



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DE *Leptospira* spp. E DE SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS
NA POPULAÇÃO DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) NO DISTRITO
FEDERAL.**

THAMIRIS FIGUEIREDO DA SILVA

BRASÍLIA – DF
MARÇO DE 2020



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**OCORRÊNCIA DE *Leptospira* spp. E DE SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS
NA POPULAÇÃO DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) NO DISTRITO
FEDERAL.**

ALUNA: THAMIRIS FIGUEIREDO DA SILVA

ORIENTADORA: Prof. Dra. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: XXX/ 2020

BRASÍLIA – DF

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**OCORRÊNCIA DE *Leptospira* spp. E DE SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS
NA POPULAÇÃO DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) NO DISTRITO
FEDERAL.**

THAMIRIS FIGUEIREDO DA SILVA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADA POR:

**GIANE REGINA PALUDO (Doutora, Universidade de Brasília)
ORIENTADORA**

**CRISTIANO BARROS DE MELO (Doutor, Universidade de Brasília)
EXAMINADOR INTERNO**

**LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRANO (Doutora, Universidade de Brasília)
EXAMINADORA EXTERNA**

BRASÍLIA, 10 DE MARÇO DE 2020

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DA SILVA, T. F. **Ocorrência de *Leptospira* spp. e de suas alterações laboratoriais na população de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2020, 55p. Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

DA SILVA, Thamiris Figueiredo. **Ocorrência de *Leptospira* spp. e de suas alterações laboratoriais na população de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2020. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2020.-Universidade de Brasília, 2020.

1. Roedores silvestres; 2. Leptospirose; 3. Sorologia; 4. PCR; 5. SAM; 6. Diagnóstico.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele nada na minha jornada teria sido do jeito que foi, sempre nos momentos de desespero me apeguei a Ele e sempre fui atendida, minha vida sem sua benção e iluminação não seria nada.

Agradeço ao meu pai e minha madrasta, pois eles sempre fizeram de tudo para que eu hoje pudesse estar aqui, deixaram de fazer muitas coisas para que eu e meu irmão pudéssemos ter as melhores oportunidades, tenho muito orgulho de tê-los em minha vida e nunca cansarei de agradecê-los por tudo.

A minha mãe (*in memoriam*) sei que de onde ela estiver está me olhando e guiando, espero que a minha jornada a deixasse orgulhosa caso pudesse acompanhá-la. Agradeço pelos primeiros ensinamentos, e por me mostrar o quanto a família é importante.

Aos meus amigos que me mostram sempre que família é quem o coração escolhe amar. Priscila, Sarah, Natália e Fernanda muito obrigada por acreditarem em mim, terem orgulho das coisas que faço, isso mostra que estou no caminho certo. Obrigada por entenderem minha rotina atribulada que nem sempre terei tanto tempo para estar com vocês quanto gostaria, mas que nem por isso o amor e a amizade são menores.

À equipe maravilhosa de trabalho. Ana, George, Camila, Luiz, Jessica e estagiários, muito obrigada pelas risadas, pela companhia, pelo empenho, pelos ensinamentos. Sem vocês nada disso teria sido o mesmo. À Ana e ao George, o agradecimento é dobrado, pois sem eles isso não teria acontecido, obrigada pela companhia, pelas loucuras, pelas broncas e, principalmente, pela ajuda, e por sempre virem conversar para resolvermos tudo.

Ao pessoal do laboratório, principalmente nesse segundo ano de mestrado, às residentes Janaina, Liliane, Stephanie, Luma, Talita e Thais, às técnicas Thais e Marcela, por toda ajuda, risadas, ensinamentos e companhia.

À minha orientadora Doutora Giane Regina Paludo, por me dar chance de conhecer mais sobre o maravilhoso mundo da patologia clínica desde a época que eu apenas aparecia no laboratório e nem a disciplina tinha feito. Desde então foram monitorias, PIBICs, TCC, residência, e agora depois de um tempo distante da área, o bendito mestrado. Agradeço por acreditar em mim, saber do meu potencial, e sempre me instigar a querer mais. Ter uma ótima

orientadora é que me despertou a vontade de ensinar. Agradeço, pois graças a você hoje sou professora com muito orgulho, e espero conseguir ser pelo menos 1/10 do que você é para todos os seus alunos e orientados.

Ao meu filhote Thommy, que esteve presente em momentos complicados, por me amar incondicionalmente e sem julgamentos, fazer companhia nos momentos de solidão, me fazer perceber o quanto é lindo ter um serzinho pra cuidar, e o quanto o amor não cabe no peito.

A todos aqueles que em algum momento passaram pela minha vida e acrescentaram algo, ajudando a moldar meu caminho para que chegasse nesse momento.

Agradecer a Capes pela bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACOES.....	xiv
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Objetivos Gerais</i>	2
1.2. <i>Objetivos Específicos</i>	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Leptospirose: Uma zoonose de grande importância</i>	3
2.2. <i>Leptospira spp.</i>	4
2.3. <i>Ciclo de transmissão e Epidemiologia</i>	5
2.4. <i>Diagnóstico</i>	5
2.5. <i>Leptospirose em animais sinantrópicos e silvestres</i>	6
2.6. <i>Capivara (Hydrochoerus hydrochaeris)</i>	7
2.7. <i>Leptospirose em capivaras</i>	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	11
CAPITULO 2.....	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19

INTRODUÇÃO	20
1. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1. <i>Comitê de ética</i>	21
2.2. <i>Área de estudo e amostragem</i>	21
2.3. <i>Captura dos animais</i>	22
2.4. <i>Colheita de amostra</i>	23
2.5. <i>Análises Hematológicas</i>	23
2.6. <i>Análise Molecular (PCR)</i>	24
2.6.1. <i>Extração de DNA</i>	24
2.6.2. <i>Protocolos de amplificação</i>	25
<u>2.6.2.1.</u> <i>GAPDH</i>	25
<u>2.6.2.2.</u> <i>Leptopira spp.</i>	25
2.6.3. <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	26
2.7. <i>Diagnóstico Sorológico</i>	26
2.8. <i>Análise estatística</i>	27
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

OCORRÊNCIA DE *Leptospira* spp. E DE SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NA POPULAÇÃO DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) NO DISTRITO FEDERAL.

