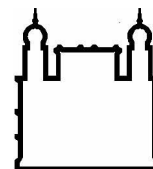




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

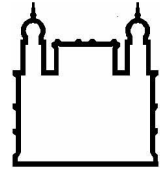
**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS EM PRIMATAS  
SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO EM SALVADOR, BAHIA, BRASIL**

**DANIELA SANTOS ALMEIDA**

**Salvador – Bahia – Brasil  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



## **Curso de Pós-Graduação em Patologia**

### **AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS EM PRIMATAS SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO EM SALVADOR, BAHIA, BRASIL**

**DANIELA SANTOS ALMEIDA**

Orientador: Daniel Abensur Athanzio

Co-orientadora: Melissa Hanzen Pinna

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador-Bahia-Brasil**

**2013**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A447a Almeida, Daniela Santos  
Avaliação da infecção por leptospirosas patogênicas em primatas silvestres e mantidos em cativeiro em Salvador, Bahia, Brasil. [manuscrito] / Daniela Santos Almeida. - 2013.  
63 f. : il. ; 30 cm.  
Datilografado (fotocópia).  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação C  
Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.  
Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Daniel Abensur Athanazio. Laboratório de Patol  
e Biologia Molecular.

1. Leptospirrose. 2. Primatas. 3. Sorologia. 4. Zoonose. 5. Título.

CDU 616.986

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS EM  
PRIMATAS SILVESTRES E MANTIDOS EM CATIVEIRO EM  
SALVADOR, BAHIA, BRASIL.**

.

**DANIELA SANTOS ALMEIDA**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

*Dedico esse trabalho ao meu querido  
avô Genário Baptista de Almeida*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado forças e sabedoria para enfrentar todos os obstáculos e concluir este trabalho.

Aos meus pais, Luzia e Antônio por todo amor dedicado, pelo incentivo e apoio às minhas escolhas.

Ao meu esposo, Nivaldo, pela paciência, companheirismo e pela felicidade compartilhada.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr. Daniel Abensur Athanazio, pela oportunidade de ingressar no PGPAT, pelo apoio na realização deste projeto.

À minha Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melissa Hanzen Pinna, pelo apoio, incentivo e força para realizar esse estudo, e por sempre me proporcionar a oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Arianne Pontes Oriá, pela ajuda inestimável nas coletas e obtenção das amostras e pela parceria neste e em outros projetos.

Ao Coordenador Técnico do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas de Salvador, Alberto Vinícius Dantas de Oliveira e ao Médico Veterinário Victor Pereira Curvelo pela disposição e apoio essenciais à obtenção das amostras do experimento.

À Coordenadora Técnica do CETAS Chico Mendes, Fernanda Libório pela disposição e apoio essenciais à obtenção das amostras.

À Andreia Carvalho pelo grande auxílio na realização das MATs.

À Caroline Rabelo pelo auxílio na execução das PCRs.

Às gatinhas do LABAC Ana Carla, Fernanda Santana, Juliana Leite Marinalva Gonsaga e Taizi Rodrigues pela amizade e momentos de descontração e alegria.

Aos companheiros do LPBM Iuri e Marina por estarem presentes e tornarem o ambiente de trabalho agradável.

Aos colegas do LPBM/CPqGM que não tiveram seus nomes escritos aqui mas estão presentes em meu coração.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz) pela estrutura e recursos disponíveis para realização desse trabalho.

*“Viver é isso: ficar o tempo todo se equilibrando  
entre as escolhas e as consequências.”*

*Jean Paul Sartre*



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 A LEPTOSPIROSE.....	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.3 A LEPTOSPIROSE EM PRIMATAS NÃO HUMANOS.....	20
<b>1.3.1 Infecção Experimental</b> .....	20
<b>1.3.2 Estudos sorológicos (vida livre e cativoiro)</b> .....	23
1.4 FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS PARA ESTUDO EM RESERVATÓRIOS ..	27
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	34
4.1 ANIMAIS .....	34
4.2 CAPTURA E CONTENÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	36
4.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE, SORO SANGUÍNEO E URINA.....	37
4.4 TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (MAT) .....	39
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E URINA.....	41
4.6 PCR EM TEMPO REAL.....	41
<b>5 RESULTADOS</b> .....	42

5.1 ANÁLISE SOROLÓGICA .....	42
5.2 BIOLOGIA MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE SANGUE E URINA.....	43
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	56

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>CETAS</b>	Centro de Triagem de Animais Silvestres
<b>PZBGV</b>	Parque Zoobotânico Getúlio Vargas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>MAT</b>	Teste de Microaglutinação
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>qPCR</b>	PCR quantitativo
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato-Salino
<b>EMJH</b>	Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris
<b>SHPG</b>	Síndrome da hemorragia pulmonar grave

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Recinto tipo ilha de <i>Cebus xanthosternus</i> .	34
<b>Figura 2.</b> Recintos comuns de grupo familiares.	35
<b>Figura 3.</b> Punção da veia femoral e coleta de sangue comum em primatas.	37
<b>Figura 4.</b> Fixação do cateter intravenoso na veia femoral para administração de fluido.	38
<b>Figura 5.</b> Coleta de urina através de cistocentese em exemplar de <i>Cebus xanthosternus</i> .	38

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Principais achados da leptospirose experimental em primatas não humanos.	22
<b>Quadro 2.</b> Estudos sorológicos para detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> sp. em primatas de cativeiro na América Latina.	25
<b>Quadro 3.</b> Estudos sorológicos para detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> sp. em primatas de vida-livre na América Latina.	28
<b>Quadro 4.</b> Relação das cepas de <i>Leptospira</i> sp. empregadas com antígenos na técnica de soroaglutinação microscópica (MAT).	40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos sorogrupos infectantes previstos (inferidos pelo título mais alto através do MAT) nos soros de 15 primatas do PZGV Salvador, BA, com amostras reativas (com título mínimo de 1:25). 42
- Tabela 2.** Distribuição dos sorogrupos infectantes previstos (inferidos pelo título mais alto através do MAT) nos soros de 13 primatas do CETAS Salvador, BA, com amostras reativas (com título mínimo de 1:25) 43

ALMEIDA, DANIELA SANTOS. Avaliação da infecção por leptospirosas patogênicas em primatas silvestres mantidos em cativeiro em Salvador, Bahia, Brasil. 65 f.il. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

### RESUMO

Estima-se que 70% das doenças infecciosas emergentes em humanos estão relacionados a exposição a animais silvestres. Estudos envolvendo infecções em primatas não humanos e o seu papel na epidemiologia da leptospirose são escassos. Uma instrução normativa do Ministério do Meio Ambiente (179 de 25/06/2008) recomenda o uso de teste de microaglutinação (MAT) para detecção de anticorpos aglutinantes anti-*Leptospira* em espécies silvestres em programas de reintrodução à vida livre. Neste contexto, o presente projeto propôs investigar a evidência de prévia exposição e a ocorrência do estado de portador de leptospirosas patogênicas em primatas silvestres residentes no Parque Zoológico Getúlio Vargas de Salvador (PZBGV) e recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres Chico Mendes (CETAS). Foram analisados 42 amostras de soro e sangue total de 42 primatas do PZBGV e 16 amostras de soros de 16 primatas do CETAS pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) e PCR respectivamente. Amostras de urina de 3 de primatas do PZBGV e 13 do CETAS também foram submetidas à PCR. A soroprevalência encontrada no PZBGV foi de 2% (1/42) enquanto que no CETAS foi de 31% (5/16). O único primata do PZBGV positivo na MAT foi um *Allouata caraya* (bugio preto) fêmea, adulta, que apresentou reação mista para os sorogrupos Australis e Icterohaemorrhagiae. As cinco amostras positivas do CETAS ocorreram em macacos-prego (*Cebus* sp.) e foram distribuídos nos sorogrupos: Ballum (1:100), Semaranga (1:200), Grippotyphosa (1:100), Cynopeteri (1:100) e uma reação mista Tarassovi / Autumnalis (1:100). Todas as amostras de sangue total e urina analisadas por PCR foram negativas. Conclui-se que a soroprevalência de anticorpos anti-*Leptospira* foi baixa no PZBGV de Salvador, apesar da alta frequência de roedores na área e endemicidade da leptospirose humana em Salvador. A prevalência elevada foi observada entre os animais resgatados do comércio ilegal no estado da Bahia e esta evidência sorológica de exposição sugere um risco potencial de transmissão da leptospirose ao se adotar estes primatas como animais de estimação.

**Palavras chave:** Leptospirose, primatas, sorologia, zoonose, título.

ALMEIDA, DANIELA SANTOS. Avaliação da infecção por leptospirosas patogênicas em primatas silvestres mantidos em cativeiro em Salvador, Bahia, Brasil. 65 f.il. Dissertação (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

### ABSTRACT

It is estimated that 70% of emerging infectious diseases in humans are related to exposure to wild animals. Studies involving infections in nonhuman primates and their role in the epidemiology of leptospirosis are scarce. A normative statement of the Ministry of the Environment (179 of 25/06/2008) recommends the use of microscopic agglutination test (MAT) for antibodies binding anti-*Leptospira* in wild species reintroduction programs in the wild. Positive tests indicate the need for quarantine and antimicrobial treatment. In this context, this project proposes to investigate the evidence of prior exposure and the occurrence of carrier status of pathogenic *Leptospira* in wild primates living in the Parque Vargas Zoobotânico Salvador (PZBGV) and received by the Center for Wildlife Screening Chico Mendes (CETAS). We analyzed 42 serum samples and 42 whole blood PZBGV primates and 16 sera from 16 primates CETAS by microscopic agglutination test (MAT) and PCR respectively. Urine samples of 3 primates PZBGV CETAS and 13 were also subjected to PCR. The seroprevalence in PZBGV was 2% (1/42) while the CETAS was 31% (5/16). The only positive was a primate *Allouata caraya* (black howler monkey) female, adult, which showed mixed reaction to serogroups Australis and Icterohaemorrhagiae. The five samples positive from CETAS occurred in monkeys (*Cebus* sp.) And were divided into serogroups: Ballum (1:100), Semaranga (1:200), Grippytyphosa (1:100), Cynopeteri (1:100) and mixed reaction Tarassovi / Autumnalis (1:100). All blood samples and urine samples were analyzed by PCR negative. It is concluded that the seroprevalence of anti-*Leptospira* antibodies was low in the Zoo of Salvador, despite the high frequency of rodents in the area and endemicity of leptospirosis in Salvador. The high prevalence was observed among the animals rescued from the illegal trade in the state of Bahia and serologic evidence of this exhibition suggests a potential risk of transmission of leptospirosis by adopting these primates as pets.

**Keywords:** Leptospirosis, primates, sorology, zoonosis, title.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose de importância global, causada pela infecção com espécies patogênicas de *Leptospira* que pode acometer diversas espécies de mamíferos, manifestando-se nos ecossistemas silvestre, urbano e rural. É adquirida através do contato direto com a urina de animais portadores ou de forma indireta pela exposição à água contaminada. A doença humana pode manifestar-se em níveis endêmicos ou gerar surtos epidêmicos (VASCONCELLOS, 2000; BLAZIUS et al., 2005), além de possuir caráter sazonal relacionado a períodos chuvosos em ambientes urbanos com precárias condições de saneamento (BHARTI, 2003; MCBRIDE et al., 2005).

