidade que a sorologia e é mais precisa. (Van Eys et al. 1989, Gerritsen et al. 1991, Radstone & Woodward 1996).

Os objetivos deste trabalho foram estimar a frequência de veados campeiros infectados pela *Leptospira* spp. na região do Pantanal, identificando os principais sorovares circulantes e testar um ensaio da polimerase em cadeia para a detecção desse agente, estimando sua sensibilidade analítica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de Estudo

A área de estudo incluiu quatro propriedades contíguas localizadas na região central do Pantanal brasileiro, conhecido como Nhecolândia”(18° 59’ 115’’ S, 56° 37’ 63’’N). O clima desta região é considerado sub-úmido, com temperaturas elevadas (19 a 28°) e estação seca

anual de mais de quatro meses, com médias pluviométricas de 1200 mm/ano (Garcia & Castro 1986).

Captura, Contenção e obtenção das amostras

A captura dos veados campeiro foi realizada por meio de dardo anestésico, lançados a distância por pistolas de CO₂ com pressão regulável (Distinject[®], modelo 35) ou uma zarabatana de 2 m X 11 mm de diâmetro (Zootech[®]). A contenção química empregada em 42 animais foi realizada com os anestésicos Tiletamina e Zolazepan ou Zolazepan e xilazina (Piovezan et al. 2006). Para os 60 animais restantes a contenção química foi efetuada com a associação de zolazepan+tiletamina+xilazina+atropina (Borges et al. 2006).

As capturas foram realizadas com licença ambiental do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de nº (032/2005) 0214.0022008/05-00 e (005/2007) 02014.000382/2007-22.

Foram colhidas por punção da veia jugular, amostras de sangue com e sem anticoagulante (EDTA). Após o processamento das amostras foram obtidos o soro e a papa de hemáceas com as quais foram realizados os testes de Soroaglutinação Microscópica (SAM) e Reação em Cadeia a Polimerase (PCR).

Teste de Soroaglutinação Microscópica

A pesquisa de anticorpos aglutinantes anti-leptospiras, foi efetuada pela reação de soroaglutinação microscópica de acordo com Cole Jr. et al. (1973) . Para o diagnóstico foi utilizada uma coleção de antígenos vivos, representantes de 19 sorogrupos de *Leptospira interrogans*, composta pelos sorovares: Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Autumnalis, Pomona, Grippotyphosa, Hebdomadis, Wolffii, Bratislava, Harjobovis e Hardjoprajtino, Castellonis, Batavie, Whitcombi, Cynopteri, Butembo, Javanica, Panamá, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Patoc e Sentot. Além dessas foram utilizados antígenos representando estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, de animais domésticos e silvestres (Fig.1).

Código Identificação	Espécie animal de onde foi isolada	Instituição(ções) envolvidas no isolamento	Espécie	Sorogrupo identificado*	Sorovar identificado
4-B (VPS) (An 776 original)	Gambá (<i>D.marsupialis</i>)	Instituto Biológico São Paulo – CDC USA	<i>L.santarosai</i>	Bataviae	Brasiliensis**
M 7-87	Suíno (<i>Sus scrofa</i>)	VPS -FMVZUSP	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Pomona#
M 4/98	Búfalo (<i>B.bubalis</i>)	VPS- FMVZ USP	<i>L.santarosai</i>	Sejroe	Guaricura#
M 9/99	Rato (<i>R.norvegicus</i>)	VPS FMVZ USP Fundação Parque Zoológico S.Paulo	<i>L.interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhagenii #
LO-1	Cão doméstico (<i>C.familiaris</i>)	Universidade Estadual de Londrina	<i>L.interrogans</i>	Canicola	Canicola#
LO-4	Suíno (<i>Sus scrofa</i>)	Universidade Estadual de Londrina	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Pomona#
LO 14	Bovino(<i>Bos taurus</i>)	Universidade Estadual de Londrina	<i>L.interrogans</i>	Canicola	Canicola#
2 A CAP	Capivara (<i>H.hidrochaeris</i>)	VPS FMVZ USP	<i>L.santarosai</i>	Gripptyphosa	Bananal#
M 110/2006	Carnívoro silvestre (<i>C.thous</i>)	EMBRAPA VPS FMVZ USP		???	???

* aglutinação cruzada com antisoro policlonal

**absorção de aglutininas.

aglutinação com kit de anticorpos monoclonais

??? não identificado

FIG. 1. Estirpes de leptospiros isoladas de animais segundo código de identificação, espécie animal de onde foi isolada, Instituição(ções) que participaram do isolamento, espécie, sorogrupo e sorovar identificados.

Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 175 µl de papa de hemácia, adicionando-se 25 µl de PROTEINASE K (20 mg/mL) e incubando-se a 65°C/15 minutos. A seguir foram adicionados 250 µl de SDS 10% (Dodecil Sufato de Sódio), homogeneização por inversão e incubação a 65°C/6 minutos. Foram adicionados 400 µl de clorofórmio, agitação vigorosa em vortex, colocação de 200 µl da solução de precipitação protéica (3M C2H3KO2, 2M CH3COOH) e nova homogeneização. A amostra foi centrifugada por 14000×g/10 minutos. O sobrenadante foi colhido e tratado com 500 µl de etanol P.A. refrigerado e, em seguida, homogeneização por inversão até formar um precipitado. Posteriormente procedeu-se a centrifugação a 14000×g/5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foram adicionados 500 µl de etanol 70%. Logo após, a amostra foi centrifugada a 14000×g/3 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µl

de Tris EDTA (10 mM Tris HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8.0) e estocado a -20°C (Sambrook et al. 1987).

Controle Positivo

O controle positivo foi obtido de uma cultura em meio semi-sólido (Fletcher®, Difco) de *Leptospira interrogans*, sorovar Hardjo (Hardjoprajitno), cedida pela Agência Estadual de Defesa Sanitária e Vegetal do Estado de Mato Grosso do Sul (IAGRO).

Desenho dos oligonucleotídeos

O par de oligonucleotídeos utilizado foi desenhado segundo Mérien et al. (1992), para a amplificação de um produto de aproximadamente 331 pares de bases, que corresponde a uma região conservada do gene *I6S* da estrutura primária de *Leptospira* spp. O oligonucleotídeo A: 5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3', corresponde à região de nucleotídeos 38 até 57 e o oligonucleotídeo B: 5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3', corresponde à região do nucleotídeo 348 até 368.

Amplificação dos genes pela técnica de PCR

A reação de PCR foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeo descrito acima em termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradiente), com um volume final de 20 μl contendo 2 μl de tampão de PCR 10X (100 mM Tris-HCL pH 8,5, 500 mM KCL), 1,5 mM de MgCl_2 , 250 μM de cada dNTP, 0,02 U de taq DNA polimerase (Iud®), 0,25 pmoles de cada oligonucleotídeo, e 1 μL de DNA molde. Os produtos da amplificação foram resolvidos por eletroforese a 100 V por 1 hora, separados por gel de agarose a 1%, corados com Syber Gold (Ivitrogen®) e visualizados por meio do sistema de captura de imagem X-ILP (Loccus®) com transluminador sob luz ultravioleta.

Sensibilidade da Reação de PCR

A sensibilidade da reação de PCR foi testada por meio de diluições seriadas (10 vezes) do DNA do controle positivo com água Millique®. O DNA genômico de *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) foi diluído da concentração inicial de 280 ng/ μl até uma diluição final de $1:10^{-7}$. Este DNA foi diluído até que o mesmo apresentasse uma banda visível por meio da PCR, sendo o limite da detecção. Depois foram testadas todas as culturas que pertenciam à coleção de SAM pela PCR.

Clonagem dos Genes a partir do Produto de PCR

Para a clonagem dos fragmentos de DNA do gene *16S* dos diferentes isolados de *Leptospira* spp. foram adicionados em microtubos de 1,5 ml, 1 µl do vetor pGEM-T Easy (Promega®), 3 µl do produto de PCR, 1 µl da enzima Ligase T4, e 5 µl de tampão da ligação. Após este procedimento foi realizada a transformação utilizando-se de células *E. coli* TOP 10 F quimicamente competentes.

Os clones recombinantes foram selecionados em meio Luria-bertani (LB) agar contendo 100 µg/ml de ampicilina. A triagem das colônias foi efetuada com X-gal e IPTG. Os clones recombinantes foram propagados em LB líquido com ampicilina.

Os plasmídeos foram extraídos pela minipreparação de plasmídeos (Sambrook et al. 1987).

Sequenciamento

As amostras obtidas na minipreparação de plasmídios foram sequenciadas por meio do método de Sanger, que emprega o didesoxi ou terminadores de cadeia, em sequenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems), segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram sequenciadas com os oligonucleotídeos do gene *16S* de *L. interrogans* e com o oligonucleotídeos do vetor pGEM-T Easy e posteriormente analisada por meio do Blast N (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Análise Filogenética

As amostras sequenciadas foram alinhadas com o auxílio do programa Mega 4.0 (Tamura et al. 2007). A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbour-Joining (NJ), versão simplificada do método de mínima evolução (ME), que utiliza a distância medida para corrigir os vários acessos ao mesmo local (como o número de substituições de nucleotídeos ou aminoácidos), o qual escolhe uma topologia mostrando o menor valor da soma de todos os ramos como uma estimativa correta da árvore.

Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas seqüências (Quadro 1) que estão disponíveis no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Bioestat*, utilizando o teste do Qui-quadrado (χ^2) com tabela de contingência 2 x 2, utilizando correção de Yates quando

necessário e Odds Ratio (Ayres et al. 2005) para comparar os resultados positivos dos testes de SAM e PCR.

Quadro 1 – Número de acesso no *GenBank* de *Leptospira* spp. correspondente, utilizada para a construção da árvore filogenética para análise parcial do gene 16 S

Nº de Acesso	<i>Leptospira</i>
AY714984.1	<i>Leptonema illini</i> Illini
FJ154579	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Castellonis
AM050569	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Hardjo (Hardjobovis)
FJ154600	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Javanica
FJ154595	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Tarassovi
FJ154593	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Sejroe
FJ154580.1	<i>Leptospira weilii</i> Celledoni
EU159692	<i>Leptospira biflexa</i> Patoc
FJ 154543.1	<i>Leptospira interrogans</i> Autumnalis
FJ154557.1	<i>Leptospira interrogans</i> Australis
DQ991469.1	<i>Leptospira interrogans</i> Bataviae
AM050586.1	<i>Leptospira interrogans</i> Bratislava
DQ991472.1	<i>Leptospira interrogans</i> Canicola
AY996790.2	<i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni
AM050570	<i>Leptospira interrogans</i> Hebdomandis
AY996796.1	<i>Leptospira interrogans</i> Hardjo(Hardjoprajitno)
FJ154549.1	<i>Leptospira interrogans</i> Icterohaemorrhagiae
FJ154544.1	<i>Leptospira interrogans</i> Pomona
FJ154552.1	<i>Leptospira interrogans</i> Pyrogenes
EUA497661	<i>Leptospira interrogans</i> Wolffii
DQ 991478.1	<i>Leptospira kirschneri</i> Butembo
AY631895.1	<i>Leptospira kirschneri</i> Cynopteri
FJ 154572.1	<i>Leptospira kirschneri</i> Grippotyphosa
FJ154582.1	<i>Leptospira noguchii</i> Panamá
FJ154580.1	<i>Leptospira weilii</i> Celledoni
AY631883	<i>Leptospira santarosai</i> Shermani
AY293856.1	<i>Turneriella parva</i> parva

RESULTADOS

Das 51 amostras de soro de veado campeiro testadas pela soroaglutinação microscópica três apresentaram reação positiva (5,9%) (Quadro2), sendo que os sorovares predominantes foram Pomona (2/3) (66%) e Butembo (1/3) (34%).