Thamiris Figueiredo da Silva¹, Giane Regina Paludo²

¹Medica Veterinária/Mestranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

²Médica Veterinária/Doutora – UnB – Brasília/DF

A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é considerada o maior roedor do mundo, com excelente capacidade de adaptação em ambientes urbanizados e, por ser um animal sinantrópico, atua como transmissora de diferentes doenças. A leptospirose é uma doença contagiosa que atinge animais domésticos, silvestres e humanos, causada pela infecção por algumas espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Estudos sobre leptospirose em capivaras são escassos, e não existem pesquisas sobre essa doença nessa espécie no Distrito Federal e entorno. O objetivo desse estudo foi analisar a presença do DNA do agente e/ou de anticorpos anti-*Leptospira* spp em capivaras do Distrito Federal. Para isso, 56 capivaras de vida livre foram capturadas e o sangue coletado. As colheitas foram realizadas em dois locais distintos do Distrito Federal. As amostras foram utilizadas para a realização das análises hematológicas, bioquímicas, para detecção do DNA da *Leptospira* spp. pela reação da polimerase em cadeia (PCR) e para a realização da soroadglutinação microscópica (SAM). O ponto de corte utilizado no SAM foi 1:100. Nenhum animal apresentou amplificação na PCR para *Leptospira* spp., mas 41,1% (23/56) dos animais apresentaram anticorpos anti-*Leptospira* spp. no SAM. Os sorovares presentes foram *hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni* e *grippityphosa*. Nos exames laboratoriais foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas análises bioquímicas de creatinina, albumina e globulina, que poderiam indicar comprometimentos renais e hepáticos nos animais reagentes. Alterações no leucograma dos três animais com as maiores titulações (1:800 e 1:1600), podem denotar processos inflamatórios decorrentes de fases agudas da infecção pela *Leptospira* spp. A PCR utilizando amostras de sangue total para avaliação da infecção por *Leptospira* spp das capivaras de vida livre não se mostrou uma boa ferramenta. Mais estudos são necessários para a comprovação das alterações na hematologia e na bioquímica sérica. A presença de animais reagentes na sorologia mostra que a bactéria está circulante no ambiente urbano do Distrito Federal.

Palavras-Chaves: Roedores silvestres; Leptospirose; Sorologia; PCR; SAM; Diagnóstico.

ABSTRACT

OCURRENCE OF *Leptospira* spp. AND ITS LABORATORY ALTERATIONS IN THE CAPYBARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) POPULATION IN DISTRITO FEDERAL.

The capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) is considered the largest rodent in the world, with excellent adaptability in urbanized environments, and being a synanthropic animal, they can serve as a transmitter of different diseases. Leptospirosis is a contagious disease that affects domestic, wild and human animals, and it is caused by infection by some pathogenic species of the genus *Leptospira*. Studies on leptospirosis in capybaras are scarce, and there are no research on this disease in this species in the Federal District and its surroundings. The aim of this study was to analyze the presence of the agent's DNA and/or anti-*Leptospira* spp antibodies in capybaras in the Federal District. For this, 56 free-living capybaras were captured and the blood collected. The samples were taken in two different locations in the Federal District. The samples were used to carry out hematological and biochemical analyzes, whole blood was used to detect the DNA of *Leptospira* spp. by polymerase chain reaction (PCR) and the serum was used for microscopic agglutination test (MAT). No animals showed amplification in the PCR test for *Leptospira* spp., however 41.1% (23/56) of the animals showed anti-*Leptospira* spp. in MAT, the cutoff point used was 100. The serovars present were hardjo, icterohaemorrhagiae, copenhageni and grippotyphosa. In general, the animals showed a significant difference ($p < 0.05$) in the biochemical analyzes of creatinine, albumin and globulin, this could represent that the reactive animals would have their renal and hepatic systems affected. When comparing the 3 animals with the highest titers (1: 800 and 1: 1600) with the non-reactive animals, changes in the leukogram were observed, and the inflammatory process caused by the leptospire in the acute phase of the disease could justify these changes. The PCR test for health evaluation of free-living capybaras was not a good tool when using only whole blood samples. Further studies are needed to prove changes in hematology and serum biochemistry. The presence of reactive animals in serology shows that the bacterium is circulating in the urban environment of the Federal District.

Key words: Wild rodents; Leptospirosis; PCR; Serology; MAT; Diagnose.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Capivaras se alimentando ao redor de um lago localizado na Fundação Jardim Zoológico de Brasília.....**23**
- Figura 2.** . **A.** Imagem da área de colheitas das amostras dos grupo A (Latitude: 15°50'48.34"S, Longitude: 47°56'27.34"O), B (Latitude: 15°50'59.29"S, Longitude: 47°55'57.70"O) e C (Latitude: 15°51'3.28"S, Longitude: 47°56'18.18"O) **B.** Imagem da área de colheita das amostras no Lago Paranoá próximo ao Palácio da Alvorada, grupo D (Latitude: 15°47'45.85"S, Longitude: 47°49'33.43"O).....**31**
- Figura 3.** Preparação do dardo anestésico com as medicações e o gás butano. **B.** Utilização da zarabatana para a aplicação dos dardos anestésicos nos animais contidos no brete.....**32**
- Figura 4.** Colheita de sangue da veia femural de uma capivara, utilizando scalp 24 e seringa de 10 ml.....**32**
- Figura 5.** Eletroforese em Gel de Agarose 2% corado com Brometo de Etídio mostrando os resultados de diferentes PCR para Família *Leptospira* spp.....**35**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade total de animais coletados divididos entre idade e sexo.....	37
Tabela 2. Animais reagentes e não reagentes na sorologia e a divisão por grupo de acordo com a origem.....	37
Tabela 3. Variantes sorológicas mais prováveis e títulos detectados nos animais reagentes na soroaglutinação microscópica (SAM).....	37
Tabela 4. Variantes sorológicas encontradas e títulos detectados nos animais reagentes.....	38
Tabela 5. Valores das médias, desvio padrão e comparação dos valores hematológicos entre os animais reagentes e não reagentes do grupo total, identificados por meio da sorologia.....	39
Tabela 6. Valores das médias, desvio padrão (DP) e comparação dos valores bioquímicos entre os animais reagentes e não reagentes do grupo total, identificados por meio da sorologia.....	39
Tabela 7. Valores das médias, desvio padrão(DP) e comparação dos valores hematológicos entre os animais reagentes da Área 1 e reagentes da Área 2, contra o total de não reagentes, identificados por meio da sorologia.....	39
Tabela 8. Valores das médias, desvio padrão (DP) e comparação dos valores das análises bioquímicas entre os animais reagentes da Área 1 e reagentes da Área 2, contra o total de não reagentes, identificados por meio da sorologia.....	40
Tabela 9. Hemograma das amostras com maiores titulações na SAM (Sorovar copenhageni) comparado com a média dos animais não reagentes.....	40
Tabela 10. Análises bioquímicas das amostras com maiores titulações na SAM (Sorovar copenhageni) comparado com a média dos animais não reagentes.....	41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