As espiroquetas do gênero *Leptospira* têm como hospedeiros uma ampla variedade de mamíferos, que podem desenvolver uma doença sistêmica aguda letal ou tornar-se reservatórios (BHARTI, 2003). Estudos sorológicos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies sinantrópicas e silvestres na epidemiologia da doença, os quais podem desenvolver o estado de portadores crônicos renais e contribuir para a disseminação do microrganismo na natureza. O significado epidemiológico e associações entre os reservatórios silvestres ainda necessita de maiores investigações e nenhum mamífero pode ser excluído como possível hospedeiro (HIRSH e ZEE, 2003). Mamíferos selvagens são frequentemente reagentes para sorovares prevalentes na sua área nativa, porém quando esses animais se encontram em cativeiro podem ser expostos a diversos outros sorovares, pela proximidade a outras espécies silvestres e exposição aos diferentes desequilíbrios do meio ambiente em que vivem (LILENBAUM et al., 2002). Por exemplo, o convívio de outras espécies animais com roedores urbanos aumenta a frequência de evidência de exposição ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, visto que os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (deste mesmo sorogrupo) são seletivamente carreados por *Rattus* sp..

A leptospirose apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de acordo com a espécie animal acometida e a virulência do sorovar infectante (FAINE et al., 1999). A doença aguda é semelhante em todos mamíferos e na fauna selvagem, os sinais clínicos da infecção por leptospirosas são semelhantes aos apresentados por animais domésticos, havendo

relatos de febre, conjuntivite, apatia, icterícia, morte com lesões renais e hepáticas (FAINE et al., 1999; LILENBAUM et al., 2002; SCARCELLI et al., 2003) e mais recentemente o desenvolvimento de síndrome hemorrágica pulmonar grave (SHPG) tornou-se uma causa emergente de óbitos associados à leptospirose humana (MEDEIROS, 2010). A SHPG também foi descrita em primatas infectados em condições experimentais (PEREIRA et al., 2005) ou naturais (SZONYI et al., 2011). Em animais de reprodução determina distúrbios reprodutivos, alterações congênitas, abortamentos e mesmo infecções inaparentes comprometem a eficiência reprodutiva do rebanho, levando a subfertilidade (GROOMS & BOLIN, 2005).

Além de ser uma doença importante para os animais, a leptospirose assume um papel relevante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que o contato com animais infectados é uma importante via de transmissão para o ser humano. Estima-se que até 70% das doenças infecciosas emergentes estão associados ao contato humano com animais selvagens (CHOMEL et al., 2007), incluindo o hábito de adotar animais selvagens ilegalmente como animais domésticos. Roedores peridomiciliares e animais de produção são importantes nas situações epidemiológicas bem conhecidas tais como grandes centros urbanos com precário saneamento e exposição ocupacional, respectivamente. No entanto, a fauna silvestre é particularmente importante nos casos de atividade recreacionais tais como ecoturismo e esportes aquáticos. (BHARTI, 2003; MCBRIDE et al., 2005)

Os cativeiros autorizados, como Zoológicos e centros de reabilitação de animais silvestres (CETAS), são importantes centros para a avaliação da exposição à *Leptospira* e do estado de portador nas diversas espécies que neles habitam. Esses animais são especialmente expostos aos desequilíbrios dos fatores do meio ambiente onde vivem, pois convivem em proximidade com muitas espécies pertencentes à diferentes nichos ecológicos, e as condições de cativeiro não permitem isolar completamente os animais do contato com a fauna local (por exemplo, roedores, guaxinins, gambás, etc), que podem ter livre acesso às instalações favorecendo a ocorrência de leptospirose (PEROLAT et al., 1992; SZONYI et al., 2011).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Leptospiras são consideradas de distribuição cosmopolita, em áreas urbanas, silvestres e rurais e sua ocorrência está ligada a fatores ambientais e climáticos. (VASCONCELLOS, 2000; LEVETT, 2001). A infecção é mais comum em países tropicais e subtropicais devido à sua forte associação com áreas de alta pluviosidade e clima quente, ocorrendo de forma endêmica em grandes centros urbanos com precárias condições de saneamento, havendo um padrão de aumento no número de casos e ocorrência de surtos após períodos de elevados índices pluviométricos e inundações (SARKAR et al., 2002; KO et al., 1999; ROMERO et al., 2003).

A infecção por *Leptospira* spp. ocorre através do contato direto com a urina de animais portadores ou de forma indireta com água contaminada. As leptospiras penetram ativamente através de mucosas, lesões na pele e pele íntegra, seguindo-se sua multiplicação corrente sanguínea e disseminação para tecidos e órgãos alvo (FAINE, et al., 1999; BHARTI, 2003; MCBRIDE et al., 2005; KO et al., 2009)

Cada sorovar tende a ser mantido seletivamente por um hospedeiro animal, sendo então este considerado adaptado à determinada espécie animal (FAINE et al., 1999). Quando o sorovar não é adaptado a espécie animal que adquire a infecção, esta pode desenvolver quadros agudos com sintomatologia evidente. Sorovares adaptados tendem a causar um estado de portador renal subclínico nos hospedeiros de manutenção. Os animais que sobrevivem à fase aguda da leptospirose podem desenvolver condição de portadores convalescentes onde as leptospiras instalam-se e multiplicam-se nos túbulos renais e são eliminados para o meio ambiente por períodos variáveis (FAINE et al., 1999).

O estado de portador renal dos hospedeiros de manutenção é um elemento chave na transmissão da leptospirose. Os reservatórios animais são cronicamente infectados nos rins pelos diferentes sorovares de *Leptospira* sp. e muitas vezes esta persistência se prolonga por toda a vida do animal que carrega a infecção com pouco ou nenhum sinal clínico e, com excreção intermitente de leptospiras na urina (ADLER E DE LA PEÑA, 2010; ATHANAZIO et al., 2008; LEVETT, 2001). Assim, a transmissão da leptospirose ocorre através da eliminação de leptospiras na urina com contaminação do solo e da água, sendo este o principal veículo de transmissão da doença (McBRIDE et al., 2005) As leptospiras naturalmente tendem a formar

agregados na água, o que pode estar relacionado à sua manutenção no meio ambiente (TRUEBA et al., 2004).

O principal reservatório urbano é constituído pelos roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto). Os seres humanos são considerados hospedeiros incidentais e terminais dentro da cadeia de transmissão e assumem pouca importância na epidemiologia da doença (BHARTI, 2003).

### 1.3 A LEPTOSPIROSE EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

#### 1.3.1 Infecção experimental

Estudos experimentais em primatas não humanos foram realizados desde os primeiros isolados obtidos de pacientes não humanos. Em 1916, autores alemães já testavam espiroquetas isoladas de pacientes em diferentes espécies animais, e obtiveram infecções oligoassintomáticas nos modelos que usavam primatas. Enquanto isso Nogucchi (1918) identificou espécies de macacos do Novo Mundo com maior ou menor susceptibilidade às formas graves e isolou espiroquetas com sucesso em seus experimentos, ainda acreditando tratar-se do agente etiológico da febre amarela e reproduzindo esta doença (MINETTE, 1966). De um modo geral, primatas mostraram ao longo de décadas de experimentos serem um grupo relativamente resistente às formas graves da infecção por leptospiras patogênicas (MARSHALL, 1980; MINETTE, 1966; PALMER et al., 1987) (Quadro 1), o que os aproxima dos seres humanos nos quais apenas 5 a 10% das infecções evoluem para formas graves (FAINE et al., 1999; KO et al., 1999).

Os achados dos principais estudos experimentais com foco na infecção por leptospiras patogênicas estão sumarizados no Quadro 1. Macacos *Cercopithecus aethiops* infectados com o sorovar Hadjo exibiram leptospiremia e disseminação de espiroquetas por diversos tecidos, embora mantiveram manifestações clínicas brandas (PALMER et al., 1987). Nesta mesma espécie Marshal e colaboradores (1980) observaram meningoencefalite linfocítica auto-limitada após infecção pelos sorovares Tarasovi e Balcânica. Este achado espelha o quando de meningite asséptica que ocorre em pacientes com leptospirose e possivelmente explica a manifestação clínica de grave cefaléia que é comum na leptospirose humana. Um estudo recente descreve a

leptospirose experimental em sagüis (*Callithrix jacchus*), reproduzindo lesões graves descritas em humanos e cobaias, tais como hemorragia intra-alveolar, necrose tubular aguda, nefrite intersticial, necrose focal de hepatócitos e degeneração muscular (PEREIRA et al., 2005).

Quadro 1: Principais achados da leptospirose experimental em primatas não humanos.

<b>Autor /Ano</b>	<b>Espécies</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Principais achados</b>	<b>Sorovar infectante</b>
Minette, 1968	<i>Cebus sp.</i>	--	Reações cruzadas à microaglutinação, ausência de imunidade protetora na re-infecção por sorovares heterólogos	Icterohaemorrhagiae, Canicola e Pomona
	<i>Cercopithecus patas</i>			
	<i>Macaca mulatta</i>			
	<i>Cercopithecus aethiops</i>			
Marshal et al., 1980	<i>Cercopithecus aethiops</i>	30	Meningoencefalite linfocítica auto-limitada	Tarassovi e Balcanica
Hambleton et al., 1980	<i>Cercopithecus aethiops</i>	30	Infecção oligoassintomática	Tarassovi e Balcanica
Palmer et al., 1987	<i>Cercopithecus aethiops</i>	8	Infecção oligoassintomática	Hardjo
Pereira et al., 2005	<i>Callithrix jacchus</i>	11	Reproduz doença aguda letal com hemorragia pulmonar , nefrite e necrose hepática.	Copenhageni

### 1.3.2 Estudos sorológicos (vida livre e cativeiro)

Levantamentos sorológicos mostram soroprevalências que variam de 6% em *Cebus* sp. Em um zoológico de Sergipe, Brasil (PIMENTEL et al 2009), a 100 % em *Ateles belzebuth* no Zoológico de Chapultepec, Cidade do México (LUNA-ALVAREZ et al., 1996) para diversos sorovares tanto em primatas do Velho Mundo quanto do Novo Mundo (CUBAS et al., 2007). Minette (1968) realizou o maior estudo em primatas com diversas espécies descrevendo respostas sorológicas com reações cruzadas à microaglutinação, ausência de imunidade protetora na re-infecção por sorovares heterólogos, e identificando a espécie *Saimiri sciureus* (mico-de-cheiro) como susceptível e capaz de reproduzir a doença ictérica experimentalmente.