Quadro 2 – Número de animais utilizados em cada teste e porcentagem de animais positivos

Teste	Nº animais	Nº positivos/%
PCR	98	2 (2,04)
SAM	51	3 (5,9)
PCR/SAM	47	0

Das 98 amostras de papa de hemácia testadas para *Leptospira* spp, por meio da PCR, duas (2,04 %) (Quadro2) apresentaram um fragmento de aproximadamente 331pb. A sequência de oligonucleotídeo utilizada amplificou todos os sorovares empregados na coleção utilizada para a realização da SAM.

A sensibilidade analítica da reação de PCR foi de 280 fg/ μ l da concentração de DNA do controle positivo. Foi possível a visualização da banda, em gel de agarose a 1% corado com Syber Gold, quando o DNA foi diluído até $1:10^{-6}$ (Fig. 2).

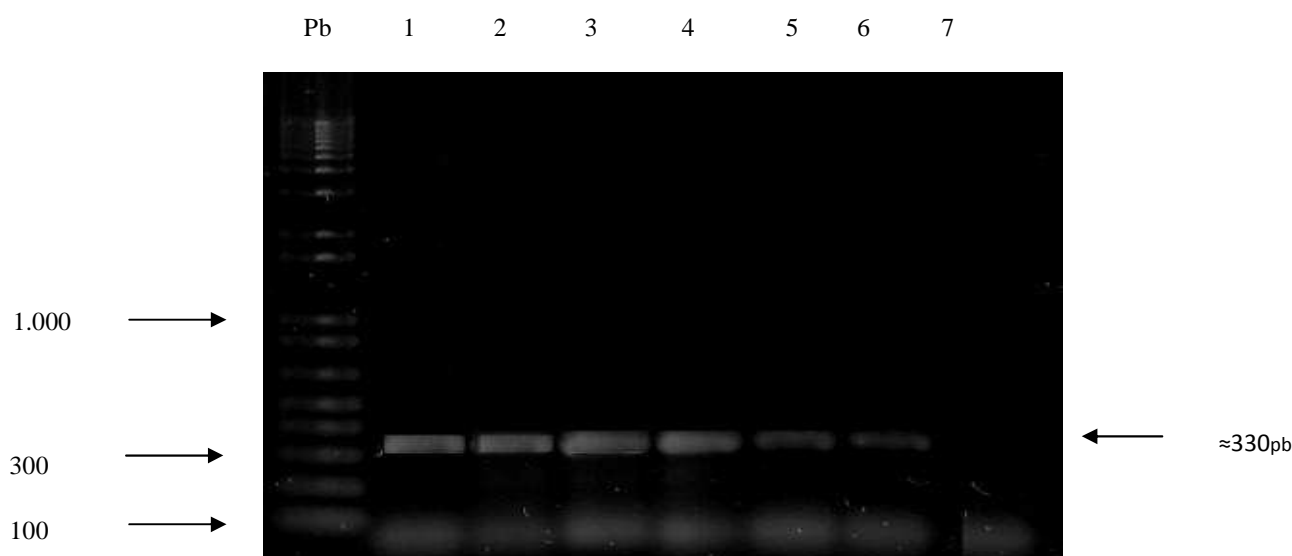


Fig. 2 – Sensibilidade analítica da PCR. Linha 1: Pb (marcado de pares de base 1Kb plus Invitrogen®), Linha 2 a 7: controle positivo em diluições variando de 10^{-1} – 10^{-7}

As duas amostras positivas de *O.bezoarticus* foram clonadas, e após a clonagem foram obtidas colônias que continham o inserto com o gene parcial *16S* de *Leptospira* spp. Os plasmídeos foram extraídos por meio da técnica de mini preparação de plasmídeos (Sambrook et al. 1987) e, posteriormente, o inserto contendo a sequência parcial do gene *16S* foi sequenciado.

Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento com auxílio do programa Mega 4.0 (Tamura et al. 2007) para se obter a sequência consenso esta analisada por meio do Blast N. Com a sequência consenso foi verificado que o isolado *O. bezoarticus* 2 teve 100% de identidade ($1e-172$) com *L. interrogans* sorovar Australis número de acesso no *GenBank* FJ154557.1 e o *O.bezoarticus* 31 teve 99% identidade ($1e-104$) com *L. interrogans* sorovar Copenhageni, número de acesso *GenBank* FJ154558.1 .

Com este resultado foi construída a árvore filogenética, pelo alinhamento de sequências parciais do gene *16S* depositadas no *GenBank*, pelo método de Neighbour-Joining.

Após a separação de *Leptospira biflexa* patoc, *Leptonema ilinni* Illini e *Tuneria parva* Parva, utilizadas como *out group* (Morey et al. 2006) obteve-se um grande grupo das leptospiros patogenicas Os isolados de cervídeos ficaram dentro do grupo de *Leptospira interrogans* (Fig. 3).

Os isolados de *O.bezoarticus* não apresentaram diferença quanto à topologia do grande grupo de *Leptospira interrogans*, pois estão dentro do mesmo clado significando que estes estão muito próximos de *L. interrogans*.

Os testes estatísticos foram aplicados aos animais que foram testados por meio de PCR e SAM. Não havendo diferença entre os testes diagnosticos, pois a probabilidade de um resultado PCR positivo entre os animais com sorologia positiva não foi superior a dos que apresentaram sorologia negativa. A proporção de animais soropositivos com PCR positivo foi semelhante à dos animais soropositivos com PCR negativo ($\chi^2 = 0,142$; $p=0,706$ e $OR=0$ e $p= 0,271$).

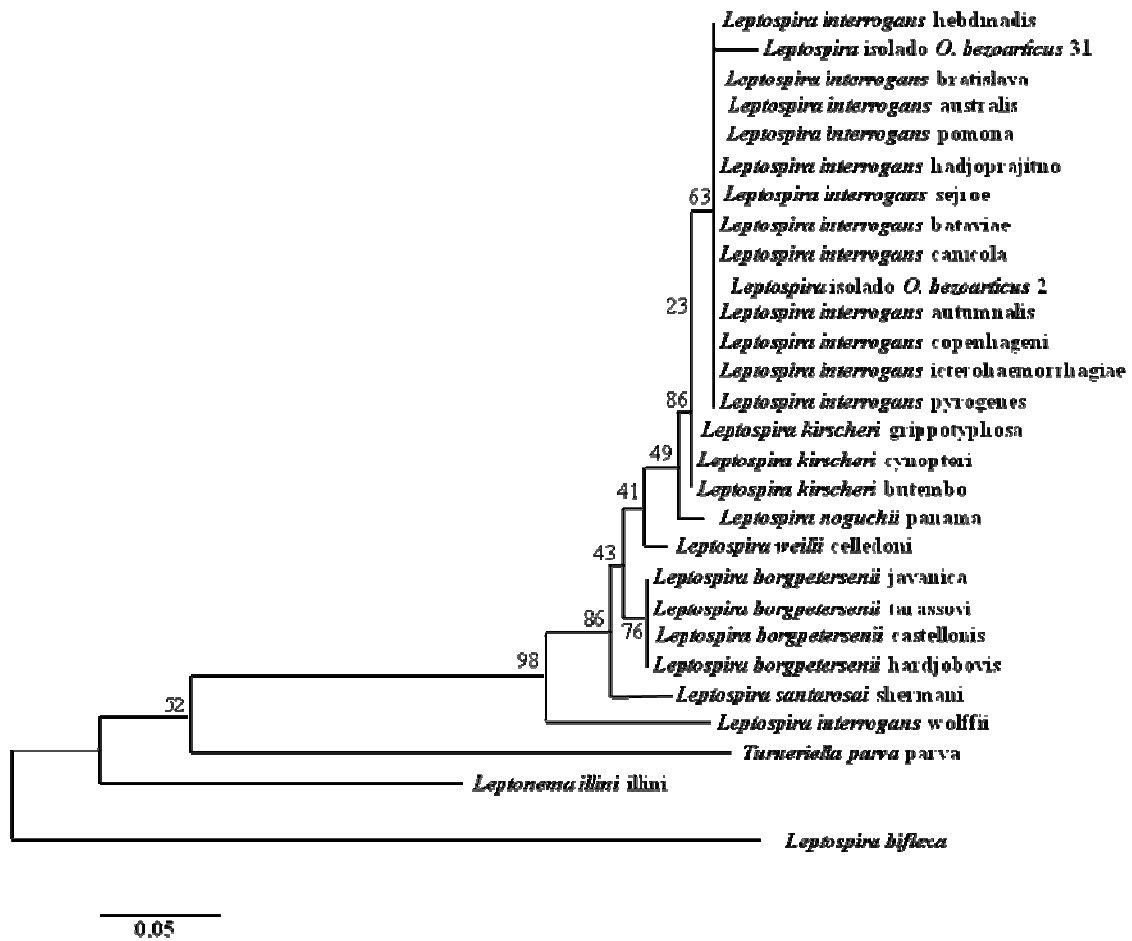


Fig. 3 - Filogenia de *Leptospira* spp. construída a partir do alinhamento de seqüências parciais do gene 16S. Método utilizado foi o de Neighbour-Joining. O suporte de cada clado foi determinado por 1000 *bootstraps* indicando o valor dos nós internos (%).

DISCUSSÃO

Poucas informações têm sido reportadas sobre doenças infecciosas em cervídeos (Uhuart et al. 2003). No Pantanal sul-mato-grossense já foram realizados alguns inquéritos para *Leptospira* em cervídeos.

No presente estudo foi verificada a presença de leptospiros em *O. bezoarticus*, com o emprego da técnica de PCR, procedimento que ainda não havia sido utilizado para a pesquisa de leptospiros nestes animais. Foi encontrada uma positividade de 2,04% (2/98). Por se tratar de

uma PCR aplicada a amostras de sangue, este procedimento deve ser utilizado como método de triagem, pois os animais positivos estarão na fase de leptospiremia (que dura de 7-15 dias após a infecção) (Brasil 2005).

Na soroglutinação microscópica foi encontrada a ocorrência de 5,9% (3/51) animais reagentes, sendo o Pomona o sorovar predominante. Os resultados obtidos diferem do encontrado por Mathias et al. (1999), onde o percentual foi de 24% (4/17), sendo predominante o sorovar Hardjo, este trabalho foi realizado na mesma região com os *O. bezoarticus*, e na região do Parque das Emas onde todos os *O. bezoarticus* foram negativos (24 animais) na SAM.

Os resultados obtidos no presente trabalho concordaram com os obtidos por Girio et al. (2003), que registraram quatro (9,7%) animais reagentes pela soroglutinação microscópica realizada em 41 animais e não detectaram a presença de *Leptospira* spp. nos rins e fígado dos animais que vieram a óbito durante a captura. Porém, no que se refere aos sorovares predominantes, houve discordância entre os resultados do presente trabalho e os de Girio et al. (2003), uma vez que tais autores encontraram maior frequência de reações para o sorovar Wolffi, que tem os bovinos, como hospedeiro de manutenção e no presente trabalho houve maior frequência de reações para o sorovar Pomona, mantido em condições naturais pelos suínos.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a leptospirose ocorre em cervídeos da área estudada, e que a presença de cervídeos infectados por esse agente representa um risco para outros animais domésticos e silvestres da região.