% - Porcentagem
°C – Graus Celsius de Temperatura
µg - Microgramas
µL – Microlitros
µMol – MicroMol
ALT – Alanino Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal
CPK – Creatinofosfoquinase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Trifosfato de Desoxiribonucleosídeos
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FA – Fosfatase Alcalina
FAV – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMB - Febre maculosa brasileira
GAPDH – Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase
GGT – Gama Glutamiltransferase
IgM - Imunoglobulina M
IUCN - Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
K⁺ - Potássio
LPS - Lipopolissacarídeo
LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
mg – Miligramas
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mM – MiliMol
Na⁺ - Sódio
Ng - Nanograma
pb – Pares de base
PCR – Reação de Polimerização em Cadeia
pMol – Picomol
PPT – Proteínas Plasmáticas Totais
PT – Proteínas Totais
SAM – Soroaglutinação Microscópica
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UnB – Universidade de Brasília
UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
VG – Volume Globular

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae da ordem *Spirochaetales*, ou seja, são espiroquetas, um grupo primitivo de bactérias (Paster *et al.*, 1991). Atualmente, todas as 24 espécies conhecidas do gênero *Leptospira* são classificadas e distribuídas em mais de 320 sorovares, tendo como base a expressão do lipopolissacarídeo (LPS) exposto na superfície bacteriana. As diferenças estruturais na porção de carboidrato do LPS determinam a diversidade antigênica entre os numerosos grupos de sorovares (Gomes, 2015). E com essa base, podem ser divididas em dois grandes grupos: patogênicas e saprófitas (Oliveira *et al.*, 2013), com atualmente 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans* (*sensu stricto*), *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, com mais de 260 sorovares. E as espécies saprófitas incluem *L. biflexa* (*sensu stricto*), *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, com mais de 60 sorovares (Adler & Moctezuma, 2010).

A leptospirose é reconhecida como um importante problema emergente de saúde pública global devido à crescente incidência, tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos países desenvolvidos (Vijayachari *et al.*, 2008). Ocorre principalmente em locais de clima tropical, por propiciar condições favoráveis à transmissão da doença. Contudo, nos países desenvolvidos, a leptospirose continua sendo uma doença rara, e quando encontrada, tem sido cada vez mais associada a atividades recreativas (Farr, 1995; CDC, 1997; CDC, 1998). Embora a leptospirose não tenha o potencial de ser usada como arma, seus sinais clínicos podem imitar as febres hemorrágicas virais, merecendo atenção. Os ratos são o reservatório universal dessa zoonose, mas quase todas as espécies conhecidas de mamíferos podem transportar e excretar *Leptospira* (Cueto, 2013).

A capivara é considerada o maior roedor existente, pertencente à família Caviidae e à subfamília Hydrochoerinae (Woods & Kilpatrick, 2005). É um animal extremamente adaptável e pode ser encontrada em diversos ambientes alterados pelo homem. Pode alcançar altas densidades nesses locais caso falte predadores, se a capacidade de suporte do ambiente ajudar, sendo considerada uma praga em algumas ocasiões (Ferraz *et al.*, 2007). Frequentemente, pode ser encontrada em grandes populações em áreas urbanas, parques e até mesmo, áreas residenciais (Moreira *et al.*, 2013).

No Brasil, as capivaras também têm sido estudadas como reservatórios de *Leptospiras* e alguns trabalhos foram realizados para a detecção desses agentes (Vasconcellos, 2002). De acordo com os experimentos já realizados, as capivaras não mostram sinais de doença durante o período de amostragem. Estudos sobre soroprevalência em capivaras selvagens em várias regiões do Brasil mostraram taxas entre 30% e 94% (Silva *et al.* 2009; Gonçalves *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2012).

A leptospirose é uma doença infecciosa de grande importância, pois é uma zoonose de distribuição global cujo diagnóstico ainda é negligenciado (Rodrigues, 2018), e por outro lado, há o aumento na população de capivaras nos grandes centros, observado através dos meios de comunicação do distrito Federal onde são encontradas cada vez mais notícias (Globo, 2018; Globo 2020; R7, 2017; Metrôpoles, 2020; Correio Brasiliense, 2020), mostrando famílias de capivaras em contato íntimo com casas e clubes privados próximos ao Lago Paranoá, e no Jardim Zoológico. Por isso é de extrema importância avaliar a presença do agente causador desta doença nas capivaras no Distrito Federal bem como as espécies infectantes e as principais alterações laboratoriais ocasionadas pela infecção.

1.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho propõe a utilização de ferramentas moleculares para o diagnóstico da leptospirose, que podem servir de modelo para a descoberta de novas espécies de *Leptospira* ou pelo menos a identificação dos sorovares mais frequentes nesses animais.