Inquéritos sorológicos têm demonstrado a distribuição da exposição à leptospiras em várias espécies de primatas, em diferentes países (Quadro 2). Em Barbados, Baulu et al 1987, detectaram soroprevalência de 150/501 (30%) em *Cercopithecus aethiops sabeaus* (macaco verde africano) capturados de vida livre e de 6/24 (25%) nos que passaram seis meses em cativeiro. Kessler e Everard (1988) em um estudo de acompanhamento relataram soroprevalência de 5/169 (3%), sendo o sorogrupo Icterohemorrhagiae o mais prevalente numa colônia de *Macaca mulatta* (macaco-rhesus) recém capturados da vida livre em Caio Santiago, Porto Rico, e uma prevalência de 7/158 (4%) um ano depois. Perolat e colaboradores (1992) verificaram que 24/93 (26%) dos *Saimiris sciureus* (micos-de-cheiro) mantidos no Institut Pasteur em Caiena, Guiana Francesa foram reativos. Na Cidade do México, México, 18/ 59 (30%) dos macacos-rhesus cativos de um Centro de Pesquisa, apresentaram anticorpos anti-Leptospira (IBANEZ-CONTRERAS et al., 1996). Em um estudo semelhante realizado no zoológico de Matecaña em Cidade Pereira, Colômbia, foi detectada uma soroprevalência de 15/65 (23%) em diferentes espécies primatas neotropicais mantidos em cativeiro (ROMERO et al., 2011). Neste estudo os trabalhadores também foram avaliados e nenhum apresentou anticorpos anti-*Leptospira* nas reações de MAT.

Nas cidades brasileiras do Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Aracaju e Sorocaba investigações sorológicas da exposição às leptospiras em animais silvestres já foram realizadas em zoológicos demonstrando reações positivas para diferentes sorogrupos. Lilenbaum et al., (2002), realizaram estudo soroepidemiológico da leptospirose em mamíferos do zoológico do Rio de Janeiro, onde a soroprevalência observada foi de 7/34 (21%) das amostras de primatas de diversas espécies. Este mesmo grupo ao avaliarem amostras de sagüis (*Leontopithecus* sp.) relataram

soroprevalência de 26/73 (36%) em um Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (Lilenbaum et al., 2005).

Corrêa et al., (2004), ao avaliarem diferentes espécies animais verificou reações positivas em 24/99 (24%) dos primatas avaliados no Zoológico de São Paulo, sendo os sorovares Copenhageni, Grippothyphosa e Castelonis os mais frequentemente encontrados nas amostras de primatas das famílias *Callitrichidae* e *Cebidae*. Pimentel et al (2009) encontrou reações positivas e 1/14 (7%) dos *Cebus libinosus* e 1/4 (25%) nos *Cebus xanthosternus* Cativos no Zoológico de Aracaju.

Apesar da maior parte dos relatos sobre a infecção por leptospirosas patogênicas em primatas encontrados na literatura descreverem infecções brandas sem sinais clínicos evidentes, primatas também podem ser acometidos por formas graves da doença. Uma epidemia de hemorragia pulmonar associada à leptospirose foi recentemente descrita em macacos prego (*Cebus* sp.) resgatados e confinados em um centro de reabilitação de animais silvestres na Colômbia, com 16 casos confirmados por isolamento em 52 animais avaliados. Destes 14/16 (87%) apresentavam icterícia, 9/16 (56%) linfadenomegalia e 5/16 (31%) palidez de mucosas e desconforto respiratório (SZONIY et al., 2011). No Zoológico de Boston, a presença de leptospirosas foi detectada em amostras de fígado e rim de um sagüi (*Callithrix kuhlli*) que veio a óbito depois de apresentar alterações compatíveis com a leptospirose. No mesmo Zôo, outro animal que apresentou os mesmos sinais clínicos, teve sorologia positiva com títulos de 1:200 para o sorovar Ballum (BAITCHMAN et al., 2006).

Na descrição de outro caso de óbito, houve a detecção do DNA de leptospirosas através de PCR de tecido renal em um macaco prego (*Cebus apella*) que apresentou icterícia e rins hemorrágicos, alterações sugestivas de leptospirose à necropsia (SCARCELLI et al., 2003).



Quadro 2. Estudos sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* sp. em primatas de cativeiro na América Latina

Autor /Ano	Local	Espécies(nome vulgar)	N / n (%)	Sorogrupo predominante	
Baulu et al., 1987	Centro de Pesquisa em Primatas, Saint Joseph, Barbados	<i>Cercopithecus aethiops sabeaus</i> (macaco verde africano)	6/24 (25)	Ballum	
Perrolat et al., 1992	Instituto Pasteur, Caiena, Guiana Francesa	<i>Saimiri sciarius</i> (mico-de-cheiro)	24/93 (26)	Icterohaemorrhagiae	
Luna-Alvarez, et al., 1996	Zoológico de Chapultepec, Cidade do México, México	<i>Pongo pygmaeus</i> (orangotango)	2/3 (66)	Canicola	
		<i>Ateles belzebuth</i> (macaco-aranha-branco)	2/2 (100)		
		<i>Ateles paniscus paniscus</i> (macaco-aranha-preto )	3/6 (50)		
		<i>Macaca fuscata</i> (macaco japonês)	1/3 (66)		
		<i>Papio ursinus</i> (babuínos chacma)	1/1 (100)		
Ibanez-Contreras et al., 1996 *	Centro de Pesquisa, Cidade do México, México	<i>Macaca mulatta</i> (macaco-rhesus)	18/59 (30)	Panamá, Lai, Australis e Shermani	
Lilenbaum et al., 2002**	Zoológico do Rio de Janeiro, Brasil	<i>Ateles belzebuth</i> (macaco-aranha-branco)	2/2 (100)	Icterohaemorrhagiae	
		<i>Ateles paniscus paniscus</i> (macaco-aranha-preto )	3/6 (50)		
		<i>Macaca fuscata</i> (macaco japonês)	1/3 (66)		
		<i>Papio ursinus</i> (babuínos chacma)	1/1 (100)		
Corrêa et al., 2004	Zoológico de São Paulo, Brasil	<i>Callithrix jacchus</i> (sagüi-de-tufos-brancos)	14	24/99 (24)	Castellonis
		<i>Callithrix penicillata</i> (sagüi-de-tufos-pretos)	12		
		<i>Saguinus fuscicollis</i> (choim-preto)	2		
		<i>Simiri sciurus</i> (mico- de-cheiro)	2		
		<i>Cebus apella</i> (macaco-prego)	47		
		<i>Ateles paniscus</i> (macaco-aranha)	10		
		<i>Lagothrix lagothricha</i> (macaco-barrigudo)	2		
		<i>Cebus nigrivittatus</i> ( caiarara)	5		

		<i>Aotus trvirgatus</i> (macaco-da-noite)	1	
		<i>Alouata fusca</i> (bugio)	4	
Lilenbaum et al., 2005	Centro de Primatologia, Rio de Janeiro, Brasil	<i>Leontopithecus</i> sp. (mico-leões )	26/73 (36)	Icterohaemorrhagiae
Pimentel et al., 2009	Zoológico de Sergipe, Brasil	<i>Cebus libinosus</i> (macaco-prego)	1/14 (7)	Icterohaemorrhagiae
		<i>Cebus xanthosternus</i> (Macaco-prego-do-peito-amarelo)	1/4(25)	Icterohaemorrhagiae
Szonyi et al., 2010	Centro de Reabilitação, Valle de Aburrá, Colômbia	<i>Cebus</i> sp. (macaco-prego)	37/52 (71)	Icterohaemorrhagiae
Romero et al., 2011	Zoológico de Mantecaña, Cidade Pereira, México	<i>Ateles fusiceps</i> (macaco-aranha-preto)	5/19 (33)	Icterohamorhgiae,
		<i>Cebus apella</i> (macaco-prego)	1/14 (7)	
		<i>Cebus capucinus</i> (macaco-prego-de-cara-branca)	1/3 (33)	
		<i>Cebus albifrons</i> (cairara)	5/6 (83)	
		<i>Ateles hybridus</i> (macaco-aranha-mulato)	1/6 (17)	
		<i>Saguinus leucopus</i> (Sagui-cinza)	2/5 (40)	
Ferreira et al., 2011	Cetas, Nordeste do Brasil	<i>Cebus</i> sp. (Macaco-prego)	9/139 (6,5)	Patoc
Pinna et al., 2011	Cetas de Salvador, Brasil	<i>Callithrix jacchus</i> (sagüi-de-tufos-brancos)	16/28 (57)	Icterohaemorrhagiae
		<i>Callithrix penicillata</i> (sagüi-de-tufos-pretos)	4/8 (50)	
		<i>Cebus</i> sp. (macaco-prego)	8/5 (62,5)	
Ullman et al., 2012	Zoológico de Sorocaba, Brasil	<i>Alouatta caraya</i> (bugio-preto)	1/3(33)	Icterohaemorrhagiae
		<i>Ateles marginatus</i> (macaco-aranha-de-cara-branca)	2/6 (33)	
		<i>Brachyteles arachnoides</i> (mono-carvoeiro)	1/9 (11)	

#### 1.4 FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS PARA ESTUDO EM RESERVATÓRIOS

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado de forma indireta, por meio de sorologia; ou direto, com a utilização de microscopia óptica de campo escuro, isolamento do agente ou detecção de DNA ou antígenos de leptospiros em tecidos e fluidos corporais (VINETZ, 2001).

O método de referência preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) é o teste de microaglutinação (microscopic agglutination test, MAT) com antígenos vivos, para a detecção de anticorpos na amostra testada. É um teste sorogrupo específico (FAINE et al., 1999).

Anticorpos podem ser detectados no soro de animais aproximadamente de 5 a 7 dias após o início dos sintomas (FAINE et al., 1999; SAMBSIAVA et al., 2003). Nos seres humanos e/ou animais doentes, recomenda-se a realização de sorologia pareada com amostras colhidas em dois momentos: um no início e outro a partir da quarta semana de doença (FAINE et al., 1999). Para fins de estudos de soroprevalência, um título de MAT de 1:100 é considerado positivo para evidência sorológica de exposição prévia às leptospiros patogênicas (FAINE et al., 1999) inclusive sendo utilizado para primatas não humanos (Quadros 2 e 3).

Uma das limitações do teste é a necessidade de ser realizado em laboratórios de referência com pessoal treinado e manutenção de um painel de leptospiros vivas que promovam uma cobertura adequada da diversidade antigênica de leptospiros existentes no local presumível de ocorrência da infecção. Por isso, é recomendável, que o painel de cepas utilizadas no teste inclua leptospiros de cada um dos 24 sorogrupos de leptospiros, além de isolados do local onde o teste está sendo realizado (FAINE et al., 1999). Além disso o custo de manutenção de uma bateria de leptospiros, com repiques semanais, e a considerável variabilidade de resultados entre laboratórios são fatores que limitam o emprego desta técnica (SUGUNAN et al., 2002; SMYTHE et al., 2002; HEINEMANN et al., 2000; CUMBERLAND et al., 1999).

Quadro 3. Estudos sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* sp. em primatas de vida-livre na América Latina.