Obteve-se um *best hits* de 99% (e-value $1e-169$) para *L. interrogans* sorovar Australis para o animal 2 e 99% (e-value $1e-104$) *L. interrogans* sorovar Copenhageni para o animal 31. O sorovar Australis tem sido encontrado em equinos, sem sintomatologia clínica (Maciel et al. 2008, Pinho et al. 2007) e o sorovar Copenhageni já foi isolado em vários animais tendo como reservatório os roedores e desenvolvendo sintomas clínicos em seus hospedeiros acidentais (Rodrigues 2008). Girio et al. (2003) já haviam detectado o sorovar Copenhageni em cervídeos na mesma região pelo teste SAM, o que corrobora o presente resultado. Entretanto, considerando que os primers escolhidos amplificam uma região conservada do gene 16S de *Leptospira* spp não se pode afirmar que os fragmentos obtidos sejam de fato pertencentes aos sorovares Copenhageni e Australis.

A figura 3 mostra que os isolados dos cervídeos ficaram dentro do grande grupo onde se encontram leptospiros que tem como reservatórios os suínos e/ou bovinos.

Com os resultados obtidos na SAM sugerem uma hipótese de que o porco monteiro (*Sus scrofa* feral), que representa uma das maiores biomassas da região (Mourão et. 2002), possa estar transmitindo o sorovar Pomona a população de veados campeiro. Com esse resultado pode-se sugerir que sorovares de *Leptospira* estão circulando nas populações domésticas e silvestres da região estudada, contudo as possíveis interações epidemiológicas entre cervídeos e bovinos ainda necessitam de maiores estudos para serem esclarecidas.

Agradecimentos - A Embrapa Pantanal pela colaboração na coleta das amostras de animais silvestres, a Embrapa Gado de Corte pelo suporte à realização das técnicas moleculares e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo apoio a realização das técnicas sorológicas. A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul- FUNDECT, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, a Embrapa Pantanal e Embrapa Gado de Corte pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Ayres M., Ayres Jr. M., Ayres D.L. & Santos A.A.S. 2005. Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas da ciências bio-médicas. 4º ed. Imprensa Oficial do Estado do Pará, Belém. 324p.
- Bengis R.G. Kock R.A. & Fisher J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. Rev. Sci. Tech Office Intern. Epizoot. 21(1):53-65.
- Borges P.A.L, Tomas W.M, Lacerda A.C.R, Tortato F.R & Pereira A.W. 2006. Contenção de *Ozotoceros bezoarticus* no Pantanal com associação zolazepan+tiletamina+xilazina+atropina e reversão com ioimbina. VII Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre, Ilhéus, Bahia. Pôster.
- Brasil.2005. Ministerio da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6. Ed. Brasília: Ministerio da saúde. Serie A normas e manuais técnicos. 816p.
- Cole J.R, Sulzer C.R. & Pursell A.A. 1973. Improved microtechnique for the Leptospiral microscopic agglutination test. Appl. Microbiol. 25(6): 976-980.
- Deem S.L., Noss A.J., Villarroel R., Whart M.M. & Karesh W.B. 2004. Disease survey of free-ranging Grey Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) in the gram Chaco, Bolivia. J. Wildl. Dis. 40(1): 92-98.

- Eisenberg J. F., Redford K. H. 1999. Mammals of the Neotropics – The Central Neotropics. The University Chicago Press, Chicago. (3):609p.
- Emmons L. H. & FEER F. 1990. Neotropical rainforest mammals - a field guide. The University of Chicago Press. Chicago. 281p.
- Garcia E.A. & Castro L.H.R. 1986. Análise da frequência de chuva no Pantanal Mato-Grossense. Pes. Agropec. Bras. 21(9): 909-925.
- Gerritsen M.J., Olyhoek T., Smits M.A. & Bokhout B.A. 1991. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo subtype hardjobovis em bovine urine. J. Clin. Microbiol. 29 (12): 2805-2808.
- Girio R.J.S., Pereira F.L.G., Filho M.M., Mathias L. A., Herreira R. C.P., Alessi A.C. & Girio T. M. S. 2003. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do agente. Ciênc. Rural. 34 (1):165-169.
- Lins Z.C., Lopez M.L. & Maroja O.M. 1986. Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição a ciências biológicas e a medicina tropical in: Epidemiologia da Leptospirose com particular referência a Amazônia brasileira. Belém, Brasil.(2): 733-764.
- Maciel R.M., Lopes S.T.A., Martins D.B., Franciscato C., Merini L.P. Costa M.M., Badke M.R.T., Gonçalves A.P., Veiga A.P.M. & Muhlen R.V. 2008. Incidência de aglutininas anti-leptospira em soro de equinos utilizados na tração de carroças no município de Santa Maria - RS. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35. Resumo, Gramados.
- Mathias L. A., Giro R.J.S. & Duarte J.M. B. 1999. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas Deer from Brazil. Journal of Wildl. Dis. 35 (1): 112-114.
- Mérien F.P., Amouriaux P., Perlota P., Baranton G. & Sain Girons I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* In clinical samples. J. Clin. Microbiol. 2219-224.
- Morey R. E., Galloway R. L., Bragg S. L., Steigerwalt A. G., Mayer L. W. & Levett P. N. 2006. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 44 (10):3510-3516.
- Mourão G., Coutinho M., Mauro R., Campos Z., Tomás W. & Magnusson W. 2000. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil. Biol. Conservation, 92:175-183.
- Mourão G.M., Coutinho, M.E., Mauro, R. de A. Tomás, W. M. & Magnusson W. 2002. Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos. Comunicado técnico/ Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil. 28: 22 p
- Pinho A.P.B., Moraes C.C.G., Santos R.B., Dias H.L.T., Menezes A.M.C., Oliveira A.L., Silva J.S., Sena N.M. & Vasconcellos S.A. 2007. Sorovares de *Leptospira interrogans* e respectivas ocorrências em equídeos de tração da ilha de Maiandeuá (Algoal), Pará. Inst. Biol. São Paulo. 69 (2): 113-198.
- Piovezan, U., Zucco A.C. & Lopes, F.R. Uso de dardos anestésicos para a captura de veados campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) 2006. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil, 22 p.
- Radstone J.S. & Woodward M.J. 1996. The development of a ligase mediated PCR with potential for the differentiation of serovars within *Leptospira interrogans*. Vet. Microbiol. 51: 351-362.

- Rodela L. G., Queiroz Neto J.P. & Santos S. A. 2007. Classificação das pastagens nativas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, por meio de imagens de satélite. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, INPE . 4187-4194.
- Rodrigues A.M.A. 2008. Leptossírose canina; diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo. 116p.
- Rodrigues F.H.G., Medri, I.M., Tomás W.M. & Mourão G. M. 2002. Revisão do conhecimento sobre ocorrência e distribuição de Mamíferos do Pantanal. Comunicado técnico/Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil. 38: 41 p.
- Sambrook K., Fritsch E. & Maniatis T. 1987. Molecular cloning – Laboratory manuals. 2º ed. 1:1.25-1.30.
- Scarcelli E., Piatti R.M., Fedullo J.D.L., Simon F., Cardoso M.V., Castro V., Myashiro S. & Genovez, M.E. 2003. *Leptospira spp.* detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical sample of captive Black-Capped Capuchin Monkey (*Cebus apella*). Braz. J. Microbiol. 34: 143-146.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599. (Publication PDF at).
- Tiepolo L. & Tomas W. M. 2006. Ordem Artiodactyla. In: Nélio R. Reis; Adriano L. Peracchi; Wagner A. Pedro; Isaac P. Lima. (Org.), Mamíferos do Brasil. Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 283-303
- Tomás W.M., McShea W., Miranda G.H.B., De Moreira, J. R., Mourão G.E & Lima Borges P. A. 2001. A survey of pampas deer, *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* (Artiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal Wetland, Brazil using the distance sampling technique. Anim. Biol. Conserv. 24 (1): 101-106.
- Tomás W. M., Zucco C. A., Fernandez, F. A., Harris, M., Cardim, E. N., Cestari, C., Costa, R. L. Da, Ferreira, V. L., Hulle, N. L., Indrusiak, C. B., Kalerhoff, M., Medeiros, T. T., Michelson, A., Pinheiro, R. T., Rimoli, J., Santos, A., Santos Neto, J. R., Tapia, G. L. G. & Tortato, M. A. 2004. Estimativa da abundância das populações de cervo (*Blastocerus dichotomus*) e veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no parque estadual do Pantanal do Rio Negro, M.S. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, 4. **Anais...** Corumbá, ms: Embrapa Pantanal.
- Uhuart M.M., Vila A.R., Beade M.S., Balcarce A. & Karesh W. B. 2003. Health evolution of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. J. Wildl. Dis. 39: 887-893.
- Van Eys G. J. J. M., Gravekamp C., Gerritsen M. J., Quint W., Cornelissen M. T. E., Ter Schegge J. & Terpstra, W. J. 1989. Detection of *Leptospira* in urine by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27 (10): 2258-2262.
- Vaughan T.A. 1986. Mammalogy. Saunders College Publishing. Fort Worth. 3 ed. 576 p.

ARTIGO II

Levantamento de *Leptospira* spp. em mamíferos silvestres do Pantanal por meio de técnicas sorológicas e moleculares.

Anahí S. Vieira & Aiesca O. Pellegrin

ABSTRACT.-Vieira A.S. & Pellegrin A.O. [Survey of *Leptospira* spp. wild mammals in the Pantanal by serological and molecular techniques.] **Levantamento de *Leptospira* spp. em mamíferos silvestres do Pantanal por meio de técnicas sorológicas e moleculares.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: Anahi_sv@yahoo.com.br

A survey of *Leptospira* spp. wild mammals was performed in the southern Pantanal of Mato Grosso by microscopic agglutination test (MAT) test and polymerase chain reaction (PCR). The serovars most frequently in animals investigated were Hardjobovis (28%), Icterohemorragie (12%), isolated 110/2006 (isolated from *C. thous*) (16%), Canicola (L014 isolated from *Bos taurus*) (4%), Wthicombi (4%), Pomona (20%), autumnalis (12%) and Copenhageni (M9/99 isolated *Rattus norvegicus*) (4%). Of the 79 samples tested by PCR, 21 (26.58%) were positive, and amplified a fragment of approximately 331pb. Two amplified fragments obtained from samples of *Cerdocium thous* were cloned and sequenced and phylogenetic analysis identified as *L. interrogans*.