1.2. Objetivos Específicos

Os objetivos deste trabalho são:

- Determinar a ocorrência e identificar dos sorovares de *Leptospira* patogênicas que acometem as capivaras no Distrito Federal.
- Verificar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas ocasionadas pela *Leptospira* spp.
- Comparar os resultados da PCR e da Sorologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Leptospirose: Uma zoonose de grande importância*

Entre a década de 90 e os dias atuais, a leptospirose vem se mostrando uma doença infecciosa de importância mundial. Ocorre principalmente em locais de clima tropical devido à alta umidade e chuvas recorrentes, que favorecem a transmissão da doença. Nos países desenvolvidos, a leptospirose continua sendo uma doença rara e, quando encontrada, tem sido cada vez mais associada a atividades recreativas (Farr, 1995; CDC, 1998). Embora a leptospirose não tenha o potencial de ser usada como arma, seus sinais clínicos podem imitar as febres hemorrágicas virais, merecendo atenção (CDC, 1997).

A infecção pode ser adquirida através do contato com reservatórios animais ou ambiente contaminado pela urina. Basicamente todos os mamíferos, incluindo mamíferos aquáticos em todo o mundo têm sido identificados como portadores de *Leptospira* (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003).

A leptospirose produz uma ampla gama de manifestações clínicas, que muitas vezes podem ser confundidas com algumas viroses comuns, como a gripe em seres humanos. Geralmente, o primeiro sinal clínico aparente é febre, por isso, pode ser confundida com várias outras doenças (Faine, 1993; Farr 1995). Tendo como outros sinais clínicos, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e falência reprodutiva. Devido à variação dos sinais clínicos, a maioria dos casos provavelmente é inaparente e associada a sorovares adaptados ao hospedeiro (André-Fontaine, 2006; Grooms, 2006).

O Brasil sofreu uma dramática transformação demográfica entre 1960 e 2020, que causou um aumento de aproximadamente 200% em sua população urbana, transformações que continuam acontecendo (IBGE, 2020). Uma das consequências dessa mudança foi a criação de favelas urbanas, onde a falta de saneamento básico favorece a transmissão da *Leptospira spp.* de roedores para outros animais, e para seres humanos. Com o histórico de surtos em grandes capitais brasileiras, essa doença tem uma vigilância ativa pelo Ministério da Saúde e as secretarias de cada estado. No período de 2010 a 16 de julho de 2019 foram confirmados no Brasil 33.561 casos de leptospirose, representando uma média anual de 3.356,1 casos. O número total de óbitos foi de 3.124, representando uma média de 312,4 óbitos por ano (SINAN/SVS/MS, 2020).

2.2. *Leptospira* spp.

A *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae e a ordem Spirochaetales (Faine *et al.*, 1999). São espiroquetas finas com extremidade em gancho e altamente móveis (Fraga *et al.*, 2015). Possuem cerca de 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento, são gram-negativa aeróbica obrigatória, e o gênero pode ser dividido entre espécies patogênicas e saprófitas (Faine *et al.*, 1999).

No ano de 1987, o gênero *Leptospira* possuía apenas três espécies: *Leptospira interrogans* (cepas patogênicas para os animais e o homem), *Leptospira biflexa* (cepas não patogênicas isoladas da água, da lama e, às vezes, do animal e do homem) e *Leptospira parva* (espécies não patogênicas isoladas da água, de uma amostra de albumina bovina e do útero de uma porca) (Gomes, 2015). Atualmente, na List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (bacterio.net/Leptospira, 2020) há a citação de 24 espécies e nenhuma subespécie, a última espécie acrescentada à lista foi no ano de 2018.

Em 2007 foi realizada a divisão do gênero entre as espécies patogênicas e as saprófitas. Treze espécies foram identificadas como patogênicas, com mais de 260 sorovares já identificados, e cada um tem o seu hospedeiro preferencial, ainda que uma espécie animal possa albergar um ou mais sorovares. Espera-se a adição de novas espécies, essa divisão baseia-se nas características antigênicas observadas em teste de aglutinação (Picardeau *et al.*, 2008). As espécies saprófitas, com aproximadamente 60 sorovares (Adler & Moctezuma, 2010), geralmente não causam a doença e existem no ambiente associado com água e solo úmido (Bulach *et al.*, 2006).

A classificação dos sorovares de *Leptospira* spp. baseia-se na diversidade de estrutura dos antígenos externos localizados na membrana, o lipopolissacarídeo (LPS), que possui a função de proteção (Faine, 1993). Além disso, o LPS induz a produção de aglutininas, opsoninas e anticorpos de proteção em roedores (Jost *et al.*, 1986; Farrelly *et al.*, 1987).

A virulência é determinada pela presença de proteínas do tipo Lig (LigA e LigB) envolvidas na adesão e evasão imunológica do sistema complemento, são expressas somente em cepas virulentas. As Lip132 têm função biológica ainda não esclarecida, mas mostraram virulência em modelo animal, e as hemolisinas que promovem a lise eritrocitária (Fraga *et al.*, 2015).

A *Leptospira* spp., nos animais infectados, localiza-se e pode permanecer de forma persistente nos rins e no trato genital de machos e fêmeas. Desta forma, animais infectados cronicamente podem ser portadores durante vários anos e atuarem como reservatórios e fontes de infecção para outros animais, inclusive o homem (OIE, 2004).

2.3. Ciclo de transmissão e Epidemiologia

A leptospirose pode ser transmitida diretamente entre os hospedeiros ou indiretamente através do ambiente. *Leptospira* spp. pode ser ingerida em alimentos ou água contaminados, espalhada através da urina ou água em aerossol ou transmitida por contato direto com a pele. Os microrganismos geralmente entram no corpo através das mucosas ou feridas (aberturas na pele). Estudos afirmam que também podem penetrar na pele intacta, imersa há muito tempo na água, embora isso seja controverso (Acha & Szyfres, 2003).