<b>Autor /Ano</b>	<b>Local</b>	<b>Espécies</b>	<b>Reativos</b>	<b>Sorogrupo Predominante</b>
Souza Júnior et al., 2002	Lajeado e Ipueras Tocantins, Brasil	<i>Alouata caraya</i> (BUGIO)	46/82 (16)	Pomona
		<i>Cebus</i> sp. (macaco-prego)	2/286 (2)	Panamá
Baulu et al., 1987	Centro de Pesquisa em Primatas, Barbados, Caribe	<i>Cercopithecus aethiops</i> <i>sabeaus</i> (macaco verde africano)	150/501 (30)	Ballum
Kessler e Everard, 1988	Caio, Santiago, Porto Rico	<i>Macaca mulatta</i> (macaco-rhesus)	5/169 (3)	Icterohaemorrhagiae

Após a segunda semana da doença, as leptospiros podem ser visualizadas diretamente na urina. A detecção direta de leptospiros por microscopia de campo escuro permite a visualização do agente em amostras de urina (fase de leptospirúria) (SANTA ROSA, 1970). É uma técnica rápida, porém, pouco sensível uma vez que requer a existência de microrganismos inteiros e viáveis (para visualização da morfologia e movimento) e a excreção urinária de leptospiros ocorre de forma intermitente. Além disso, uma variedade de debris celulares exibindo movimento *browniano* nos fluidos pode ser confundida com leptospiros (LEVETT, 2001).

O isolamento bacteriológico em meio de cultura é considerado padrão-ouro por comprovar a presença da bactéria, atestar sua viabilidade e permitir estudos de caracterização antigênica e genômica. No entanto, é um método de difícil realização, pois as leptospiros apresentam crescimento lento (até semanas para detectar seu crescimento) e requerem meios de transporte e meios de cultivo enriquecidos específicos que devem suprir as exigências nutricionais das leptospiros, além do uso de antibióticos seletivos para prevenir a contaminação por bactérias de crescimento rápido (THIERMANN, 1984).

Métodos moleculares, como a PCR (reação da cadeia de polimerase), vêm sendo cada vez mais utilizados na rotina do diagnóstico da leptospirose animal (ROJAS et al., 2010). Apesar de a técnica ter seu uso restrito à área de pesquisa ou a laboratórios de referência, a facilidade de obtenção do DNA leptospiral em quaisquer fluidos biológicos, não necessitando da presença de anticorpos, torna o diagnóstico possível em estágios iniciais de infecção em humanos e animais (CHU et al., 1998; HEINEMANN et al., 2000; VINETZ, 2001).

A maioria dos estudos em reservatórios baseia-se em soroprevalência e, portanto, permitem apenas a inferência de que os animais foram previamente expostos. No entanto é crescente o número de estudos de reservatórios que usam a detecção direta por PCR para a confirmação do estado de portador renal (DE FARIA, 2008; SUGUNAN et al., 2002)

A PCR em tempo real (qPCR) é atualmente utilizada como ferramenta para quantificação de leptospiros em amostras biológicas. Possibilita a obtenção de resultados em pouco tempo, permitindo a quantificação mais confiável de sequência-alvo de DNA amplificada quando comparada com PCR convencional. Um alvo comumente utilizado nos ensaios de detecção do genoma de leptospiros é o gene *LipL32* que codifica uma lipoproteína de membrana externa restrita às espécies patogênicas (STODDARD et al., 2009). Ensaios de qPCR usando o gene *LipL32* como alvo tem sido desenvolvidos experimentalmente (LEVETT et al., 2005;

STODDARD et al., 2009) e já foram aplicados para avaliação de excreção urinária de leptospiras em cães (ROJAS et al., 2010) mostrando-se uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico de rotina da leptospirose. Em estudo recente, nosso grupo demonstrou que ensaios qPCR apresentam resultado similar à detecção por imunofluorescência em *imprint* de amostras experimentais (CHAGAS-JÚNIOR, 2012)

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos envolvendo infecções em primatas não humanos e o seu papel na epidemiologia da leptospirose são escassos. Embora pesquisas sobre a leptospirose em animais silvestres tenham sido realizadas nas Américas, no Brasil a infecção ainda é pouco estudada nas espécies nativas e exóticas da fauna de cada região, deixando uma possível lacuna no estudo da cadeia epidemiológica, o que dificulta a elaboração de planos estratégicos de controle dessa doença em regiões com grande densidade de animais, matas e rios. Portanto, os zoológicos e os Centros de reabilitação de animais silvestres configuram-se como importantes centros para o desenvolvimento desse tipo de pesquisa em virtude da diversidade de espécies que neles habitam (NETO, 2006).

Segundo a Instrução Normativa Nº 179, DE 25 DE JUNHO DE 2008, do Ministério do Meio Ambiente – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), programas de re-introdução de espécies silvestres na natureza incluem o levantamento clínico e diagnóstico por meio de exames laboratoriais confirmatórios para a investigação enfermidades. Dentre eles encontra-se a indicação de sorologia e isolamento bacteriano para o diagnóstico da leptospirose em primatas. O período de quarentena preconizado é de no mínimo 60 dias, onde são adotadas medidas profiláticas e terapêuticas em animais que tenham sido expostos a doenças infecto-contagiosas ou que sejam possíveis portadores e veiculadores de agentes patogênicos.

A Instrução Normativa nº 179 não menciona os títulos que devem ser considerado como reação positiva na MAT, a partir dos quais seria indicado um tratamento específico. Segundo Almeida et al. (1994) títulos inferiores a 100 não são considerados como positivos na MAT, mas podem demonstrar que em algum momento aquele animal esteve em contato com a *Leptospira* e produziu anticorpos. Ainda segundo os mesmos autores, títulos entre 100 e 200 são considerados baixos, possivelmente expressando casos de infecção passada ou recém instalada e, quando detectados títulos iguais ou maiores que 400 podem representar casos de infecção manifesta ou compatível com enfermidade clínica. No entanto, apenas a comparação dos resultados do MAT com dados de qPCR podem avaliar a adequação da MAT como método capaz de prever o estado portador.

Neste contexto, o presente projeto propôs investigar a soroprevalência e a ocorrência do estado de portador de leptospiros patogênicos em primatas silvestres residentes no Parque Zoobotânico Getúlio Vargas e recebidos pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres Chico Mendes (CETAS). Essa avaliação é fundamental para identificar adequação da Instrução Normativa nº 179 que determina sorologia para identificar a necessidade de retardar a reintrodução à vida livre ou a necessidade de tratamento antimicrobiano.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a infecção por leptospiros patogênicas em diferentes espécies de primatas não-humanos mantidos em cativeiro, através de métodos sorológicos e moleculares.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Investigar evidência sorológica de exposição às leptospiros patogênicas em primatas não humanos silvestres mantidos em cativeiro.
2. Investigar a frequência de infecção ativa através da detecção direta (PCR em tempo real) em amostras de sangue e urina de primatas não humanos silvestres mantidos em cativeiro.
3. Investigar a adequação dos critérios estabelecidos de títulos de MAT como limitantes da reintrodução de animais à vida livre através da comparação dos títulos da MAT com a excreção urinária de leptospiros.

## 4. METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados no presente trabalho estavam de acordo com as exigências dispostas na Instrução Normativa número 154 de 1º de março de 2007 – IBAMA, com a devida aprovação mediante o SISBIO, número 38235-1, com respeito primordial ao bem estar dos animais utilizados no experimento e aos seus direitos. Todas as atividades foram acompanhadas pela equipe de técnicos, veterinários, funcionários e estagiários do zoológico e CETAS.

### 4.1 ANIMAIS

O Parque Zôobotânico Getúlio Vargas de Salvador possui atualmente um plantel constituído por 99 primatas representados por 13 espécies. A população do estudo incluiu 42 macacos das seguintes de cinco espécies: 23 *Cebus xanthosternus*, 11 *Cebus flavius*, 3 *Alouatta caraya*, 4 *Aotus* sp. e um *Saimiri sciureus*. Os animais estavam distribuídos de forma bastante diversificada, 15 deles (*Cebus xanthosternus*) em um recinto amplo com forma de ilha artificial e com pequenos abrigos e enriquecido com troncos e plataformas de madeira (Figura 1).



**Figura 1.** Recinto tipo ilha de *Cebus xanthosternus*.

Outros sete macacos-prego e as demais espécies citadas encontravam-se abrigados em recintos de grupo familiar com área de acesso a luz solar e ambiente enriquecido com vegetação, troncos e cordas contendo cerca de 5 indivíduos por recinto (Figura 2). Nestes ambientes os primatas tem contato com outros animais silvestres tais como patos, pavões. Também há relatos da presença de roedores sinantrópicos que tem acesso livre aos recintos.



**Figura 2.** Recintos comuns de grupo familiares.

A coleta das amostras foi realizada entre março de 2011 a janeiro de 2012 e coincidiu com o período de transferência das espécies de recintos telados com áreas ao ar livre, para novos recintos ambientados e com vidros e melhores condições sanitárias. Amostras de sangue também foram coletadas de animais submetidos à procedimentos rotineiros de manejo adotados pelos veterinários técnicos do referido parque durante o período de realização do estudo.

Também foram avaliados primatas do Centro de Triagem de animais Silvestres Chico Mendes (CETAS), que possui uma população variável de espécies de primatas, apreendidos do tráfico ilegal de animais silvestres, resgatados ou entregues espontaneamente e que são mantidos no CETAS pela impossibilidade reintrodução na natureza ou, de encaminhamento por falta de instituições interessadas em albergar estes animais. Foram incluídos no estudo 16 *Cebus* sp. (macacos-prego) não identificados à nível de espécie. Suspeita-se que alguns deles são híbridos

dada a dificuldade na identificação por características fenotípicas. Estudos de caracterização genética estão sendo realizados no CETAS, no entanto os dados não estão disponíveis. Todos os animais vivem em recintos amplos com acesso à luz solar, separados por sexo e com cerca de 20 indivíduos por recinto, sendo estes capturados aleatoriamente.

#### 4.2 CAPTURA, CONTENÇÃO E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Durante o período de março de 2011 a janeiro de 2012 foram capturados e contidos 42 primatas no Parque Zoobotânico Getúlio Vargas e 16 primatas no Centro de animais silvestres Chico Mendes. Os animais capturados foram submetidos à contenção química e/ou física para a colheita de sangue e urina. O tipo de contenção foi escolhido de modo a minimizar o estresse e os riscos para o animal e garantir a segurança da equipe envolvida, levando-se em consideração a espécie e o tamanho do animal, os equipamentos disponíveis, o temperamento individual dos animais e o estado de saúde.

A contenção física foi realizada com o auxílio de redes, puçás, luvas de couro e caixas de contenção. A contenção química foi realizada através da administração anestésicos dissociativos e associações tranquilizantes tais como cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina e a associação de tiletamina e zolazepan (Zoletil), fármacos já rotineiramente utilizados no manejo dos animais das instituições nas quais ocorreu o estudo.

Os fármacos foram aplicados com auxílio de seringas e agulhas estéreis por via intramuscular e as dosagens anestésicas (miligrama por quilograma de peso) seguiram recomendações pré-estabelecidas, variando de acordo com a espécie ou foram calculadas por extrapolação alométrica (Massone, 2003).