INDEX TERMS: Leptospirosis, Wildlife, PCR, Serology, Pantanal

RESUMO.- Foi realizado um levantamento de *Leptospira* spp. em mamíferos silvestres do Pantanal sul-mato-grossense por meio de soroaglutinação microscópica (SAM) e ensaio da polimerase em cadeia (PCR). Os sorovares de maior frequência nos animais investigados foram Hardjobovis (28%), Icterohemorragie (12%), isolado 110/2006 (isolado de *C. thous*) (16%), Canicola (isolado L014 de *Bos taurus*)(4 %), Wthicombi (4%), Pomona (20%), Autumnalis (12%) e Copenhageni (isolado M9/99 de *Rattus norvegicus*)(4%). Das 79 amostras testadas pela

PCR, 21 (26,58%) foram positivas, sendo amplificado um fragmento de aproximadamente 331pb. Dois fragmentos amplificados obtidos de amostras de *Cerdocium thous* foram clonados e sequenciados e pela análise filogenética identificadas como *L. interrogans*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leptospirose, Animais silvestres, PCR, Sorologia, Pantanal

INTRODUÇÃO

A leptospirose é considerada uma doença re-emergente e mundialmente distribuída, que afeta animais silvestres, domésticos e o homem. Esta doença é causada por espiroquetas pertencentes à família Leptospiracea e gênero *Leptospira*. Esta enfermidade tem acarretado elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional, cujo principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo, devido aos abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerros fracos, mastite e agalaxia (Barr & Anderson 1993). A doença ocorre tanto em animais domésticos como silvestres e tem o homem com ponto final da cadeia epidemiológica (Scarcelli et al. 2003).

A transmissão direta é provavelmente a principal forma de manutenção da leptospirose dentro de um rebanho (Ellis 1994) e pode ocorrer pelo contato com a urina de animais infectados, descarga uterina pós-aborto e líquido de placenta, por contato sexual e ainda por via transplacentária. A transmissão indireta ocorre pela exposição do animal a um ambiente contaminado ou por inseminação artificial. As infecções incidentais, determinadas por amostras mantidas por outras espécies domésticas ou silvestres, ocorrem geralmente de forma indireta (Bolin & Alt 1999).

Um dos maiores desafios dos estudos de leptospirosas tem sido a tipificação de ambientes e modos de transmissão, que são altamente dependentes dos sorovares; e somente alguns sorovares podem ser endêmicos numa região particular, sendo que cada um tende a ser mantido em seu hospedeiro específico. Isto mostra que a epidemiologia da leptospirose em animais domésticos é extremamente complexa porque estes podem ser infectados por qualquer sorovar patogênico.

Como por exemplo, o sorovar Hardjo (Hardjobovis e Hardjoprajitno), mantido pelo bovino, tem sido isolado de outras espécies de animais domésticos, destacando-se a importância dos bovinos na cadeia epidemiológica de transmissão. Em bovinos, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis está associada com infecção renal crônica, sendo excretada em maior quantidade pela urina e *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno está mais comumente associada com problemas reprodutivos. Além do sorovar Hardjo, outros sorovares de *Leptospira* spp são considerados agentes causadores de aborto em vacas: Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Balcanica, Canicola, Ballum, Bataviae, Autummalis e Saxkoebing (Faine et al. 1999).

Embora a pesquisa sobre a leptospirose em animais silvestres tenha avançado em vários países, no Brasil as informações sobre o tema ainda são esparsas e pontuais, deixando uma lacuna no conhecimento da cadeia epidemiológica da doença, o que dificulta a elaboração de planos de controle em regiões com grande densidade de animais silvestres e ambientes ecologicamente favoráveis (Girio et al. 2003).

No Pantanal, as condições ecológicas são altamente favoráveis a ocorrência de leptospirose bovina, uma vez que o agente sobrevive mais tempo em áreas alagadas e de temperaturas elevadas (Lins et al. 1986).

A presença de doenças em populações selvagens, mesmo sem a ocorrência de surtos epidêmicos, pode ser um importante indicador de distúrbio ecológico, refletindo modificações no ecossistema ou bioma e conseqüentemente afetando os seus padrões de sustentabilidade.

O diagnóstico recomendado pela Organização Mundial da Saúde é a soroaglutinação microscópica (SAM) considerado como “Padrão-Ouro” (OIE 2006), porém esta técnica apresenta alguns inconvenientes, como reação cruzada entre os vários sorovares, principalmente do mesmo sorogrupo.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de detecção direto, rápido, sensível e específico, podendo ser utilizada diretamente em amostras clínicas como sangue, urina ou humor aquoso (Ball et al. 1994, Mérien et al. 1992). Esta técnica, embora não seja capaz de identificar os sorovares infectantes, tem sido utilizada para a detecção da infecção no homem e em animais domésticos, porém não tem sido adotada como técnica de triagem para a detectar animais silvestres portadores de *Leptospira* spp.

Os objetivos deste trabalho foram identificar espécies de mamíferos infectados pela *Leptospira* spp. na região do Pantanal utilizando as técnicas de SAM e PCR, bem como os principais sorovares circulantes nessas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo:

As áreas estudadas estão localizadas na região central do Pantanal brasileiro, conhecido como Pantanal da Nhecolândia (18° 59' 115'' S, 56° 37' 63'' N), que incluiu o campo experimental da Embrapa Pantanal e propriedades circunvizinhas.

O clima desta região é considerado, tipicamente pantaneiro subúmido, com temperaturas elevadas (19 a 28°), e estação seca de mais de quatro meses anual, com médias pluviométricas de 1.200 mm/ano (Garcia & Castro 1986).

As unidades de vegetação estão dispostas em mosaico, alternando cerradões e florestas estacionais nas “Cordilheiras”, campos úmidos e sazonais, nas partes alagáveis e circulando lagoas; cerrados e campos nas partes intermediárias do relevo (Rodela et al. 2007).

Amostras:

Foram capturados 164 animais assim distribuídos: 49 *Trichomys pachyurus*, oito *Oecomys mamorae*, um *Myrmecophag. tridactyla*, 38 *Cerdocyon thous*, dois *Euphactus sexcinctus*, nove *Leopardus pardalis*, 55 *Nasua nasua* e duas *Panthera onca*.

Os animais foram capturados por meio de armadilhas e contenção química conforme as recomendações do guia de captura, manuseio e cuidados com animais, aprovados pela sociedade Americana de Mastozoologia (Animal Care and Use committee, 1998). A captura foi realizada com licença ambiental do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis (IBAMA): (16010-1) 6425591/33454426, (003/2006) 0214.000540/2005-82, (006/20007) 02038.000114/06-90, (005/2007) 02014.000382/2007-22, (015/2007) 02014.000419/07-97, (003/2006) 0214.000540/2005-82.

Para a captura dos roedores, *T. pachyurus* (rato do campo), *O. mamorae* (rato do campo) e *Xenarthas M. tridactyla* (tamanduá-bandeira) e *E. sexcinctus* (tatu) foram utilizadas armadilhas do tipo *Sherman* e *Tomahawk* dispostas em transectos. Os animais capturados foram anestesiados para coleta de sangue por punção cardíaca (roedores) e os demais por coleta na veia cefálica ou safena.

A captura de carnívoros como *N. nasua* (quatis), *C. thous* (lobinho) e de espécies solitárias, como *L. pardalis* (jaguaritica), *P. onca* (onça pintada), foram feitas utilizando-se de armadilhas do tipo *Tomahawk*. Os animais foram anestesiados e coletado sangue, acondicionado em tubos com e sem anticoagulante (EDTA) para obtenção de soro e papa de hemáceas, respectivamente.

Teste de Soroaglutinação Microscópica

A pesquisa de anticorpos aglutinantes anti-leptospiras, foi efetuada pela reação de soroaglutinação microscópica de acordo com Cole Jr. et al. (1973). Para o diagnóstico foi utilizada uma coleção de antígenos vivos, representantes de 19 sorogrupos de *Leptospira interrogans*, composta pelos sorovares: Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Autumnalis, Pomona, Grippotyphosa, Hebdomadis, Wolffii, Bratislava, Harjjobovis e Hardjoprajitno, Castellonis, Batavie, Whitcombi, Cynopteri, Butembo, Javanica, Panamá, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Patoc e Sentot. Além dessas foram utilizados antígenos representando estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, de animais domésticos e silvestres (Fig. 1).

Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 175 µl de papa de hemácia, adicionando-se 25 µl de PROTEINASE K (20 mg/mL) e incubando-se a 65°C/15 minutos. A seguir foram adicionados 250 µl de SDS 10% (Dodecil Sufato de Sódio), homogeneização por inversão e incubação a 65°C/6 minutos. Foram adicionados 400 µl de clorofórmio, agitação vigorosa em vortex, colocação de 200 µl da solução de precipitação protéica (3M C2H3KO2, 2M CH3COOH) e nova homogeneização. A amostra foi centrifugada por 14000×g/10 minutos. O sobrenadante foi colhido e tratado com 500 µl de etanol P.A. refrigerado e, em seguida, homogeneização por inversão até formar um precipitado. Posteriormente procedeu-se a

centrifugação a 14000×g/5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foram adicionados 500 µl de etanol 70%. Logo após, a amostra foi centrifugada a 14000×g/3 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µl de Tris EDTA (10 mM Tris HCl pH 7,4, 1mM EDTA pH 8.0) e estocado a –20°C (Sambrook et al. 1987).

Código Identificação	Espécie animal de onde foi isolada	Instituição(ções) envolvidas no isolamento	Espécie	Sorogrupo identificado*	Sorovar identificado
4-B (VPS) (An 776 original)	Gambá (<i>D.marsupialis</i>)	Instituto Biológico São Paulo – CDC USA	<i>L.santarosai</i>	Bataviae	Brasiliensis**
M 7-87	Suíno (<i>Sus scrofa</i>)	VPS -FMVZUSP	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Pomona#
M 4/98	Búfalo (<i>B.bubalis</i>)	VPS- FMVZ USP	<i>L.santarosai</i>	Sejroe	Guaricura#
M 9/99	Rato (<i>R.norvegicus</i>)	VPS FMVZ USP Fundação Parque Zoológico S.Paulo	<i>L.interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhagenii #
LO-1	Cão doméstico (<i>C.familiaris</i>)	Universidade Estadual de Londrina	<i>L.interrogans</i>	Canicola	Canicola#
LO-4	Suíno (<i>Sus scrofa</i>)	Universidade Estadual de Londrina	<i>L.interrogans</i>	Pomona	Pomona#
LO 14	Bovino(<i>Bos taurus</i>)	Universidade Estadual de Londrina	<i>L.interrogans</i>	Canicola	Canicola#
2 A CAP	Capivara (<i>H.hidrochaeris</i>)	VPS FMVZ USP	<i>L.santarosai</i>	Griptyphosa	Bananal#
M 110/2006	Carnívoro silvestre (<i>C.thous</i>)	EMBRAPA VPS FMVZ USP		???	???

* aglutinação cruzada com antisoro policlonal

**absorção de aglutininas.

aglutinação com kit de anticorpos monoclonais

??? não identificado

Fig.1. Estirpes de leptospiiras isoladas de animais segundo código de identificação, espécie animal de onde foi isolada, Instituição(ções) que participaram do isolamento, espécie, sorogrupo e sorovar identificados.

Controle Positivo

O controle positivo foi obtido de uma cultura em meio semi-sólido (Fletcher®) de *Leptospira interrogans*, sorovar Hardjo (Hardjoprajitno), cedida pela Agência Estadual de Defesa Sanitária e Vegetal do Estado de Mato Grosso do Sul (IAGRO).