A *Leptospira* spp. é excretada na urina de animais com infecção aguda e crônica. Merece destaque que portadores crônicos ou animais adaptados podem excretar esses organismos por meses ou anos (Adler *et al.*, 2011). Nos animais, a *Leptospira* pode ser encontrada em fetos abortados ou natimortos, bem como em fetos normais ou descargas vaginais após o parto, e pode ser isolada nos órgãos reprodutores masculino e feminino de algumas espécies, podendo persistir por longos períodos (Corney, 1993; Broux *et al.*, 2012; Chatfield *et al.*, 2013).

Pelo fato de não se multiplicar fora do hospedeiro, a *Leptospira* spp. precisa de alta umidade no ambiente para sobreviver e é desnaturada por desidratação, ou quando submetidas a temperaturas superiores a 50°C. Porém, podem permanecer viáveis no ambiente por vários meses sob condições ideais, por exemplo, em rios lentos ou água parada, como lagos e poças ou no solo contaminado (Acha & Szyfres, 2003; Adler *et al.*, 2011).

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas no mundo, sendo de preocupação médica e veterinária, pela questão de saúde pública. A doença é subnotificada por vários motivos, incluindo dificuldade em distinguir sinais clínicos de outras doenças endêmicas e falta de serviços laboratoriais de diagnóstico adequado (WHO, 2020). Caribe, América Central e América do Sul, assim como o Sudeste Asiático e a Oceania, se mostram sendo altamente endêmicos para a doença (Pappas *et al.*, 2008). A alta incidência de leptospirose está principalmente associada com comunidades pobres que não possuem instalações sanitárias adequadas e regiões propensas a inundações (Reis *et al.*, 2008).

2.4. Diagnóstico

A leptospirose pode ser diagnosticada através da detecção do organismo, de seus antígenos ou de ácidos nucleicos em amostras clínicas como sangue (infecções agudas), urina, leite, fígado, rim e outras amostras de tecidos coletadas na necropsia ou por biopsia. Cabe

salientar que a eliminação de organismos pela urina pode ocorrer de forma contínua ou intermitente (Levett, 2001).

Em uma rotina de suspeita clínica de leptospirose, com o objetivo de ajudar na diferenciação de outras doenças e avaliação da gravidade do caso os seguintes exames laboratoriais deverão ser feitos hemograma e análises bioquímicas, que incluem dosagem de ureia, creatinina, bilirrubina total e frações, Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Gama Glutamiltransferase (GGT), Fosfatase Alcalina (FA) e Creatinofosfoquinase (CPK), Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺). Geralmente nas fases iniciais da doença, as alterações laboratoriais podem ser inespecíficas, porém o leucograma pode ser útil, principalmente após o terceiro dia de início dos sintomas, em diferenciar leptospirose de infecções virais agudas quando a leucometria se apresentar normal ou aumentada (Brasil, 2014).

A microscopia de campo escuro também pode ser usada para visualizar *Leptospira* spp., no entanto, essa técnica é inespecífica e não muito sensível (Acha & Szyfres, 2003).

Os métodos sorológicos são considerados padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose. Os mais utilizados na rotina são os testes: ELISA-IgM e a soroaglutinação microscópica (SAM). Os seguintes exames também podem ser solicitados imuno-histoquímica, técnicas baseadas em PCR e tipagem de isolados clínicos, porém, são de maior complexidade e, por isso, menos utilizados (Brasil, 2014; Koizumi *et al.*, 2013)

2.5. Leptospirose em animais sinantrópicos e silvestres

Há relativamente poucos relatos de leptospirose clínica entre animais silvestres, mas nos relatos existentes, os sinais de leptospirose observados são semelhantes aos apresentados por animais domésticos, havendo registros de baixo índice de fertilidade, nascimento de crias fracas, abortos e transtornos oculares, tudo de acordo com a espécie atingida, o sorotipo e o sorovar de *Leptospira* spp. envolvido (Faine, 1982). Mas muitos animais silvestres, entre eles os roedores, estão perfeitamente adaptados à *Leptospira* spp. e não manifestam sinais clínicos ou lesões (Acha & Szyfres, 1986).

A fauna silvestre e sinantrópica é de extrema importância, pois são considerados reservatórios assim como animais domésticos, sendo todos essenciais para a persistência dos focos de infecção. Os seres humanos são hospedeiros acidentais terminais dentro da cadeia de transmissão (Brasil, 2005). Para os humanos e alguns animais domésticos, os ratos domésticos (*Mus musculus*), desempenham o papel de principal reservatório da doença, pois são portadores

sadios, mantendo a *Leptospira* spp. nos rins, eliminando-as vivas pela urina no meio ambiente e contaminando, assim, água, solo e alimentos (Brasil, 1995).

Surtos de leptospirose foram atualmente associados ao turismo e atividades recreacionais em ambiente silvestre (Bharti *et al.*, 2003). Desta forma, verifica-se a importância de estudos relacionados ao papel de espécies de animais silvestres como reservatórios, tanto no ambiente silvestre como em cativeiro (Lenharo *et al.*, 2012). participação de animais silvestres como reservatórios ou portadores de zoonoses na natureza e em cativeiro é de grande importância (Acha & Szyfres, 2003). Com a proximidade dos animais silvestres ao ambiente doméstico, devido às mudanças climáticas, queimadas e desmatamentos, o risco de infecção torna-se cada vez maior, contribuindo para a disseminação da enfermidade. Vale lembrar, que estes animais, em sua maioria, não apresentam sinais clínicos, mesmo estando infectados com agentes etiológicos (Lenharo *et al.*, 2012).

Embora alguns trabalhos de pesquisa sobre a leptospirose em animais silvestres tenham sido realizados nas Américas, no Brasil a enfermidade ainda é pouco estudada nas espécies nativas 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 (Girio *et al.*, 2003).