Todos os primatas incluídos neste estudo passaram por uma avaliação clínica, onde foram avaliados parâmetros como escore corporal, temperatura retal, coloração de mucosas, hidratação, frequências cardíaca e respiratória, afim de identificar alterações sugestivas de leptospirose ou outra patologia.

#### 4.3 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE, SORO SANGUÍNEO E URINA

Foram coletadas 42 amostras de sangue por meio de punção venosa, utilizando-se seringas e agulhas estéreis. A veia de escolha para colheita, bem como a quantidade de sangue a ser colhido e tamanho da agulha variaram de acordo com a espécie, idade e massa corporal do animal.



Figura 3. Punção de veia femoral em um exemplar de *Cebus xanthosternus*.

Para a coleta da urina houve a necessidade de administração intravenosa de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) para promover aumento da filtração glomerular e produção de urina, uma vez que no momento de captura os animais urinam no recinto em resposta ao estresse causado pela contenção. Foi realizado cateterismo da veia femoral ou safena externa para acoplamento do equipo e administração do fluido por 20 minutos (Figura 4).



Figura 4. Fixação do catéter intravenoso na veia femoral para administração de fluido.

Após esse período foi realizado a antissepsia da região pélvica e perianal para a realização de cistocentese ou compressão vesical moderada para a ejeção de jatos de urina. O volume de urina coletado variou de 1,5 a 4 ml.

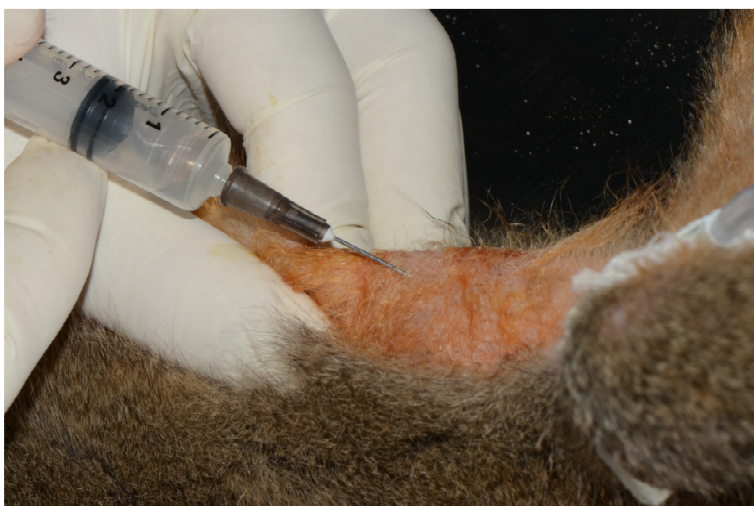


Figura 5. Coleta da urina através de cistocentese em exemplar de *Cebus xanthosternus*.

O sangue coletado foi colocado em tubos de ensaio estéreis com e sem anticoagulante (EDTA). Após a coleta, as amostras foram resfriadas e transportadas até o laboratório para centrifugação, sendo os tubos contendo sangue sem anticoagulante centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o soro obtido estocado em tubos plásticos do tipo Eppendorf® a -20° para posterior análise sorológica. As amostras coletadas em tubos com anticoagulante (EDTA) foram estocadas em criotubos de 1 ml e mantidas a -70°C para posterior análise molecular. As urinas foram tamponadas com PBS na diluição de 1:10 e acondicionadas em tubos do tipo Ependorf de 2 ml, foram resfriadas e transportadas até o laboratório onde foram congeladas a -70°C para posterior análise molecular.

#### 4.4 TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA (MAT)

Todos os soros coletados foram testados pelo MAT. Foi realizada uma diluição inicial de 1:12,5, sendo as amostras dispostas em microplacas de poliestireno e identificadas com os números dos soros dos animais no estudo. Como antígeno, foi utilizado um painel composto de 23 cepas de referência recomendadas pela OMS e uma cepa isolada de um paciente, no ano de 1996, sendo cada cepa representando um sorovar constituinte de cada sorogrupo, como listadas no quadro 4. As cepas para serem utilizadas precisam estar com em média 4 a 7 dias de crescimento e livres de auto-aglutinação ou contaminação. Estas culturas foram diluídas em PBS com diluição 1:4, observada a concentração ideal quando as leptospiras se encontrarem uniformemente dispostas no campo. Distribuíram-se 50 µl destas em cada poço das placas já contendo os soros diluídos, resultando uma concentração inicial de 1:25. Quando o resultado destas amostras foi positivo para o título de 1:100, foram tituladas, posteriormente para obtenção do maior título. O menor e o maior título testados na MAT foram, respectivamente, 1:25 e 1:6400. O sorogrupo presuntivo foi determinado pela cepa que manteve maior título no MAT e as reações mistas foram consideradas quando a amostra do animal foi reagente com título máximo igual para mais de uma cepa de sorogrupos diferentes. Para fins de análises, títulos  $\geq$  1:100 foram considerados positivos (BAULU et al., 1987; PEROLAT et al., 1992; LUNA-ALVAREZ, et al., 1996; LILENBAUM et al., 2005; PIMENTEL et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; CORRÊA et al., 2004; PINNA et al., 2011; ROMERO et al., 2011; ULLMAN et al., 2011).

Quadro 4: Relação dos serovares de *Leptospira* empregadas com antígenos na técnica de soroaglutinação microscópica (MAT)

<b>Espécie</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Sorovar</b>	<b>Cepa de Referência</b>
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 Z
<i>L. noguchii</i>	Lousiana	Lousiana	1945
<i>L. weilli</i>	Javanica	Coxi	Cox
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Duyster
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc I
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	L1 130
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castelon 3
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
<i>L. santarosai</i>	Grippotyphosa	Canalzone	CZ188
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C



#### 4.5 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E URINA

A extração e purificação do DNA das amostras de sangue total, foram realizadas utilizando um Kit de extração QIAamp DNA minikit® (Qiagen) conforme descrição do fabricante. Foram adicionados 200 µl da amostra de sangue, sendo a eluição feita em 100 µl de TE fornecido pelo *Kit*, as amostras de DNA foram armazenadas a -70 C até execução do Real-time PCR.

#### 4.6 PCR EM TEMPO REAL

As amostras de DNA foram submetidas ao PCR em tempo real utilizando o método TaqMan, os primers utilizados foram: *lipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e *lipL32-286R* (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') (ROJAS et al., 2010; CHAGAS-JÚNIOR et al., 2012). Estes são específicos de regiões conservadas no gene *lipL32* de leptospiros patogênicos. Para todas as PCRs, 5 µl do DNA foram adicionados à 20 µl do Super Mix Platinum qPCR (Invitrogen), com concentrações de 10 µM e 5 µM dos iniciadores e da sonda respectivamente. Foram utilizadas as mesmas concentrações e configurações citadas anteriormente. As amplificações e detecção de fluorescência foram conduzidas no sistema ABI Prims 7500 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, USA) com um programa de 40 ciclos, cada ciclo consistindo de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Para cada corrida com *LipL32* foi utilizada uma curva padrão construída com diluições seriadas que variou de 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> bactérias da cepa Fiocruz L1130.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE SOROLÓGICA

No momento da amostragem nenhum dos animais estudados do PZGV e do CETAS apresentaram sinais clínicos de leptospirose. No PZGV apenas 1 das 42 (2%) amostras de soro de primatas testado obteve título  $\geq 100$ . A única reação positiva teve sororeatividade mista para os sorogrupos Australis e Icterohaemorrhagiae (Tabela 1). Este único animal positivo era uma fêmea adulta da espécie *Alouatta caraya* (bugio preto) que foi alojado em um recinto, em contato com outros dois bugios pretos um macho e uma fêmea, adultos sendo um deles nascido no próprio PZBGV e outro oriundo do CETAS Salvador, ambos negativos na MAT.

Tabela 1 Distribuição dos sorogrupos infectantes previstos (inferidos pelo título mais alto através do MAT) nos soros de 15 primatas do PZGV Salvador, BA, com amostras reativas (com título mínimo de 1:25)

Sorogrupo	Sorovar	Cepa	Títulos				Total
			25	50	100	200	
Australis	Bratislava	Jez Bratislava	5	-	-	-	5
Ballum	Castellonis	Castelon 3	4	-	-	-	4
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	2	1	-	-	3
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	1	-	-	-	1
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitino	-	1	-	-	1
Australis / Icterohaemorrhagiae	Bratislava / Copenhageni	Jez Bratislava / L1130	-	-	1	-	1
<b>Total</b>			<b>12</b>	<b>2</b>	<b>1</b>		<b>15</b>

\*Nota: foram considerados como positivos títulos  $\geq 100$

No CETAS 5/16 (31%) das amostras de soro testadas foram positivas (títulos  $\geq 100$ ). Nas 13 amostras que apresentaram aglutinação com título mínimo de 1:25, títulos variaram de 25 a 200 (Tabela 2), e as reações positivas identificaram os sorogrupos Ballum, Semarang, e

Grippotyphosa, Cynopteri e uma reação mista para Grippotyphosa / Icterohaemorrhagiae. Estes animais eram 2 fêmeas e 3 machos adultos.

Tabela 2. Distribuição dos sorogrupos infectantes previstos, (inferidos pelo título mais alto através do MAT) nos soros de 13 primatas do CETAS Salvador, BA, com amostras reativas (com título mínimo de 1:25)

Sorogrupo	Sorovar	Cepa	Títulos				Total
			25	50	100	200	
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	1	2	-	-	3
Ballum	Ballum	Mus 127	1	-	1	-	2
Semaranga	Patoc	Patoc 1	1	-	-	1	2
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	1	-	-	-	1
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Duyster	-	-	1	-	1
Cynopteri	Cynopeteri	3522 C	-	-	1	-	1
Serjoe	Hardjo	Hardjoprajitino	1	-	-	-	1
Tarassovi / Autumnalis	Tarassovi/Autumnalis	Perepecilin/Akiyami A	1	-	-	-	1
Grippotyphosa / Icterohaemorrhagiae	Grippotyphosa/Copenhageni	Duyster /L1130	-	-	1	-	1
<b>Total</b>			<b>6</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>13</b>

\*Nota: foram considerados como positivos títulos  $\geq 100$

## 5.2 BIOLOGIA MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE SANGUE E URINA

Foram analisadas através da PCR amostras de sangue de todos os 42 animais do PZBGV e 16 animais do CETAS. Amostras de urina foram coletadas de 3 animais do Zoológico e 14 do Cetas. As amostras de urina coletadas incluem o animal positivos na MAT do Zoo e os 5 animais positivos na MAT do CETAS. Nenhuma das amostras analisadas foi positiva.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, apenas um dos 42 primatas (2%) do Parque Zoobotânico de Salvador teve amostra de soro positivas por MAT. Este animal era uma fêmea adulta da espécie *Alouatta caraya* (bugio preto) que teve uma amostra com reação mista de 1:100 para os sorogrupos Australis e Icterohaemorrhagiae. Este animal nasceu no próprio Zôo e foi alojado em um recinto com outros dois bugios pretos soronegativos, sendo um deles nascido no próprio Zôo e outro oriundo do CETAS Salvador.