Desenho dos oligonucleotídeos

O par de oligonucleotídeos utilizado foi desenhado segundo Mérien et al. (1992), com a amplificação de um produto de aproximadamente 331 pares de bases, que corresponde a uma região conservada do gene *16S* da estrutura primária de *Leptospira* spp. O oligonucleotídeo A: 5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3', corresponde à região de nucleotídeos 38 até 57 e o oligonucleotídeo B: 5' TTCCCCCATTGAGCAAGATT 3', corresponde à região do nucleotídeo 348 até 368. A especificidade do oligonucleotídeo foi testada por Mérien et al. (1992) utilizando varios organismos patogenicos como: *B. burgdoferi* B 31, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum*, *Spirochaeta aurantia*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* grupo D, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Amplificação dos genes pela técnica de PCR

A reação de PCR foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeo descrito acima, em termociclador de gradiente (Eppendorf Mastercycler Gradiente), com um volume final de 20 µl contendo 2 µl de tampão de PCR 10X (100 mM Tris-HCL pH 8,5, 500 mM KCL), 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 0,02 U de taq DNA polimerase (Iud®), 0,25 pmoles de cada oligonucleotídeo, e 1µL de DNA molde. Os produtos da amplificação foram resolvidos por eletroforese a 100 V por 1 hora, separados por gel de agarose a 1%, corados com Syber Gold (Ivitrogen®) e visualizados por meio do sistema de captura de imagem X-ILP (Loccus®) com transluminador sob luz ultravioleta. A sensibilidade analítica da PCR empregada já havia sido previamente estimada em 280 ng/µl (Vieira et al. 2009).

Clonagem dos Genes a partir do Produto de PCR

Para a clonagem dos fragmentos de DNA do gene *16S* dos diferentes isolados de *Leptospira* spp. foram adicionados em microtubos de 1,5 ml, 1 µl do vetor pGEM-T Easy (Promega®), 3 µl do produto de PCR, 1 µl da enzima Ligase T4, e 5 µl de tampão da ligação.

Após este procedimento foi realizado a transformação utilizando células *E. coli* TOP 10 F quimicamente competente.

Os clones recombinantes foram selecionados em meio Luria-bertani (LB) agar contendo 100 µg/ml de ampicilina. A triagem das colônias foi realizada através da utilização do X-gal e IPTG. Os clones recombinantes foram propagados em LB líquido com ampicilina.

Os plasmídeos foram extraídos através da minipreparação de plasmídeos segundo Sambrook et al. (1987).

Sequenciamento

As amostras obtidas na minipreparação de plasmídios foram sequenciadas por meio do método de Sanger, que emprega o didesoxi ou terminadores de cadeia, em sequenciador automático ABI 3100 de 16 capilares (Applied Biosystems), segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram sequenciadas com os oligonucleotídeos do gene *16S* de *L. interrogans* e com o oligonucleotídeos do vetor pGEM-T Easy e posteriormente analisada por meio do Blast N, que consiste em uma busca heurística desenvolvida para ser uma alternativa mais rápida para comparar sequências. Esse programa é capaz de comparar sequências de nucleotídeos contra um banco contendo milhares de sequências). (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Análise Filogenética

As amostras sequenciadas foram alinhadas com o auxílio do programa Mega 4.0 (Tamura et al. 2007). Os tamanhos das sequências variaram de 166 a 246 pb. Os fragmentos analisados neste trabalho não correspondem a sequência completa do gene *16S* de *Leptospira* spp.

A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbour-Joining (NJ), versão simplificada do método de mínima evolução (ME), que utiliza a distância medida para corrigir os vários acessos ao mesmo local (como o número de substituições de nucleotídeos ou aminoácidos), o qual escolhe uma topologia mostrando o menor valor da soma de todos os ramos como uma estimativa correta da árvore.

Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas sequências (Quadro 1) que estão disponível no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Bioestat*, (Ayres et al. 2005) utilizando o teste do Qui-quadrado (χ^2) com tabela de contingência 2 x 2, utilizando correção de Yates quando necessário e Odds Ratio (Ayeres et al. 2005). Os testes foram aplicados somente nas amostras de *C. thous* e *N. nasua*, para comparar os resultados positivos dos testes SAM e PCR.

Quadro 1. Número de acesso no GenBank de *Leptospira* spp. correspondente, utilizado para a construção da árvore filogenética para análise parcial do gene *16 S*

Nº de Acesso	<i>Leptospira</i>
AY714984.1	<i>Leptonema illini</i> Illini
FJ154579	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Castellonis
AM050569	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Hardjo (Hardjobovis)
FJ154600	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Javanica
FJ154595	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Tarassovi
FJ154593	<i>Leptospira borgpetersenii</i> Sejroe
FJ154580.1	<i>Leptospira weilii</i> Celledoni
EU159692	<i>Leptospira biflexa</i> Patoc
FJ 154543.1	<i>Leptospira interrogans</i> Autumnalis
FJ154557.1	<i>Leptospira interrogans</i> Australis
DQ991469.1	<i>Leptospira interrogans</i> Bataviae
AM050586.1	<i>Leptospira interrogans</i> Bratislava
DQ991472.1	<i>Leptospira interrogans</i> Canicola
AY996790.2	<i>Leptospira interrogans</i> Copenhageni
AM050570	<i>Leptospira interrogans</i> Hebdomandis
AY996796.1	<i>Leptospira interrogans</i> Hardjo(Hardjoprajitno)
FJ154549.1	<i>Leptospira interrogans</i> Icterohaemorrhagiae
FJ154544.1	<i>Leptospira interrogans</i> Pomona
FJ154552.1	<i>Leptospira interrogans</i> Pyrogenes
EUA497661	<i>Leptospira interrogans</i> Wolffii
DQ 991478.1	<i>Leptospira kirschneri</i> Butembo
AY631895.1	<i>Leptospira kirschneri</i> Cynopteri
FJ 154572.1	<i>Leptospira kirschneri</i> Grippotyphosa
FJ154582.1	<i>Leptospira noguchii</i> Panamá
FJ154580.1	<i>Leptospira weilii</i> Celledoni
AY631883	<i>Leptospira santarosai</i> Shermani
AY293856.1	<i>Turneriella parva</i> parva

RESULTADOS

A frequência de animais sorologicamente positivos para a *Leptospira* foi de 22,97% de animais reagentes positivos (Quadro 2). O número de reações aproveitadas foi de 24 e as de variantes sorológicas mais prováveis observadas foram Hardjobovis (28%), Icterohemorragie (12%), isolado 110/2006 (16%), Canicola (isolado L014 de *Bos taurus*) (4%), Wthicombi (4%), Pomona (20%), Autumnalis (12%) e Copenhageni (isolado M9/99 de *Rattus norvegicus*) (4%) (Quadro 3).

Das 79 amostras testadas por meio da PCR para *Leptospira* spp. 21 animais (26,58%) apresentaram um fragmento de aproximadamente 331pb (Fig. 2),

Quadro 2. Número de animais examinados, porcentagem de reagentes no teste de SAM e positivos na PCR

Animais	Examinados SAM	% Reagentes SAM	Examinados PCR	% Reagente PCR
<i>T. pachyurus</i>	49/5	10,2	13/2	15,38
<i>O. mamorae</i>	8/0	0	0	0
<i>M. tridactyla</i>	1/0	0	0	0
<i>C. thous</i>	38/13	34,21	26/10	38,46
<i>N. nasua</i>	45/15	34,09	32/9	28,12
<i>L. pardalis</i>	6/1	14,28	4/0	0
<i>E. sexcinctus</i>	1/0	0	2/0	0
<i>P. onca</i>	0	0	2/0	0
Total	148/34	22,97	79/21	26,58

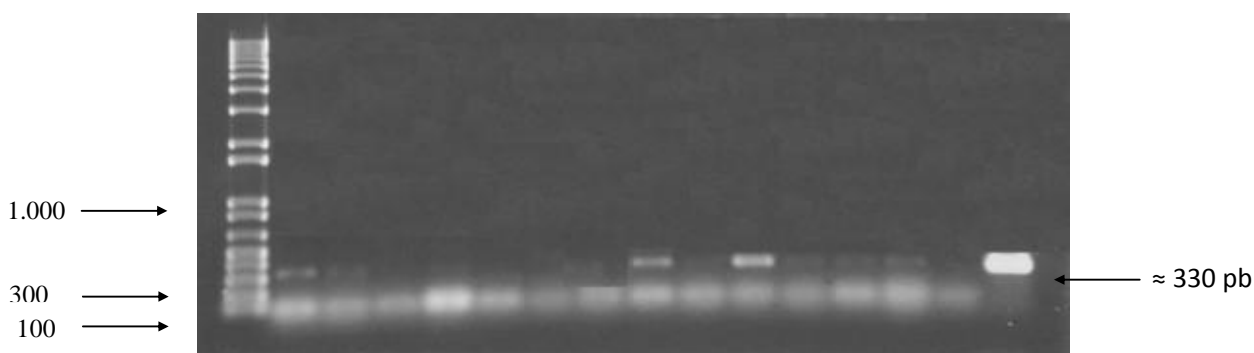


Fig. 2. Resultado da PCR em gel de agarose 1% para detecção de *Leptospira* spp. em mamíferos silvestres utilizando uma sequência parcial do gene *16S*. PB (marcados de pares de bases 1 Kb plus Ivitrogen®), 1 (*T. pachyurus* positivo), 2 (*T. pachyurus* positivo), 3 (*P. onca* negativo), 4 (*P. onca* negativo), 5 (*L. pardalis* negativo), 6 (*L. pardalis* negativo), 7 (*E. sexcinctus* negativo), 8 (*C. thous* positivo), 9 (*C. thous* negativo), 10 (*C. thous* positivo), 11 (*N. nasua* positivo), 12 (*N. nasua* positivo), 13 (*N. nasua* positivo), 14 (*N. nasua* negativo) e C+ (controle positivo *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno).

Quadro 3. Reações aproveitadas e o percentual de variantes sorológicas mais prováveis no SAM

ESPÉCIE								
Nº de reagentes	<i>C. thous</i>	<i>E. sexcinctus</i>	<i>L. pardalis</i>	<i>M. tridactyla</i>	<i>N. nasua</i>	<i>O. mamorae</i>	<i>T. pachyurus</i>	Tota <i>l</i>
Animais	13	0	1	0	15	0	5	34
Mais prováveis*	10	0	1	0	13	0	1	25
SOROVAR		Sorovares mais prováveis (%)**						
Hardjobovis	50	nr***	nr***	nr***	15,37	nr***	nr***	
Icterohaemorrhagiae	nr	nr***	100	nr***	7,7	nr***	100	
Grippotyphosa	nr	nr***	nr***	nr***	Nr	nr***	nr***	
110/2006	10	nr***	nr***	nr***	23,07	nr***	nr***	
Lo14	10	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
Wthicombi	10	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	
Pomona	10	nr***	nr***	nr***	38,46	nr***	nr***	
Autumnalis	10	nr***	nr***	nr***	7,7	nr***	nr***	
Australis	nr***	nr***	nr***	Nr	nr***	nr***	nr***	
Bratislava	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
Cynopteri	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
Copenhageni	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
M9/99	nr	nr***	nr***	nr***	7,7	nr***	nr***	
GR6	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
L04	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
Castellonis	nr	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	
Pyrogenes	nr	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	
L01	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
5M7/87	nr	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
2 ACAP	nr***	nr***	nr***	nr***	nr	nr***	nr***	
Tarassovi	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr	
Hardjpretjitno	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr	
Wollfi	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr***	nr	

* número de reações aproveitadas, sendo desconsideradas aquelas com título mais alto idêntico para dois ou mais sorovares

** percentual de reações por sorovar, considerando apenas os reagentes mais prováveis

*** nr: não reagente

O par de oligonucleotídeos utilizados amplificou todos os sorovares utilizados na bateria de SAM (Fig. 3) e a sensibilidade analítica da reação de PCR foi de 280 fg/ μ l da concentração de DNA do controle positivo. Foi possível visualizar banda, em gel de agarose a 1% corado com Syber Gold, quando o DNA foi diluído até $1:10^{-6}$ (Fig. 4).