2.6. Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

A capivara é considerada o maior roedor existente, pertence à família Caviidae e subfamília Hydrochoerinae, esta subfamília foi considerada por muito tempo, uma família separada (Hydrochoeridae), mas estudos genéticos consideraram que as capivaras deveriam ser incluídas na família Caviidae, tornando Hydrochoeridae uma subfamília. Está incluída no mesmo grupo de roedores como pacas, cutias, preás e porquinho-da-índia. Estão associadas a habitats úmidos, como rios, lagos e pântanos da América do Sul ao leste dos Andes (Woods & Kilpatrick, 2005) (Figura 1).



Figura 1. Capivaras ao redor de um lago localizado no local de colheita do grupo C. (Fonte: Arquivo Pessoal).

É um animal extremamente adaptável e pode ser encontrado em diversos ambientes alterados pelo homem. Pode alcançar altas densidades nessas locais caso falte predadores e se a capacidade de suporte do ambiente ajudar, sendo considerada uma praga em algumas ocasiões (Ferraz *et al.*, 2007). Frequentemente, pode ser encontrado em grandes populações em áreas urbanas, parques e até mesmo, áreas residenciais (Moreira *et al.*, 2013).

Seu grande porte chama bastante atenção, pesando, entre 45 e 60 kg, sendo assim, o maior roedor do mundo (Moreira *et al.*, 2013). As fêmeas tendem a ser maiores que os machos (Mones & Ojasti, 1986). Possui até 120 cm de comprimento e 60 cm na altura da cernelha, corpo robusto coberto por uma pelagem castanha avermelhada bem densa (Moreira *et al.*, 2013). A capivara não possui aparente dimorfismo sexual e é difícil diferenciar a genitália entre macho e fêmea visualmente, mas é possível distinguir os machos devido à presença da glândula nasal homóloga à glândula pigmentária de muitos roedores (Paula & Walker, 2013).

A capivara é um animal herbívoro, que se alimenta principalmente de gramíneas. É predada principalmente por grandes felídeos como a onça-pintada (*Panthera onca*) e a onça-parda (*Puma concolor*), e jacarés. Os filhotes por serem menores, podem ser predados por felídeos de porte menor, como a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), cachorro-domato (*Cerdocyon thous*), cobras, como a sucuri (*Eunectes murinus*) e a jibóia (*Boa constrictor*), e até por aves de rapina maiores como o carcará (*Polyborus plancus*) e o urubu (*Coragyps atratus*). Além desses predadores no ambiente natural, a capivara pode ser caçada também por cães e o homem em ambientes periurbanos e urbanos (Moreira *et al.*, 2013).

São animais sociais, vivendo em bandos que em média têm de dez a 30 animais (Macdonald *et al.*, 2007). Alguns estudos apontam grupos com até 100 indivíduos (Herrera, 2013). Estes grupos são constituídos por machos e fêmeas, sendo que os machos formam uma rígida hierarquia, com um único dominante (Macdonald *et al.*, 2007).

Capivaras podem ser ativas durante todo o dia, se não sofrerem algum tipo de perturbação por conta da caça. Entretanto, durante o dia, permanecem dentro da água na maior parte do tempo (Mones & Ojasti, 1986). Apesar da caça e da predação, as capivaras não são consideradas uma espécie ameaçada pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN). Elas possuem uma distribuição ampla, ocorrendo em inúmeras unidades de conservação, apresentando populações estáveis (Reid, 2016).

Geralmente as capivaras são mais relacionadas a febre maculosa brasileira (FMB), zoonose de grande destaque global, pois assim como o cavalo, são hospedeiras primárias do carrapato-estrela (*Amblyomma sculptum* e *A. dubitatum*). Os carrapatos podem se alimentar de qualquer hospedeiro acidental, inclusive o ser humano, transmitindo a bactéria intracelular *Rickettsia rickettsii*, causando a doença (Souza *et al.*, 2009).

2.7. Leptospirose em capivaras

Artigos sobre doenças de etiologia viral ou bacteriana na capivara são escassos, geralmente consistindo em relatos da presença de anticorpos contra microrganismos, isso não esclarece de fato a importância da enfermidade para a espécie, ou mesmo da capivara como fonte de infecção para outras espécies e importante componente da cadeia epidemiológica de algumas doenças (Nogueira & Cruz, 2007).

A leptospirose em capivaras foi descrita pela primeira vez na América do Sul por Jelambi (1976), na Venezuela. Foram utilizados soro de 178 animais abatidos para fins comerciais, onde 111 (63,3%) foram positivas através de soroglutinação microscópica para diferentes sorotipos de leptospiros com prevalência de ballum, canicola, hardjo, hebdomadis e wolffi, os animais não apresentavam sinais clínicos da doença durante o período de estudo.

No Brasil, as capivaras também têm sido estudadas como reservatórios de *Leptospiras* e alguns trabalhos foram realizados para a detecção desses agentes (Vasconcellos, 2002). Os sorovares patogênicos bratislava e noguchii têm sido os mais prevalentes, segundo estudos conduzidos por Michna (1970) e Esteves (2005). Em um estudo realizado no Sul do país, a *Leptospira* que foi isolada nos rins de capivaras abatidas em um frigorífico, para consumo da carne, é do sorogrupo *icterohaemorrhagiae* (Silva *et al.*, 2009).

Em 2006, Shimabukuro no estado de São Paulo, analisou o impacto da poluição da água dos rios sobre a saúde das capivaras, e observou a soroprevalência de *Leptospira* spp. em 79 capivaras estudadas, sendo 45 vindas da bacia hidrográfica do Alto Tietê na região metropolitana de São Paulo, e 34 de áreas servidas por cursos d'água não poluídos. Concluiu que a diferença entre os reagentes na bacia do Alto Tietê e o grupo controle (animais vindos de cursos de água não poluídos) pode ter sido causada pela maior exposição dos animais do primeiro grupo à poluição biológica dos cursos d'água na região metropolitana de São Paulo.