A baixa soroprevalência encontrada no PZGV não era esperada. Salvador é a terceira cidade mais populosa do Brasil, com cerca de 2,6 milhões de habitantes e 60% deles vivem em favelas (RILEY et al., 2007). É um grande centro urbano, com deficiências no saneamento básico e com picos de incidência de casos de leptospirose graves durante a estação chuvosa e em associação com inundações (KO et al., 1999; RILEY et al., 2007; COSTA et al., 2001). Os relatos dos funcionários Zoológico indicaram que existe uma elevada população de roedores no parque e eles são frequentemente vistos no interior dos recintos. Em algumas pesquisas realizadas em zoológicos da América Latina, a soroprevalência de anticorpos anti-*Leptospira* variou de 6 a 56,8 %. E taxas mais elevadas foram atribuídas ao contato de primatas com roedores urbanos (ROMERO et al., 2011; CORRÊA et al., 2004; LILENBAUM et al., 2002).

Um argumento adicional sobre o papel de roedores como a fonte da infecção é a elevada prevalência Icterohaemorrhagiae predito como o sorogrupo infectante (inferidos pelos títulos mais elevados na MAT), em alguns destes estudos (PINNA et al., 2011; ROMERO et al., 2011; LILENBAUM et al., 2002 LILENBAUM et al., 2005)

É bem estabelecido que os sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae (do sorogrupo Icterohaemorrhagiae) são seletivamente carregados por roedores urbanos, tais como o rato marrom (*Rattus norvegicus*) e o rato preto (*R. rattus*) (BHARTI, 2003). Num estudo de ratos capturados em Salvador, 80% de todos os 142 animais tiveram culturas positivas para leptospiros de amostras de rim ou de urina, e todos os 59 isolados sorotipados por anticorpos monoclonais foram caracterizados como Copenhageni (sorogrupo Icterohaemorrhagiae) (DE FARIA et al., 2008), que é a principal causa da leptospirose grave em Salvador e em outros grandes centros urbanos brasileiros (KO et al., 1999; PEREIRA et al., 2000) Não é possível inferir se o único

exemplar de bugio preto com MAT positivo adquiriu a infecção de ratos, uma vez que teve uma reação mista como sorogrupo Bratislava, que não tem seletividade conhecida por roedores

Bratislava é um sorovar comumente associado ao gado (bovinos, suínos e ovinos) e equinos, os quais podem ou não apresentar sintomatologia clínica (WHO, 2007). Também é carreado por camundongos e animais silvestres como raposas (ELLIS et al., 1985,). Embora já tenha sido descrito na fauna silvestre brasileira, em felídeos (CORRÊA et al., 2004) e em queixadas (FREITAS et al., 2010), até o momento não há relatos de anticorpos contra este sorovar em primatas.

A prevalência encontrada no CETAS foi semelhante à encontrada em outros estudos realizados em primatas de cativeiro (LILENBAUM et al., 2005; IBANEZ-CONTRERAS et al., 1996). Em estudo anterior foi relatado uma prevalência de 57 % ao se avaliar amostras de primatas cativos nesta instituição (PINNA et al., 2011). Neste estudo prévio (Anexo 1), a maior população era de sagüis e amostras positivas foram distribuídos da seguinte forma: *Callithrix jacchus* (sagüi comum) (16/28: 57%), *Callithrix penicillata* (sagüi-de-tufo Preto, 4/8: 50%) e *Cebus* sp. (macacos-prego, 5/8: 63%). No presente estudo, verificou-se 5/16 (31%) amostras de soro positivo na MAT de *Cebus* sp. Assim, a alta taxa de evidência sorológica de exposição a leptospiros parece ser um achado consistente entre os animais de vida selvagem que são resgatados do comércio ilegal, no estado da Bahia.

No primeiro estudo realizado no CETAS, o sorogrupo infectante previsto pelo MAT foi *Icterohaemorrhagiae* em 84% dos casos. Neste estudo, as cinco amostras positivas foram distribuídos nos sorogrupos: Ballum (1:100), Semarang (1:200), Grippytyphosa (1:100), Cynopeteri (1:100) e uma reação mista Tarassovi / Autumnalis (1:100). Assim, enquanto que a elevada frequência de *Icterohaemorrhagiae* indicou que os macacos poderiam ter adquirido a infecção no ambiente de cativeiro, a vasta gama de sorogrupos previstos no presente estudo pode ser atribuída às diferentes origens dos animais resgatados do tráfico ilegal e indicam que estes animais podem ser expostas a várias fontes potenciais de infecção ambiente selvagem.

O Sorovar Patoc pertencente ao Sorogrupo Semarang, obteve o título mais elevado na MAT. Este é representante das leptospiros não patogênicas (*Leptospira biflexa*) e é frequentemente usado em investigações sorológicas como antígeno específico de gênero, pois apresenta reações cruzadas com sorovares patogênicos e pode detectar anticorpos mais

precocemente no curso da infecção por um sorovar patogênico (MAUERMANN et al., 1993) Este achado indica que outro sorogrupo patogênico pode estar envolvido na infecção.

Este estudo também avaliou a possível associação de evidência sorológica de exposição à infecção ativa e excreção urinária, por detecção de PCR de DNA de leptospiras no sangue e na urina, respectivamente. Todas as amostras avaliadas foram negativas e indicam não haver infecção ativa ou estado de portador renal nos primatas do PZGV e CETAS de Salvador. Estes dados corroboram com os dados de Ullman et al., (2011) que não encontraram positividade ao analisarem amostras de sangue e urina de animais silvestres através de PCR no Zoológico de Sorocaba, São Paulo. No entanto, o fato da excreção urinária de leptospiras em reservatórios ou em portadores covalentes ser intermitente, a necessidade de obtenção de amostras de urina em diversos momentos deve ser considerada em estudos futuros com número maior de amostras afim de estimar os riscos envolvidos no contato íntimo com animais exóticos, incluindo primatas neotropicais, quando utilizados como animais de estimação.

## 7. CONCLUSÃO

A soroprevalência de anticorpos anti-*Leptospira* foi baixa no Zôo de Salvador, apesar da alta frequência de roedores na área e endemicidade da leptospirose humana em Salvador. A soroprevalência elevada foi observada entre os animais resgatados do comércio ilegal no estado da Bahia. Apesar da investigação por PCR no sangue e urina destes animais ter resultados negativos em todas as amostras esta evidência sorológica de exposição sugere um risco potencial de transmissão da leptospirose ao se adotar estes primatas como animais de estimação.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PENA, M. A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p.287- 296, 2010.
- ALMEIDA, L. P.; MARTINS L. F. S.; BROD C. S. et al. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n.1, p.44-50, 1994.
- ATHANAZIO, D.A.; SILVA, E.F.; SANTO, C.S.et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**. v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008.
- BAITCHMAN E.J.; CALLE .PP.; JAMES S. B. et al. Leptospirosis in Wied's marmosets (*Callithrix kuhlii*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** v.37, p.182-185. 2006.
- BAULU, J.; EVERARD, C.O. R.; EVERARD, J. D. Leptospirosis in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaues*) on Barbados. **Journal of Wildlife Disease**, v. 23, v.1, 1987, p. 60-66, 1987.
- BHARTI, A.R; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infection Disease**, v.3, p. 757-71, 2003.
- BLAZIUS, R.D.; ROMÃO, P.R.; BLAZIUS, E.M. et al. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na Cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p.1952-1956, 2005.
- CHAGAS-JUNIOR, A. D.; MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A. et al. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1632-1637, 2009.



CHOMEL, B. B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F. Wildlife, Exotic Pets, and Emerging Zoonoses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 6-11, 2007.

CHU K. M.; RATHINAM, R.; NAMPERUMALSAMY, P. et al. Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India. **Journal of Infectious Disease**, v. 177, p. 1314-1321, 1998.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELOS, S. A.; MORAIS, Z. et al. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Reserach and Animal Science**. n. 41, p. 189-193. 2004.

COSTA E.; COSTA Y. A.; LOPES A. A. et al. Severe forms of leptospirosis: clinical, demographic and environmental aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 261-2001.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. 1 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2007. 1354 p.

CUMBERLAND P.; EVERARD, C. O. R.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 61, n. 5, p.731-734, 1999.

DE FARIA, M.T; CALDERWOOD, M.S; ATHANAZIO, D.A. et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v.108, n.1, p.115-121, 2008.

ELLIS, W. A.; McPARLAND, P. J.; BRYSON, D. G. et al. Leptospire in pig urinogenital tracts and foetuses. **Veterinary Record**, v.117, p.66-67, 1985.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. et al. *Leptospira* and Leptospirosis. **Medicine and Science**, 2 ed: Melbourne, Austrália. 1999.

FERREIRA, D.R.A.; LAROQUE, P.O.; WAGNER, P.G.C. et al. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. em *Cebus* spp. mantidos em cativeiro no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.11, p.1019-1023, 2011

FREITAS, T.P.T.; KEUROGHLIAN, A.; EATON, D.P. et al. Prevalence of *Leptospira interrogans* antibodies in free-ranging *Tayassu pecari* of the Southern Pantanal, Brazil, an ecosystem where wildlife and cattle interact. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p.1695-1703, 2010.

GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 21, p. 463-472, 2005.

HAMBLETON, P.; BASKERVILLE, A.; MARSHALL R. B. et al. Metabolic sequelae of experimental leptospirosis in grivet monkeys. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 61, p. 16-21, 1980.

HEINEMANN M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M. et al. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 73, p.261-267, 2000.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 1ed. California: Editora Guanabara, 2003.

IBANEZ-CONTRERAS, A; HERNANDEZ-GODINEZ, B; TORRES- BARRANCA, J. I. et al. Hallazgos de anticuerpos contra *Leptospira* sp., serovarietades Panama, Lai, Australis, Shermani y Patoc, en un grupo de monos rhesus (*Macaca mulatta*) en condiciones de cautiverio. **Archivos de Medicina Veterinaria**. [online]. v.42, n.2, p. 101-104. 2010.

KESSLER M. J, EVERARD C.O.R. Leptospiral agglutinins in the Cayo Santiago macaques. **American Journal of Primatology**, v.14, p. 369-373, 1988.

KO, A. I., REIS, M. G., DOURADO, C. M. R. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, p. 820-825, sep. 1999.

KO, A.I; GOARANT, C; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Review Microbiology**, v.7, n.10, p.736-747, 2009.

LEVETT P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L. et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, 54: 45-49, 2005.

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

LILEBAUM, W.; VARGES, R.; MORAES, I. A. et al. Leptospiral antibodies in captive lion tamarins (*Leontopithecus* sp.) in Brazil. **The Veterinary Journal**. v. 169, p. 462-464, 2005.

LILEBAUM, W.; MONTEIRO, R. V.; ALBUQUERQUE, C. E. et al. Leptospiral antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. **Research in Veterinary Science**, n. 73, p. 319–321, 2002.

LUNA-ALVAREZ, M.; MOLES, L. P. C.; TORRES, J. I. B. et al. Investigación serológica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México. **Veterinaria México**, v.27, n.3, p.229-34, 1996.