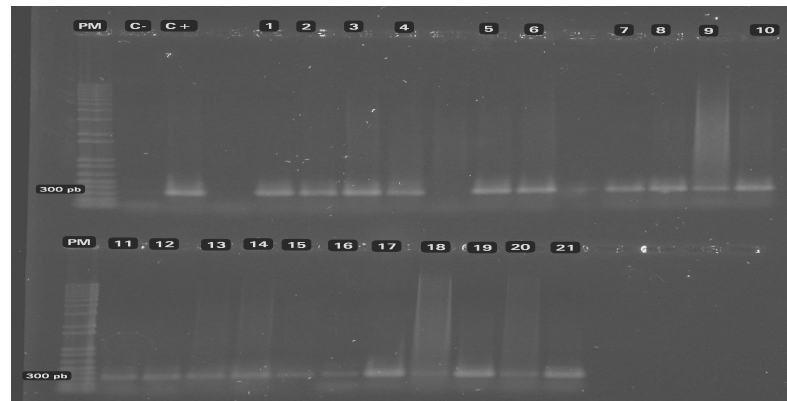


Fig. 3. Resultado da PCR em gel de agarose 1% para a detecção de *Leptospira* spp das culturas de *Leptospira* em meio líquido, utilizadas na bateria SAM. PM (marcador de pares de bases 1kb plus Invitrogen®) C+ (controle positivo *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno), C- (controle negativo); 1-Australis; 2-Castellonis; 3-Bratislava; 4-Butembo; 5-Bataviae; 6-Canicola; 7-M7/87 –Suíno; 8-Whitcombi; 9-Cynopteri; 10-Grippotyphosa; 11-Hebdomadis; 12-Icterohaemorrhagiae; 13-M4/98-Bubalino; 14-Copenhageni; 15-Javanica; 16-M999 Rato-Rattus norvergicus; 17-Pamana; 18-Pomona; 19-Pyrogenes; 20-Hardjoprajitno; 21-Hardjobovis.

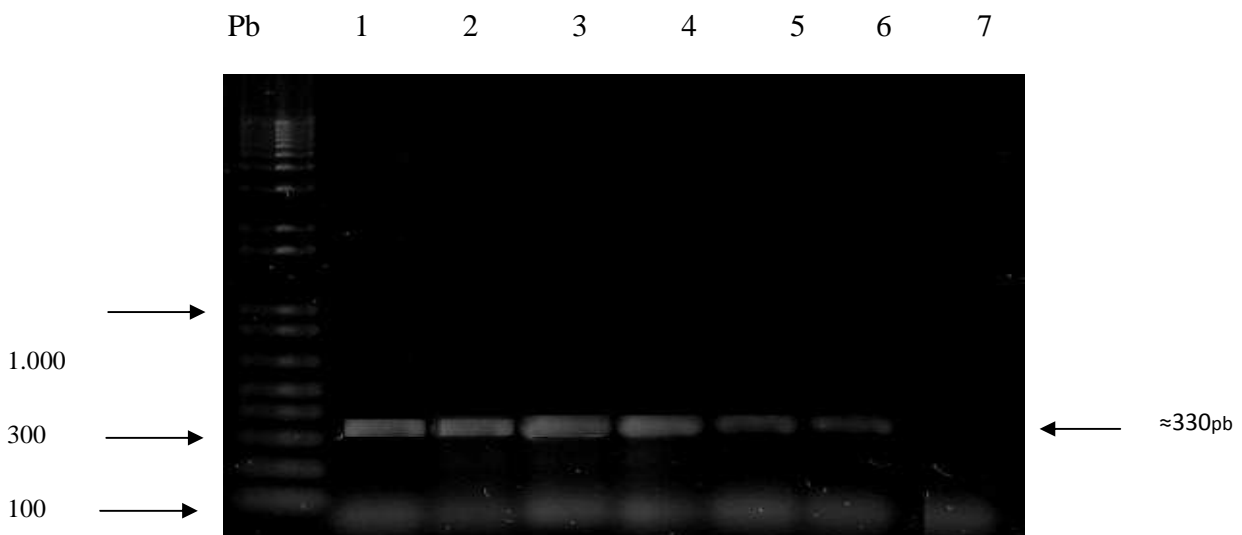


Fig. 4. Resultado da PCR em gel de agarose 1% da diluição seriada do DNA controle positivo até $1:10^{-7}$. Linha 1: Pb (marcado de pares de base 1Kb plus Invitrogen®), Linha 2 a 7: $10^{-1} - 10^{-7}$ (diluição seriada do controle positivo na base 10).

As amostras positivas de *C. thous*, 21 e 39 foram clonadas e sequenciadas. Após o sequenciamento, foi realizado o alinhamento com auxílio do programa Mega 4.0 (Tamura et al. 2007) para se obter a sequência consenso, esta analisada por meio do Blast N. Os resultados indicaram que o isolado *C.thous* 21 teve 99% de identidade (1e-121) com *L. interrogans* sorovar Copenhageni (Fig. 5), número de acesso no *GenBank* FJ154569.1 e o isolado *C. thous* 39 teve 97% de identidade(1e-69) com *L. interrogans* sorovar Sejroe (Fig. 6), número de acesso FJ154558.1.

FJ154569.1 *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Wijinberg 16S ribossomal RNA gene, sequência parcial. 99% de identidade e 1e-121

Query 1 AGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCTGA 60
 |||
 Sbjct 18 AGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCTGA 77

Query 61 GTCTAGGATAACCTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCGAGAGATCATAAGAT
 120
 |||
 Sbjct 78 GTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCGAGAGATCATAAGAT
 137

Query 121 TTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAG
 180
 |||
 Sbjct 138 TTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAG 197

Query 181 GTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGG
 240
 |||
 Sbjct 198 GTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGG
 257

Query 241 AACTGA 246
 |||
 Sbjct 258 AACTGA 263

Fig. 5 - Identidade no Blast N, sequência parcial do gene 16S, do isolado de *C. thous* 21 com *L. interrogans* Copehnageni.

FJ154558.1 *Leptospira interrogans* sorovar Sejroee cepa 3705 16S ribossomal RNA gene, sequência parcial. 97% de identidade 1e-69.

```
Query 6  GCGCGTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAACAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTA
65
      |||
Sbjct 3  GCGCGTCTTAAACATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTA 62

Query 66 ACACGTGGGTAATCTTCCTCTGAGTCTAGGATAACCTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGG
125
      |||
Sbjct 63 ACACGTGGGTAATCTTCCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGG 122

Query 126 ATGGTCCCGAGAGATCATAAGATTTTTTCGGGAAAAGAT 163
      |||
Sbjct 123 ATGGTCCCGAGAGATCATAAGATTTTTTCGGGTAAAGAT 160
```

Fig. 6. Identidade no Blast N, sequência parcial do gene 16S, do isolado de *C. thous* 39 com *L. interrogans* Serjroee.

Com os resultado apresentados foi construída a árvore filogenética, pelo alinhamento de sequências parciais do gene 16S depositadas no *GenBank*, pelo método de Neighbour-Joining. Após a separação de *Leptospira biflexa* patoc, *Leptonema ilinni* Illini e *Tuneria parva* Parva, utilizadas como *out group* (Morey et al. 2006) obteve-se um grande grupo das leptospiros patogênicas. Os isolados de *C. thous* ficaram dentro do grupo de *Leptospira interrogans* (Fig. 7). Os isolados de *C.thous* não apresentam diferença quanto à topologia do grande grupo de *L. interrogans*, pois estão dentro do mesmo clado, significando que estes estão muito próximos de *L. interrrogans*.

Com relação aos testes utilizados foram comparados somente os resultados de *C.thous* ($\chi^2= 0,244$; $p=0,6217$ e $OR= 1,500$; $p= 0,9345$ 8) e *N. nasua* ($\chi^2= 1,497$; $p= 0,2211$ e $OR= 3,333$; $p= 1,45$) não sendo evidenciada diferença significativa quanto a detecção de animais infectados quando utilizada a PCR ou a SAM.

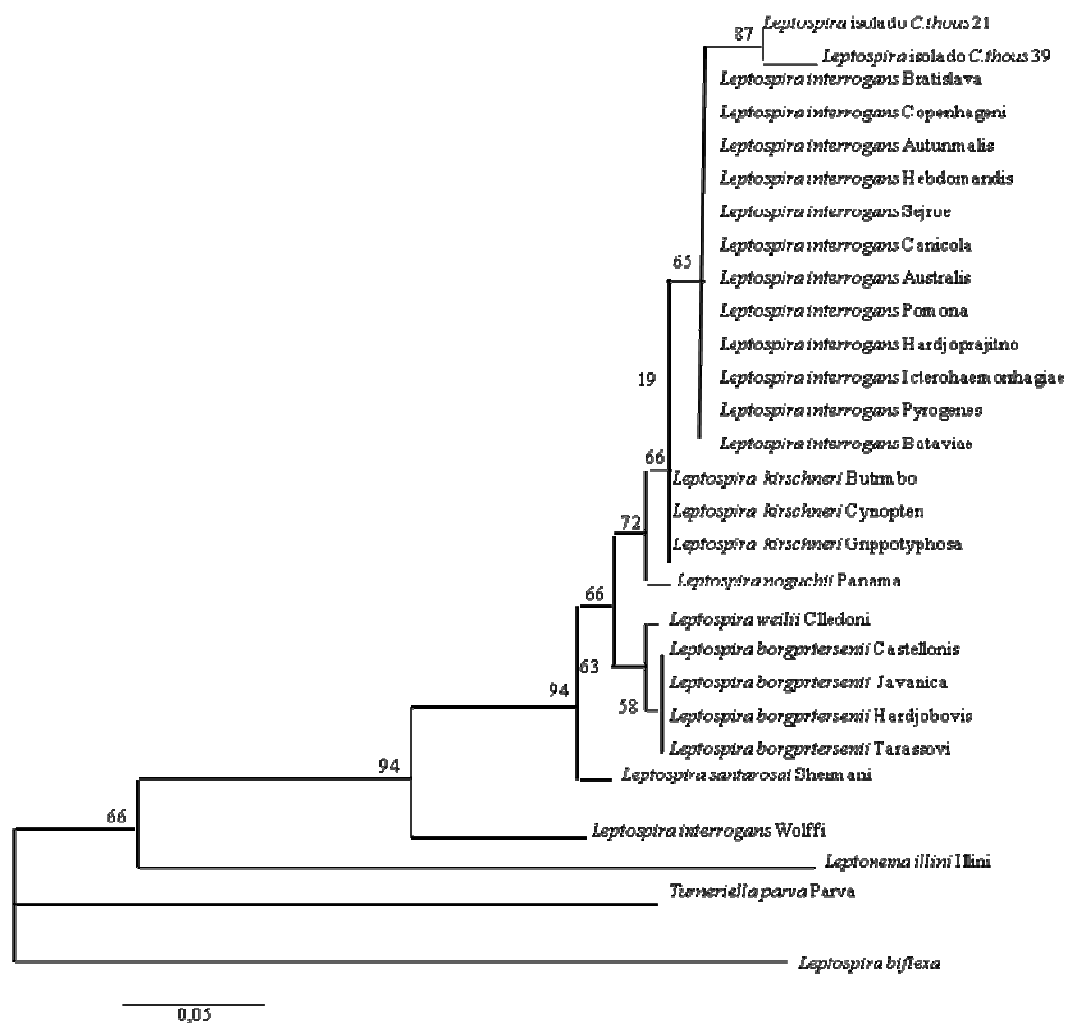


Fig. 7 - Filogenia de *Leptospira* ssp. construída a partir do alinhamento de sequências parciais do gene *16S*. Método utilizado foi o de Neighbour-Joining. O suporte de cada clado foi determinado por 1000 *bootstraps* indicando o valor dos nós internos (%).