Em 2009, Marvulo e colaboradores fizeram um importante avanço ao realizarem um estudo de infecção experimental que teve como objetivo caracterizar a conversão sorológica e as fases de leptospiremia e leptospirúria em capivaras, visando assim verificar se esses animais

desenvolveriam a condição de reservatório de *Leptospira*. Ele infectou por via intravenosa seis capivaras com *L. interrogans* variante sorológica Pomona. Coletou amostras de urina e sangue para os testes diretos (isolamento do agente e PCR) e indiretos (soroaglutinação microscópica). Esse estudo acabou mostrando a suscetibilidade da capivara ao sorovar Pomona. Mas sem desenvolver sinais clínicos da doença e, com isso, concluiu-se que a capivara pode ser considerada um reservatório da leptospirose, e que, dependendo da fase da doença, podem liberar *Leptospira* na urina e podem servir como fonte de infecção para outros animais e humanos.

Chiacchio e colaboradores (2014) realizaram uma avaliação da saúde de capivaras de vida livre na região do parque estadual Alberto Löfgren em São Paulo - SP, utilizando a amostra de 31 capivaras, realizaram o levantamento para diversos patógenos, entre eles a *Leptospira* spp., onde 8 dos 31 animais apresentaram sorologia positiva para *Leptospira* spp., foram encontrados 13 sorovares diferentes nos animais reagentes.

De acordo com os experimentos já realizados, as capivaras estudadas não mostram sinais de doença durante o período de amostragem. Estudos sobre soroprevalência em capivaras selvagens realizado por Silva *et al.* (2009), em várias regiões do Brasil mostraram taxas entre 30% e 60%, e Gonçalves *et al.* (2020), mostrou uma soroprevalência de 93,55% em um grupo de capivaras em um campus universitário de Araras em São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. - **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales** - 2nd ed., Washington, Distrito de Columbia: Organizacion Panamericana de la Salud, 989 p.,1986.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. - **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. Volume 1. Bacterioses and mycoses. 3rd ed. Washington DC: PAHO. Scientific and Technical Publication No. 580. Leptospirosis; p. 157-68. 2003.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. - **Leptospira and leptospirosis**. Veterinary Microbiology, Amsterdam, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.

ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G.L. - **Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics**. Vet Microbiol; 153(1-2):73-81. 2011.

ANDRÉ-FONTAINE, G. - **Canine leptospirosis — do we have a problem?** - Veterinary Microbiology 117/ 19–24. 2006

BHARTI, A.; NALLY, J.; RICARDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. - **Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance**. Lancet Infectious Diseases 3, 757–771. 2003.BRASIL, (1995).

BRASIL, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais, Programa Nacional de Leptospirose - **Manual de Leptospirose/Ministério da Saúde, 2ed.**, - Brasília, DF: Coordenação de Comunicação, Educação e Documentação – COMED/ASPLAN/FNS, 1995. 98 p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. - **Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.BROUX *et al.*, 2012;

BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P.A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D.P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R.L.; ROOD, J.I.; DAVIES, J.K.; ADLER, B. - **Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential** - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 2006.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention - **Outbreak of leptospirosis among white-water rafters** - Costa Rica, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 46: 577–79. 1997.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention - **Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlons - Wisconsin and Illinois, 1998.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 47: 585–88. 1998.

CHATFIELD, J.; MILLESON, M.; STODDARD, R.; BUI, D.M.; GALLOWAY, R. - **Serosurvey of leptospirosis in feral hogs (*Sus scrofa*) in Florida.** *J Zoo Wildl Med.* 2013.

CHIACCHIO, R.G.D.; PRIOSTE, F.E.S.; VANSTREELS, R.E.T.; KNÖBL, T.; KOLBER, M.; MIYASHIRO, S.I.; MATUSHIMA, E.R. - **Health evaluation and survey of zoonotic pathogens in free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*).** *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 496-504. 2014.

CORNEY, B.G.; COLLEY, J.; DJORDJEVIC, S.P.; WHITTINGTON, R.; GRAHAM, G.C. - **Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting.** *J Clin Microbiol.*;31:2927–2932. 1993.

CORREIO BRASILENSE – **Polícia Ambiental resgata capivara perto da Catedral de Brasília** 12/01/2020. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2020/01/12/interna_cidadesdf,820024/policia-ambiental-resgata-capivara-perto-da-catedral-de-brasilia.shtml>. Acessado em: 01/03/2020.

CUETO, G.R. - **Disiases of Capybara.** In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species.* Nova Iorque: Springer. p. 117. 2013.

ESTEVEZ, F.M.; GUERRA, NETO G.; GIRIO, R.J.S.; SILVA VERGARA, M.L.; CARVALHO, A.C.F.B. - **Deteção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG** - Arqs Inst. Biológico, São Paulo. 2005.

FAINE, S. - **Guidelines for Control of Leptospirosis** - Geneva:W.H.O; 1982.

FAINE, S. - ***Leptospira* and leptospirosis** - Baton Raton: CRC Press, 171p. 1993.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P.- ***Leptospira* and leptospirosis.** Medisci, Melbourne. 1999.

FARR, R.W. – **Leptospirosis** - *Clin Infect Dis*; 21: 1–6. 1995.

FARRELLY, H.E.; ADLER, B.; FAINE, S. **Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo.** *Journal of Medical Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 1 fev. 1987.

FERRAZ, K.M.P.; FERRAZ, S.F.; MOREIRA, J.R.; COUTO, H.T.Z.; VERDADE, L.M. - **Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis** - *Journal of Biogeography*. **34**: 223-230. 2007.

FRAGA, T.R.; CARVALHO, E.; ISAAC, L.; BARBOSA, A.S.; **Chapter 107 - *Leptospira* and Leptospirosis**, Editor(s): Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph

Schwartzman, Molecular Medical Microbiology (Second Edition), Academic Press, 2015, Pages 1973-1990.

GIRIO, R.J.S.; PEREIRA, F.L.G.; MARCHIORI FILHO, M.; MATHIAS, L.A.; HERREIRA, R.C.P.; ALESSI, A.C.; GIRIO, T.M.S. - **Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente** - *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, jan-fev, 2003.