MARSHALL. R. B.; HAMBLETON, B. A. A.; ADAMS G.D. Benign leptospirosis: the pathology of experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans* serovars balcanica and tarassovi. **British Journal of Experimental Pathology**, v.61, p.124-31, 1980.

FANTONI, D.T.; COROTOPASSI, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. In: MASSONE, F. **Anestésicos injetáveis**. Roca, São Paulo, SP, , 2003. p. 159.

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

MCBRIDE, A.J.A.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G. et al.. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.18, p. 376-386, 2005.

MEDEIROS F. R.; SPICHLER, A.; ATHANAZIO D. A.; Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. **Acta Tropica**, v.115, p.155-62. 2010

MINETTE H. P., SHAFFER, M. F. Experimental leptospirosis in monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, p. 202-212, 1968.

MINETTE, H. P. Leptospirosis in primates other than man. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.15, p.190-198, 1966.

NETO, G. G. **Freqüência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil.** 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. São Paulo: Jaboticabal.

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

PALMER M. F.; WAITKINS, S. A.; FITZGEORGE, R. B. et al. Experimental infection of monkeys with *Leptospira interrogans*. **Epidemiology & Infection**, v. 98, p.191-197, 1987.

PEREIRA, M. M.; MATSUO, M. G.; BAUAB, A. R. et al. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Jounal Clinical Microbiology**, v.38, p. 450-2, 2000.

PEREIRA, M. M.; SILVA, J. J. P.; PINTO, M. A. et al. Experimental Leptospirosis in Marmoset Monkeys (*Callithrix jacchus*): A New Model for Studies of Severe Pulmonary Leptospirosis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, USA, v. 72, n. 1, p. 13-20, 2005.

PEROLAT, P, POINGT J. P.; VIE, J. C. et al. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, n.5, p.538-545, 1992.

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

PINNA, M.H.; MARTINS, G.; PINHEIRO A.C. et al. Detection of anti-*Leptospira* antibodies in captive nonhuman primates from Salvador, Brazil. **American Journal of Primatology**, v.74, p. 8-11, 2011.

RILEY L. W.; KO A. I.; UNGER, A. et al. Slum health: diseases of neglected populations. **BMC International Health and Human Rights**, v. 7, n. 2, 2007.

ROJAS P.; MONAHAN, A. M.; SCHULLER, S. et al. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, 1305-1309, 2010.

ROMERO, E.C; BERNARDO, C.C; YASUDA, P.H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.45, p.245-248, 2003.

ROMERO, M. H., ASTUDILLO, M.; SÁNCHEZ, J. A. et al. Anticuerpos contra *Leptospira* sp. em primates neotropicales y trabajadores de un zoológico colombiano. **Revista Salud Pública**, v.13, n. 5 p. 814-823, 2011.

SAMBIAVA R. R.; NAVEENBALLA, G.; P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the rest of the world. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7,p. 178-193, 2003.

SANTA ROSA C. A.; CASTRO, A. F. P. D.; SILVA, A. S. D. et al. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p.19-27, 1970.

SARKAR, V; NASCIMENTO, S.F; BARBOSA, R. et al. Population-Based Case-control investigation of risk factors for leptospirosis during in Urban Epidemic. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.66, p.605-610, 2002.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; FEDULLO, J. D. L. et al. E. *Leptospira* spp. Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Clinical Samples of Captive Black-capped Capuchin Monkey (*Cebus apella*). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, n. 34, p. 143-146, 2003.

SEBASTIAN, E. Leptospirosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**.v. 205, p. 1518-1523, 1994.

SOUZA-JÚNIOR, M. F. S.; LOBATO, Z. I. P.; LOBATO, F. C. F. et al. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 3, n. 39, p. 292-294. 2006.

SMYTHE L. D.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A. et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, 2:13. 2002.

STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p.247-255, 2009.

SUGUNAN, A. P.; VIJAYACHARI, P.; SEHGAL, S. C. Evaluation of microscopic agglutination test as a diagnostic tool during acute stage of leptospirosis in high and low endemic

areas. 3rd Scientific Meeting - Bridgetown, Barbados. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 15, p.190-198. 2002.

SZONYI B.; AGUDELO-FLÓREZ, P; RAMÍREZ, M.. et al. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. **The Veterinary Journal**. v.188, n. 2, p. 237-239. 2011.

THIERMANN, A. B. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. **American Journal of Veterinary Research**. 44:2244–2245. 1984.

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K. et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**. n. 7, p. 35-40, 2004.

ULLMANN, L. S.; RAMIRO NETO, N.D.; TEIXEIRA, R.H.F. et al. Epidemiology of Leptospirosis at Sorocaba Zoo, São Paulo State, Southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.11, p. 1174-1178, 2012.

VASCONCELLOS, S. A.; **Leptospirose em animais domésticos e silvestres: prevenção e controle**. Salvador Oficina Estado da Arte e Prioridades para P&D em Leptospirose/FIOCRUZ, 2000. 12p.

VINETZ J. M. (2001) Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 14, 527-538.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leptospirosis Laboratory Manual**. New Dhleli , 2007.

## **ANEXOS**

### **1. Artigo científico publicado**

Detection of Anti-Leptospira Antibodies in Captive Nonhuman Primates From Salvador, Brazil. .  
Pinna MH, Martins G, Pinheiro ACO, Almeida DS, Oriá AP, Lilenbaum W. American Journal of  
Primateology 74:8–11 (2012)

### **2. Autorização para atividades com finalidade científica, número: 38235-1**



## COMMENTARY

Detection of Anti-*Leptospira* Antibodies in Captive Nonhuman Primates From Salvador, Brazil

MELISSA H. PINNA<sup>1\*</sup>, GABRIEL MARTINS<sup>2</sup>, ANA CARLA O. PINHEIRO<sup>1</sup>, DANIELA S. ALMEIDA<sup>1</sup>, ARIANNE P. ORLÁ<sup>3</sup>, AND WALTER LILENBAUM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bacteriosis Laboratory, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, Brazil

<sup>2</sup>Veterinary Bacteriology Laboratory, Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pathology and Clinic, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, Brazil

Leptospirosis is a widely distributed zoonosis that affects several species of domestic and wild animals. Under captive conditions, Leptospirosis is a potential problem because the physical conditions in most zoos and research centers cannot prevent the captive animals from being exposed to rodents, raccoons, opossums, and other local wildlife that are known carriers. Yet, despite the potential risk, animals that are destined for reintroduction into the wild are not routinely tested for anti-*Leptospira* antibodies before their release. The purpose of this study was to determine the occurrence of anti-*Leptospira* antibodies in captive New World monkeys that were housed in the Wild Animals Screening Center in Salvador, Brazil. Blood samples were collected from 44 monkeys (28 *Callithrix jacchus*, eight *Callithrix penicillata*, and eight *Cebus* sp.). The animals were screened for antibodies with the microscopic agglutination test. Twenty-five (56.8%) primates were seroreactive, with Icterohaemorrhagiae being the most frequent serogroup. None of the monkeys, however, presented clinical signs of leptospirosis. Thus, seroreactivity with low titers in asymptomatic animals, as observed in this study, suggests exposure to the agent. The unexpected predominance of the serogroup Icterohaemorrhagiae further suggests that exposure to this serogroup occurred in captivity. Therefore, the dangerous possibility cannot be ignored that reintroduced monkeys will carry the leptospiral serovars into wild populations. In conclusion, primates exposed to urban serovars before their release from captivity represent a potentially significant health risk to wild populations. *Am. J. Primatol.* 74:8–11, 2012.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** leptospirosis; nonhuman primates; diagnosis; reintroduction

## INTRODUCTION

Leptospirosis is a widely distributed zoonosis that affects several species of domestic and wild animals, and humans are the endpoint of its epidemiological chain. An infected animal, even when asymptomatic, can intermittently introduce viable leptospires into the immediate environment through its urine [Faine et al., 2000].

Wildlife species are susceptible to infection with a wide variety of serovars, for which they serve as incidental hosts. Acute leptospirosis is similar in all animals. In its most flagrant form, it is manifested by listlessness, loss of appetite, irritability, fever, ruffled fur, red eyes, and sometimes diarrhea, hemorrhage, jaundice, spontaneous abortion, chronic renal failure, and death [Faine et al., 2000].

Although frequently present in Brazilian wildlife, anti-*Leptospira* antibodies are not often described in captive animals [Lilenbaum et al., 2002]. The occurrence of leptospirosis under captive condi-

tions, however, presents a potentially significant risk. Housing conditions in zoos and research centers often cannot fully isolate the captive animals from local wildlife (e.g., rodents, raccoons, opossums, etc.), which may gain entry into these facilities [Baulu et al., 1987; Perolat et al., 1992; Scarcelli et al., 2003; Shive et al., 1969; Szonyi et al., 2011].

Captive nonhuman primates may be exposed to [Lilenbaum et al., 2005] and carry leptospirosis [Baichman et al., 2006; Palmer et al., 1987; Szonyi et al., 2011]. Thus, projects that return wildlife to

\*Correspondence to: Melissa H. Pinna, Bacteriosis Laboratory, Universidade Federal da Bahia, Avenida Adhemar de Barros, 500–Ondina, Salvador/BA, Brazil. E-mail: melissahp@ufba.br

Received 14 February 2011; revised 15 August 2011; revision accepted 21 August 2011

DOI 10.1002/ajp.21005

Published online 3 November 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

their natural habitats should implement a strict quarantine—60 days for primates—and veterinary program for these animals before their release. A variety of screening tests are recommended by the International Union for Conservation of Nature [IUCN, 1998], but a test for anti-*Leptospira* antibodies is not currently one of them. Not screening for these antibodies represents a risk, because *Leptospira* is dangerous for humans as well as domestic animals, wildlife, and ecosystems in general [Woodford, 2001]. In an attempt to assess the extent of this risk, this study investigated the occurrence of anti-*Leptospira* antibodies in representatives of New World monkey species that were being held in captivity for health screening, before being returned to their natural habitats.

## METHODS

The study was approved by the Research Ethics Committee of Federal University of Bahia (process no 025/09-A) and by the Environmental Department of Brazil (IBAMA-SISBIO no 20.831-1). This research adhered to the American Society of Primatologists principals for the ethical treatment of primates.

In September 2009, blood samples were collected from 44 monkeys (28 *Callithrix jacchus*, 8 *Callithrix pennicilata*, and 8 *Cebus* sp.) held in captivity at the Chico Mendes Wild Animal Screening Center, a facility located near the Federal University of Bahia in Salvador, Brazil. The monkeys had been brought to the Center by the Brazilian legal authorities following the arrest of poachers who had trapped the animals in the forest for the purpose of selling them on the black market. None of the monkeys had been vaccinated against leptospirosis. Before the samples were collected, the animals were anesthetized (Ketamine hydrochloride 10%, 20–30 mg/kg IM) and then given a complete clinical examination.