DISCUSSÃO

Os dados apresentados demonstraram que os *N. nasua* e os *C.thous* são as espécies que apresentam maior frequência de reações positivas para *Leptospira* spp., qualquer que seja o teste diagnóstico utilizado, SAM ou PCR.

Como já foi demonstrado em outro trabalho e com outros patógenos (Herrera et al. 2008) o *N. nasua* pode ser um potencial reservatório de doenças no Pantanal, além de apresentar

grande densidade nessa região (1.5 indivíduos/Km²), habitando todos os biomas. O mesmo pode ocorrer com o *C. thous*, que é a espécie mais avistada na região (Silva et al. 2004). Por outro lado, tanto o *C. thous* quanto o *N. nasua* são carnívoros e estão no topo da cadeia alimentar, regulando as populações de suas presas e dessa forma, influenciando toda dinâmica do ecossistema em que vivem (CENAP 2004).

Existe uma suposição, baseada no paradigma de que necessário um limiar de densidade de uma espécie para o estabelecimento e persistência de uma doença, que a escala de transmissão da mesma tem relação direta e positiva com a abundância da espécie hospedeira no ecossistema (Kermack & McKendrick, Anderson & May, 1979; May & Anderson, 1979). Nesse contexto, tanto o *N. nasua* quanto o *C. thous* podem ser consideradas espécies-chave na epidemiologia da Leptospirose no ecossistema estudado. Pelo fato de haver sobreposição das duas espécies na mesma área de uso isto poderia explicar a frequência de *Leptospira* spp. entre os *C. thous* e *N. Nasua*. Se considerarmos, também que, tanto os *C. thous* como os *N. nasua* buscam alimento no mesmo ambiente (Costa et al. 2006) e se localizam em regiões preferencialmente de lagoas e campos inundáveis (Rocha 2006) a transmissão poderia estar ocorrendo por meio do alimento e da água contaminada.

Em animais onívoros e oportunistas como o *N. nasua* e *C. thous*, a área de uso está bastante relacionada a dieta e de acordo com a disponibilidade de alimento que a mesma oferece qualitativa ou quantitativamente, para atender as necessidades das populações daquelas espécies (Juarez & Marinho-Filho 2002, Gompper 1995, Bisbal 1986).

O sorovar mais provável na espécie *C.thous* foi o Hardjobovis com 50% e na espécie *N. nasua* o sorovar Pomona com 38,46%. A literatura identifica que o sorovar Hardjobovis tem como hospedeiro natural os bovinos (Faine et al. 1999) e como hospedeiro acidental os ovinos e o homem (Radostits et al. 2000) e nesse trabalho observamos que os *C. thous* são também prováveis hospedeiros acidentais desse sorovar. Já o sorovar Pomona tem como hospedeiro natural os *Sus dometicus*, *Merphitis mephitis*, *Procyon cancrivorus* e *Didelphis* sp. e como hospedeiro acidental o bovino e o ovino (Radostits et al. 2000).

Neste estudo, foi possível verificar que ambas as espécies *C. thous* e *N. nasua* são hospedeiros acidentais para o sorvar Hardjobovis e Pomona respectivamente e provavelmente poderiam desenvolver a doença apresentando quadros clínicos e até morte dos animais além de

disseminar o agente nas áreas habitadas. No levantamento realizado por Proença (2007) foram amostrados sete indivíduos de *C. thous* de vida livre que habitavam a região da Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF, não tendo sido detectado nenhum animal portador de anticorpos anti- *Leptospira* spp., por meio da técnica de SAM.

Nesse levantamento foi observada uma frequência de animais positivos para a *Leptospira* spp. de 34,21% (38/13) por meio da SAM e 38,46% (26/10) por meio da PCR, e esses resultados se aproximam ao observado por Souza-Junior et al. (2006), no estado de Tocantins, onde 20% de *C.thous*, e 12.9% de *N. nasua* apresentaram anticorpos para o agente. No mesmo levantamento nenhum *E. sexcinctus* apresentou anticorpos para *Leptospira* spp., no entanto, o levantamento realizado no Tocantins apontou para a detecção de outros os sorovares como Fluminense e Javanica para *N. nasua* e Fluminense e Brasiliense para *C. thous*. Girio et al. (2003) testou nove *N. nasua* na mesma região desse estudo, não encontrando nenhum dos animais reagentes para *Leptospira* spp.

Silva et al. (2008) realizou um estudo com 38 indivíduos de *Euphactus* sp, de várias espécies, sendo três da espécie *E. sexcinctus*. Dos 38 espécimes examinados foi possível diagnosticar por meio de SAM, quatro animais positivos para *Leptospira* spp. sendo que destes, apenas um animal foi da espécie *E. sexcinctus* que apresentou reação positiva para o sorovar Hardjo e os demais reagiram com os sorovares Autumnalis, Grippytyphosa e Patoc.

Miranda (2008) realizou uma coleta em 21 indivíduos de tamanduá-bandeira de vida livre, detectando, no teste SAM, 57% (12/21) de animais reagentes. Dentre esses, seis dos animais positivos provinham da região do Pantanal de Mato Grosso (Reserva do SESC Pantanal) e três foram reagentes aos sorovares Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bataviae e Shermani. No presente estudo apenas um tamanduá-bandeira foi capturado e não reagiu com nenhum sorovar, sendo a amostra muito pequena para embasar qualquer conclusão.

Apesar dos roedores domésticos serem os principais transmissores e reservatórios para leptospirose em humanos ou no meio urbano, em *T. pachyurus* foi detectada uma frequência de 10,2% (SAM) e 15,38% (PCR) com um título igual a 100, considerado ponto de corte para uma reação positiva. Com relação a isso, temos que considerar que os roedores são reservatórios mais adaptados e por isso podem não ter apresentado altos títulos no SAM, entretanto, quando comparamos os resultados da PCR, dois animais não reagentes na prova de SAM foram

positivos, o que é bastante justificado uma vez que a PCR, realizada em amostra de sangue detecta o agente em sua fase de bacteremia e a SAM detecta a presença de anticorpos, em fase posterior a essa. Dentre o sorovar mais provável está o Icterohaemorrhagiae, para o qual os roedores são considerados reservatórios, sendo que não existem trabalhos sobre *Leptospira* spp infectando *T. pachyurus*, embora isto altamente provável de ocorrer no Pantanal, ecossistema que reúne todas as condições ecológicas para manter a enfermidade de forma endêmica.

Os sorovares mais prováveis infectando os carnívoros foram o Hardjobovis, Pomona e Icterohaemorrhagiae, porém este último apareceu somente em um *L. leopardis*, que foi o único indivíduo positivo para *Leptospira* spp. Baixos títulos sorológicos apresentados por animais silvestres não devem ser conclusivos para atribuir uma condição ao animal de não infectado pois o ponto de corte de um teste pode variar conforme a espécie a a resposta dessa ao agente que está sendo pesquisado (Herrera et al. 2008), significando que as frequências de animais portadores muitas vezes detectadas podem, eventualmente, estar subestimadas.

Do espécime de *Cerdocyn thous* identificado como n^o 39 foi previamente isolado *Leptosopira* spp. (Delbem 2006, Comunicação pessoal)* sendo que este foi o primeiro isolado obtido de amostra de sangue de animal silvestre no Pantanal, entretanto a amostra está em fase de caracterização e o sorovar a qual pertence ainda não foi identificado. Nesse trabalho foi realizada a sorologia e a PCR de amostras desse indivíduo e o sorovar mais provável foi o Hardjobovis, com título de 1600 sendo também positiva frente à reação de PCR. Sua caracterização genética total ainda não está concluída, mas pela análise parcial do gene *16S* obtido no nosso estudo com sequências depositadas no *GenBank* podemos sugerir que este isolado possui maior identidade 97% (1e-69) com *Leptospira interrogans* sorovar Sejroe cepa 3705, número de acesso FJ154558.1. O sorovar Hardjobovis e Sejroe pertencem ao mesmo sorogrupo (Sejroe), entretanto somente o sorovar Hardjobovis estava presente na bateria de antígenos empregada no teste de SAM.

O antígeno denominado “isolado 110/2006” (*C. thous* – Pantanal) foi produzido com o isolado obtido do *C. thous* 39, em pesquisa anterior, e incluído na bateria utilizada na SAM. Quando as amostras de soro foram testadas para esse isolado, 10% dos *C. thous* (1/10) e 23,07% dos *N. nasua* (3/13) foram reagentes, sendo esse o sorovar mais provável o que indica que esta

amostra esta circulando no ambiente estudado e sugerindo que essas duas espécies estejam relacionadas na cadeia de transmissão da leptospirose.

Até o presente momento, não existe relato de nenhum trabalho utilizando a técnica de PCR como método de detecção do patógenos do gênero *Leptospira* spp. para as espécies estudadas, entretanto os oligonucleotídeos empregados já haviam sido utilizados anteriormente (Scarcelli et al. 2003) para detecção de *Leptospira* spp. em urina e rim de *Cebus apella* (macaco-prego). No presente estudo foi demonstrado que a utilização da PCR para a detecção de *Leptospira* spp. em sangue pode ser uma alternativa para a identificação de portadores silvestres do agente, facilitando o diagnóstico rápido da doença em indivíduos na fase de bacteremia, o que em animais de cativeiro pode servir para embasar medidas curativas visando debelar precocemente a doença e impedindo a morte dos animais pela leptospirose.

Agradecimentos - A Embrapa Pantanal pela colaboração na coleta das amostras de animais silvestres, a Embrapa Gado de Corte pelo suporte à realização das técnicas moleculares e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo apoio a realização das técnicas sorológicas. A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul- FUNDECT, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, a Embrapa Pantanal e Embrapa Gado de Corte pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Anderson, R.M. & May, R.M. 1979. Population biology of infectious diseases. Part I. *Nature*, **280**, 361–367.
- Ayres M., Ayres Jr. M., Ayres D.L., Santos A.A.S. 2005. Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas da ciências bio-médicas. 4º ed. Imprensa Oficial do Estado do Pará, Belém. 324p.
- Animal Care And Use Committee. 1998. Guidelines for capture, handling and care of mammals as approved by American Society of Mammalogists. *J. Mammalogy*. 78 (4): 1416-1431.
- Ball A.E., Gravekamp C., Hartskeerl R.A., De Meza-Brewster J., Korver H. & Terpstra W.J. 1994. Detection of Leptospire in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis. *J Clin Microbiol* 32: 1894-1898.
- Barr B.C. & Anderson M. L. 1993. Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 9: 343-368.

- Bisbal E.F.J. 1986. Food habits of some neotropical carnivores in Venezuela (Mammalia, carnívora). *Mammalia*,50(3):329-339.
- Bolin C.A. & ALT D.P.1999.Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. *Bov Pract.* 33(1):50-55.
- CENAP – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação dos Predadores Naturais. 2004. Plano de ação: pesquisa e conservação de mamíferos carnívoros do Brasil. IBAMA, São Paulo, 52p.
- Cole J.R, Sulzer C.R. & Pursell, A.A. 1973. Improved microtechnique for the Leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microb.* 25(6): 976-980.
- Costa J.C.R, Piovezan U. & Andriolo A. 2006. Fauna visitante junto a ceva preparada para atração de catetos (*Tayassu tajacu*) na fazenda Nhimirim, Sub-região da Nhecolândia, MS. Resumos. XXIX Semana de Biologia e XII Mostra de Produção Científica-UFJF Diretório acadêmico de ciências biológicas - Walter machado Couto: 5-7.
- Ellis W.A . 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Prac.* 10(3): 463-478.
- Faine S, Adler B, Bolin C & Perolat P. 1999. *Leptospira and Leptospirosis*. 2 ed. MediSci, Melbourne, Vic. Australia. 272p.
- Garcia E.A. & Castro L.H.R. 1986. Análise da frequência de chuva no Pantanal Mato-Grossense. *Pes. Agropec. Bras.* 21(9): 909-925.
- Girio R.J.S., Pereira F.L.G., Filho M.M., Mathias L.A., Herreira R.C.P, Alessi A.C & Girio T.M.S. 2003. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres em estado feral da região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do agente. *Ciênc. Rural.* 34(1):165-169.
- Gompper M.E. 1995. *Nasua narica*. *Mammalian species*, 487: 1-10
- Herrera H.M., Lisboa C.V., Pinho A.P., Olifiers N., Bianchi R.C., Rocha F.L., Mourão G.M. & Jansen A.M. 2008. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. ***Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102: 1133-1139.**
- Juarez K.M. & Marinho-Filho J. 2002. Diet, habitat use and home ranges of sympatric canids in Central Brazil. *Journal of Mammalogy*, 83(4): 925-933.
- Kermack, W.O. & McKendrick, A.G. 1927. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proceedings of the Royal Society*, **A115**, 700–721.
- Lins Z.C., Lopez M.L.& Maroja O.M. 1986. Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição a ciências biológicas e a medicina tropical in: *Epidemiologia da leptospirose com particular referência a Amazônia brasileira*. Belém, Brasil.(2): 733-764
- May, R.M. & Anderson, R.M. 1979. Population biology of infectious diseases. Part II. *Nature*, **280**, 455–461.
- Mérien F.P., Amouriaux P., Perlot P., Baranton G & Sain Girons, I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* In clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2219-224.
- Miranda, F.R. 2008. Pesquisa de anticorpo para bactéria do gênero *Brucella spp*, *Leptospira spp*, *Clamydophila spp* em tamanduás-bandeira (*Mymecophaga tridactyla*, Linnaeus, 1758), da RPPN SESC Pantanal, Parque Nacional da Serra da Canastra, Parque Nacional das Emas. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. 116p.
- OIE. 2006. World organisation for animal health. Leptospirosis. Chapter 2.2.4. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00043.htm. Acesso em 22/01/2009.

- Proença L.M. 2007. Soroprevalência de doenças infecciosas caninas em populações de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) na estação ecológica de Água Emendadas, DF. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 41p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. Veterinary Medicine, - A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses 9^a ed. Saunders Ltd. Title. 1880p.
- Rocha F.L. 2006. Área de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na fazenda Nhumirin, e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Corumbá, Mato Grosso do Sul. 92p.
- Rodella L. G., Queiroz Neto J.P. & Santos S. A. 2007. Classificação das pastagens nativas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, por meio de imagens de satélite. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, INPE . 4187-4194.
- Sambrook K., Fritsch E. & Maniatis T. 1987. Molecular cloning – Laboratory manuals. 2^o ed. 1:1.25-1.30.
- Scarcelli E., Piatti R.M., Fedullo J.D.L., Simon F., Cardoso M.V., Castro V., Myashiro, S. & Genovez, M.E. 2003. *Leptospira* spp. detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical sample of captive Black-Capped Capuchin Monkey (*Cebus apella*). Braz. J. Microbiol. 34: 143-146.
- Silva R.A.M.S., Lima E.S.S. & Sanches V. 2004. Estudos preliminares sobre valor do hematológico do lobinho (*Cerdocyon thous*) do Pantanal, MS. Circular Técnica Embrapa pantanal. 1^o Ed. 1-3p.
- Silva R.C., Zetun C.A., Bosco S.M.G., Bagagli E., Rosa O.S. & Langoni, H. 2008. Toxoplasma gondii and Leptospira spp. Infection free-ranging armadillos. Vet. Parasit. 157 : 291-293.
- Souza-Junior M.F., Lobato Z.I.P., Lobato F.C.F., Moreira E.C., Oliveira R.R., Leite G.G., Freitas T.D. & Assis A.R. 2006. Presença de anticorpos da classe IgM de leptospira interrogans em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 39(3): 292-294.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599. (Publication PDF at).
- Vieira, A. S. Levantamento de *Leptospira* spp em animais silvestres do Pantanal sul-mato-grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares. Campo Grande: Faculdade de Veterinária e Zootecnia, UFMS. 2009. XXXp Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).

APÊNDICES

Apêndice A

Identificação dos indivíduos da espécie *N. nasua* submetidos aos testes de PCR e SAM para *Leptospira spp* e os resultados encontrados

<i>N.nasua</i>	PCR	SAM
8	Positivo	Reagente
9	Negativo	Reagente
19	Positivo	não reagente
21	Negativo	não reagente
24	Negativo	não reagente
26	Positivo	Reagente
27	Negativo	não reagente
30	Negativo	Reagente
31	Positivo	Reagente
34	Negativo	Reagente
41	Negativo	não reagente
42	Negativo	não reagente
43	Negativo	não reagente
45	Negativo	não reagente
46	Negativo	não reagente
47	Negativo	Reagente
49	Positivo	Reagente
50	Negativo	Reagente
51	Negativo	Reagente
52	Negativo	não reagente
53	Positivo	não reagente
54	Negativo	não reagente

Apêndice B

Sorogrupo, sorovar mais provável das reações aproveitadas e titulação no teste de SAM para *Leptospira spp* em indivíduos da espécie *N. nasua*

<i>N.nasua</i>	Sorogrupo	Sorovar	Titulação
1	Isolado	110/2006	1600
9	Sejroe	Hardjobovis	400
16	Isolado	110/2006	800
17	Isolado	M9/99	800
26	Pomona	Pomona	6400
30	Isolado	110/2006	100
31	Sejroe	Hardjobovis	3200
34	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	400
38	Pomona	Pomona	3200
47	Autumnalis	autumnalis	800
49	Pomona	pomona	400
50	Pomona	pomona	400

Apêndice C

Sorogrupo, sorovar mais provável das reações aproveitadas e titulação no teste de SAM para *Leptospira spp* em indivíduos da espécie *C. thous*

<i>C. thous</i>	Sorogrupo	Sorovar	Titulação
2	Autumnalis	autumnalis	400
3	Celledoni	witcombi	400
7	Sejroe	hardjobovis	800
13	isolado	110/2006	200
21	isolado	L014	1600
22	Sejroe	hardjobovis	100
30	Sejroe	hardjobovis	200
35	Sejroe	hardjobovis	200
36	Pomona	pomona	1600
39	Sejroe	hardjobovis	1600

Apêndice D

Identificação dos indivíduos da espécie *C. thous* que foram submetidos aos testes de PCR e SAM para *Leptospira spp* e os resultados encontrados

<i>C. thous</i>	PCR	Sorologia
2	Negativo	Reagente
3	Negativo	Reagente
4	Negativo	Não reagente
5	Negativo	Reagente
6	Negativo	Reagente
7	Negativo	Reagente
9	Positivo	Não reagente
11	Negativo	Não reagente
12	Positivo	Não reagente
13	Positivo	Reagente
14	Positivo	Não reagente
15	Negativo	Não reagente
16	Positivo	Reagente
17	Positivo	Reagente
20	Positivo	Não reagente
21	Positivo	Reagente
22	Positivo	Reagente
25	Positivo	Não reagente
26	Negativo	Não reagente
27	Negativo	Não reagente
28	Negativo	Não reagente
29	Negativo	Não reagente
30	Negativo	Reagente
37	Negativo	Não reagente
38	Negativo	Não reagente
39	Positivo	Reagente

Apêndice E

Identificação dos indivíduos da espécie *T. panchyurus* que foram submetidos aos testes de PCR e SAM para *Leptospira spp* e os resultados encontrados

<i>T. panchyurus</i>	PCR	Sorologia
6	Negativo	não reagente
14	Positivo	não reagente
15	Negativo	não reagente
17	Negativo	não reagente
20	Negativo	não reagente
22	Negativo	não reagente
24	Positivo	não reagente
27	Negativo	não reagente
31	Negativo	não reagente
32	Negativo	não reagente
35	Negativo	não reagente
36	Negativo	não reagente
39	Negativo	não reagente

Apêndice F

Sorogrupo, sorovar mais provável das reações aproveitadas e titulação no teste de SAM dos *O. bezoarticus*.

<i>O. bezoarticus</i>	Sorogrupo	Sorovar	Titulação
5	Autumnalis	butembo	100
36	Pomona	Pomona	100
38	Pomona	Pomona	200

Apêndice G

Identificação dos indivíduos da espécie *O. bezoarticus* que foram submetidos aos testes de PCR e SAM para *Leptospira* spp. e os resultados encontrados

<i>O. bezoarticus</i>	PCR	Sorologia	<i>O. bezoarticus</i>	PCR	Sorologia
1	Negativo	não reagente	25	Negativo	não reagente
2	Positivo	não reagente	26	Negativo	não reagente
3	Negativo	não reagente	27	Negativo	não reagente
4	Negativo	Reagente	28	Negativo	não reagente
5	Negativo	não reagente	29	Negativo	não reagente
6	Negativo	não reagente	30	Negativo	não reagente
7	Negativo	não reagente	31	Positivo	não reagente
8	Negativo	não reagente	32	Negativo	não reagente
9	Negativo	não reagente	33	Negativo	não reagente
10	Negativo	não reagente	34	Negativo	não reagente
11	Negativo	não reagente	35	Negativo	não reagente
12	Negativo	não reagente	36	Negativo	Reagente
13	Negativo	não reagente	37	Negativo	não reagente
14	Negativo	não reagente	38	Negativo	Reagente
15	Negativo	não reagente	39	Negativo	não reagente
16	Negativo	não reagente	40	Negativo	não reagente
17	Negativo	não reagente	41	Negativo	não reagente
18	Negativo	não reagente	42	Negativo	não reagente
19	Negativo	não reagente	43	Negativo	não reagente
20	Negativo	não reagente	44	Negativo	não reagente
21	Negativo	não reagente	45	Negativo	não reagente
22	Negativo	não reagente	46	Negativo	não reagente
23	Negativo	não reagente	47	Negativo	não reagente
24	Negativo	não reagente			