After separation by centrifuge, the serum was stored in 2ml aliquots at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent testing in the Veterinary Bacteriology Laboratory at the Universidade Federal Fluminense in Rio de Janeiro, Brazil. Antibodies were screened at a dilution of 1:50 with the microscopic agglutination test (MAT) for the most frequent serogroups in this area [Lilenbaum et al., 2005]: *L. interrogans* serovars Australis (Ballice), Bataviae (Van Tienen), Canicola (Hond Utrecht IV), Icterohaemorrhagiae (RGA), Copenhageni (M 20), Pomona (Pomona), Pyrogenes (Salinem), and Wolffi (3705); *L. borgpetersenii* serovar Ballum (Mus 127); and *L. kirshneri* serovar Grippotyphosa (Moskva V). The serovars were grown in an Ellinghausen liquid medium, which was free of contamination or autoagglutination. For each sample with agglutinating activity at a 1:50 dilution, the antibody titer was established by preparing additional two-fold serial dilutions according to

Lilenbaum et al. [2002]. The antigen that gave the highest titer was considered to be the infective serogroup. Samples were considered to be reactive if the titer value was equal to or greater than 100.

## RESULTS

At the time of sampling, none of the 44 monkeys studied presented clinical signs of leptospirosis. Twenty-five (56.8%) were seroreactive (titers  $\geq 100$ ). Of this seroreactive group, the serogroup Icterohaemorrhagiae was found most frequently (21 monkeys or 84%), followed by the serogroup Canicola (4 monkeys or 16%).

Seroreactivity was most commonly observed in *Cebus* sp. (62.5%), followed by *C. jacchus* (57.1%) and *C. pennicilata* (50%). Titers ranged from 100 to 200, indicating exposure to the agent. No animal presented titer values greater than 200 (Table I).

## DISCUSSION

Seroreactivity was very high in the monkeys investigated in this study (56.8%), higher than that reported in tamarins from Rio de Janeiro, Brazil: 35.6% [Lilenbaum et al., 2005], squirrel monkeys from French Guiana: 26% [Perolat et al., 1992], or vervet monkeys in Barbados: 29.9% [Baulu et al., 1987]. Despite this high seroreactivity, however, none of the monkeys in this study presented clinical signs related to leptospirosis.

The MAT requires significant expertise to perform, and interlaboratory variation in results is high. Despite these limitations, the MAT has epidemiological value, and it is often used to give an indication of the presumptive serovar or serogroup of leptospires involved in an infection [Levett, 2003; Smythe et al., 2009; Sykes et al., 2011].

A nonhuman primate acquiring acute leptospirosis with high titers while living in the wild is uncommon [Minnette, 1966]. As found by others [Szonyi et al., 2011], however, this investigation reveals that monkeys can nevertheless carry the infection at low titers and not present specific signs or symptoms. Such cases suggest that the animals have been exposed to the agent. Moreover, following exposure, some monkeys may shed leptospires through intermittent leptospiuria (i.e., passing

TABLE I. Anti-*Leptospira* Antibodies in 44 Captive Primates From Salvador, Brazil

Species	Anti- <i>Leptospira</i> titers					Total
	< 100	100	200	400	$\geq 800$	
<i>Callithrix jacchus</i>	12	11	5	-	-	28
<i>Callithrix pennicilata</i>	4	4	-	-	-	8
<i>Cebus</i> sp.	3	3	2	-	-	8
Total	19	18	7	-	-	44

leptospire in urine) [Baitchman et al., 2006; Szonyi et al., 2011].

Wildlife populations are frequently seroreactive to the serovars that are prevalent in their environmental surroundings [Lins & Lopes, 1984]. For Brazilian monkeys living in the wild, the most frequent serovars are Javanica, Ballum, Tarassovi, and Grippytyphosa [Correa et al., 1965]. Thus, this study's finding that 84% of the seroreactive monkeys have been exposed to the serogroup Icterohaemorrhagiae is surprising. This serogroup is reported in urban areas worldwide, including Salvador, the city in which the monkeys in this study were housed [Ko et al., 1999]. Although in captivity, animals can be exposed to urban serovars. Compared with their counterparts in the wild, captive monkeys spend more time on the ground, increasing their chances of contact with ground-dwelling urban rodents that are known carriers of leptospirosis, especially of serovars in the serogroup Icterohaemorrhagiae [Lilenbaum et al., 2002].

Considering the above, we suggest that the monkeys were not exposed to Icterohaemorrhagiae in the wild, but in captivity. A similar situation has been recently reported in Colombia [Szonyi et al., 2011], where capuchin monkeys (*Cebus* sp.) in a rehabilitation center were infected with the serovar Copenhageni (a member of serogroup Icterohaemorrhagiae), triggering an outbreak.

Direct transmission of *Leptospira* among monkeys has already been reported [Baulu et al., 1987]. Although not demonstrated in this study, *Leptospira*-exposed monkeys are known to become carriers [Baitchman et al., 2006; Szonyi et al., 2011]. Nevertheless, studies of the actual risk or frequency of primates serving as permanent or temporary reservoirs for leptospire are lacking. Additionally, once they have recovered from the illness, infected monkeys act as renal carriers, at least for a short time period [Baitchman et al., 2006; Szonyi et al., 2011]. Therefore, the possibility that infected monkeys can carry leptospiral serovars from captivity into the wild cannot be ignored. Although not yet confirmed, these reintroduced animals pose a potential health risk to wild populations [Daszak et al., 2000], particularly in tropical areas where the infection is common.

We recommend that a program be adopted that (1) isolates infected animals and (2) emphasizes the implementation of sanitation initiatives and hygienic conditions (e.g., routinely disinfecting shelters, minimizing exposure to stagnant water, rodent control) [Troedsson, 1997].

In conclusion, primates may be exposed to urban leptospiral serovars (e.g., Icterohaemorrhagiae) and represent a significant health risk to wild populations. To minimize this risk, we recommend that captive monkeys living naturally in those regions where the disease is endemic be tested for

anti-*Leptospira* antibodies before being released back into the wild.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). WL is a fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERENCES

- Baitchman EJ, Calle PP, James SB, Linn MJ, Raphael BL. 2006. Leptospirosis in Wied's marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37:182-185.
- Baulu J, Everard COR, Everard JD. 1987. Leptospires in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaues*) on Barbados. *Journal of Wildlife Diseases* 23:60-66.
- Correa MOA, Hyakutake S, Natale V, Galvao PAA, Aguiar HA. 1965. Estudos sobre a *Leptospira wolffi* em São Paulo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 25/27:11-25.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. 2000. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne: MediSci. 272 p.
- IUCN. 1998. IUCN guidelines for re-introductions. Prepared by the IUCN/SSC re-introduction specialist group. Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, Gland. 10 p.
- Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson WD, Riley LW. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador leptospirosis study group. *The Lancet* 354: 820-825.
- Levett PN. 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases* 36:447-452.
- Lilenbaum W, Monteiro RV, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LP. 2002. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Research in Veterinary Science* 73:319-321.
- Lilenbaum W, Vargas R, Moraes IA, Ferreira AM, Pissinatti A. 2005. Leptospiral antibodies in captive lion tamarins (*Leontopithecus* sp.) in Brazil. *The Veterinary Journal* 169:462-464.
- Lins ZC, Lopes ML. 1984. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in mazonian Brazil. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78:124-126.
- Minnette HP. 1966. Leptospirosis in primates other than man. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 15:190-198.
- Palmer MF, Waitkins SA, Fitzgeorge RB, Baskerville A. 1987. Experimental infection of monkeys with *Leptospira* interrogans serovar hardjo. *Epidemiology and Infection* 98:191-197.
- Perolat P, Poingt JP, Vie JC, Jouneau C, Baranton G, Gysin J. 1992. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46:538-545.
- Scarcelli E, Piatti RM, Fedullo JDL, Simon F, Cardoso MV, Castro V, Miyashiro S, Genovez M. 2003. *Leptospira* spp detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*). *Brazilian Journal of Microbiology* 34:143-146.
- Shive RJ, Green SS, Evans LB, Garner FM. 1969. Leptospirosis in Barbary apes (*Macaca sylvana*). *Journal of American Veterinary Medical Association* 155:1176-1178.
- Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwatanaporn A, Chueasuwanchai S, Day NP, Peacock SJ.

Seroreactivity for *Leptospira* in Captive Primates / 11

2009. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81: 695-697.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:1-13.
- Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI. 2011. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *The Veterinary Journal* 188: 237-239.
- Troedsson MHT. 1997. Abortion. In: Robinson NE, editor. *Current therapy in equine medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company. p 534-540.
- Woodford MH. 2001. *Quarantine protocols and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release in to the wild*. Paris: Office International des Epizooties. 104 p.



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38235-1	Data da Emissão: 13/03/2013 09:11	Data para Revalidação*: 12/04/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Melissa Hanzen Pinna	CPF: 073.593.677-35
Título do Projeto: ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM ANIMAIS SILVESTRES NO ESTADO DA BAHIA	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA	CNPJ: 15.180.714/0001-04

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	PESQUISA CIENTIFICA	02/2013	02/2015

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/igen">www.mma.gov.br/igen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Airanne Pontes Oriá	COLABORADOR	645.585.505-10	0504426788 SSP-BA	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SALVADOR	BA	Parque Zoológico Getúlio Vargas SSA	Fora de UC Federal
2		BA	Centro de Triagem de Animais Silvestres Chico Mendes	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 93475944



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 38235-1	<b>Data da Emissão:</b> 13/03/2013 09:11	<b>Data para Revalidação*:</b> 12/04/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Melissa Hanzen Pinna	CPF: 073.593.677-35
Título do Projeto: ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM ANIMAIS SILVESTRES NO ESTADO DA BAHIA	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA	CNPJ: 15.180.714/0001-04

1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Canidae, Ursidae, Gavialidae, Herpestidae, Chelonoidis carbonaria, Chelonoidis nigra, Chelonoidis petersi, Crocodylidae, Artiodactyla, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia, Rodentia, Xenarthra, Procyonidae, Perissodactyla, Hyaenidae, Pilosa, Primates, Mephitidae, Mustelidae, Viverridae, Chelonoidis chilensis, Alligatoridae, Lagomorpha, Chelonoidis denticulata, Felidae
---	--	--

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Urina, Sangue
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Urina, Sangue
3	Amostras biológicas (Primates)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Sangue, Urina, Fragmento de tecido/órgão
4	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
5	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Outros métodos de captura/coleta(CONTENÇÃO FÍSICA E QUÍMICA)
6	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Outros métodos de captura/coleta(CONTENÇÃO FÍSICA E QUÍMICA)
7	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta(CONTENÇÃO FÍSICA E QUÍMICA)
8	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta(CONTENÇÃO FÍSICA )

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 93475944**





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 38235-1	<b>Data da Emissão:</b> 13/03/2013 09:11	<b>Data para Revalidação*:</b> 12/04/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Melissa Hanzen Pinna	CPF: 073.593.677-35
Título do Projeto: ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA LEPTOSPIROSE EM ANIMAIS SILVESTRES NO ESTADO DA BAHIA	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA	CNPJ: 15.180.714/0001-04

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 93475944**