GLOBO (G1) – **Capivara é resgatada em área residencial na Asa Norte, em Brasília**, 02/01/2020. Disponível em: <<https://g1.globo.com/df/distrito-federal/noticia/2020/01/02/capivara-e-resgatada-em-area-residencial-na-asa-norte-em-brasilia-veja-video.ghtml>>. Acessado em: 01/03/2020.

GLOBO (DF1) – **As capivaras ocupam cada vez mais a orla do Lago Paranoá**, 23/07/2018. Disponível em:< <https://globoplay.globo.com/v/6890822/>>. Acessado em: 01/03/2020.

GOMES, M.J.P - **Gênero *Leptospira* spp FAVET – UFRGS**, 2015. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/393176/mod_folder/content/0/G%C3%AAnero%20Leptospira%20%202015.pdf?forcedownload=1>. Acessado em 24/01/2020

GONÇALVES, D.D.; LOPES, K.F.C.; CHIDEROLLI, R.T.; SAMPIERI, B.R.; *et al.* - **Leptospirosis in free-living capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from a university campus in the city of Araras in São Paulo, Brazil**. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 41, n. 1, p. 159-166, jan./fev. 2020.

GROOMS, D. - **Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis** - *Theriogenology* 66/ 624–628. 2006.

HERRERA, E.A. - **Capybara Social Behavior and Use of Space: Pattern and Processes**. In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. Nova Iorque: Springer. pp. 195–207. 2013.

JELAMBI, F. - **Leptospirosis en Chigüires**. CENIAP/FONAIAP, Maracay, 1976.

JOST, B.H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. - **A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis**. *Journal of Medical Microbiology*, v. 22, n. 3, p. 269–275, 1 nov. 1986.

KOIZUMI, N.; MUTO, M.M.; AKACHI, S.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S.; HORIKAWA, K.; HARADA, S.; FUNATSUMARU, S.; OHNISHI, M. - **Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan**. *J Med Microbiol.*;62(Pt 4):630-6. 2013.

LENHARO, D.K.; SANTIAGO, M.E.B.; LUCHEIS, S.B. - **Avaliação sorológica para leptospirose em mamíferos silvestres procedentes do parque zoológico municipal de Bauru, SP**. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.79, n.3, p.333-341, jul./set., 2012

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

MACDONALD, D.W.; HERRERA, E.A.; TABER, A.B.; MOREIRA, J.R. - **Social Organization and Resource Use in Capybaras and Maras**. In: Wolff, J.O.; Sherman, P.W. *Rodent Societies: An Ecological & Evolutionary Perspective*. Chicago: The University of Chicago Press. pp. 393–403. 2007.

MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; FERREIRA, P.M.; DE MORAIS, Z.M.; MORENO, A.M.; DOTO, D.S.; PAIXÃO, R.; BACCARO, M.R.; VASCONCELLOS, S.A.; NETO, J.S.F. - **Experimental leptospirosis in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) infected with *Leptospira interrogans* Serovar Pomona**. *J Zoo Wildl Med* 40:726–730, 2009.

METRÓPOLES – **Filhotes de capivaras são resgatados de piscina no DF**, 03/01/2020. Disponível em: <<https://www.metropoles.com/distrito-federal/filhotes-de-capivara-sao-resgatados-de-piscina-no-df-videos>>. Acessado em 28/02/2020.

MICHNA, S.W.; CAMPBELL, R.S.F. - **Leptospirosis in wild animals** - *Journal of Comparative Pathology*. (8):1016. 1970.

MONES, A.; OJASTI, J. - *Hydrochaeris hydrochaeris*. *Mammalian Species*. 264: 1-7. 1986.

MOREIRA, J.R.; ALVAREZ, M.R.; TARIFA, T.; PACHECO, V.; *et al.* - **Taxonomy, Natural History and Distribution of the Capybar**. In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. Nova Iorque: Springer. pp. 3–39. 2013.

NOGUEIRA, M.F.; CRUZ, T.F. - **Doenças da Capivara** - Dados eletrônicos. – Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 74 p. 2007.

OIE - Office International des Epizooties - **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals** - Paris, 2004.

OLIVEIRA, S.V.; ARSKY, M.L.N.S.; CALDAS, E.P. - **Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica** - *Rev. Saúde (Santa Maria)*, Santa Maria, v.39, n.1, p. 920, Jan./Jul.2013.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. - **The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends**. *Int J Infect Dis* 2008.

PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; WEISBURG, W.G.; *et al.* - **Phylogenetic analysis of the spirochetes** - *J Bacteriol* 1991; 173: 6101–09.

PAULA, T.A.R.; WALKER, N.J. - **Reproductive Morphology and Physiology of Male Capybara**. In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. Nova Iorque: Springer. pp. 107–129. 2013.

PICARDEAU, M.; BULACH, D.M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R.L.; ZIDANE, N.; WILSON, P.J.; CRENO, S.; KUCZEK, E.S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J.C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M.J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R.L.; ROOD, J.I.; LAJUS, A.; DAVIES, J.K.; MEDIGUE, C.; ADLER, B. -

Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis - PLoS One 3, / 2008.

R7 NOTÍCIAS – **Capivaras invadem piscina de casa no Lago Sul (DF)**, 02/11/2017. Disponível em: <<https://noticias.r7.com/distrito-federal/df-record/videos/capivaras-invadem-piscina-de-casa-no-lago-sul-df-21022018>>. Acessado em: 28/02/2020.

REID, F. - ***Hydrochoerus hydrochaeris*** - The IUCN Red List of Threatened Species 2016. Disponível em < <http://www.iucnredlist.org/details/10300/0> > Acessado em 02/01/2020.

REIS, R.B.; RIBEIRO, G.S.; FELZEMBURGH, R.D.; SANTANA, F.S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A.X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A.C.; RAVINES, R.R.; TASSINARI, W.S.; CARVALHO, M.S.; REIS, M.G.; KO, A.I. - **Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums**. PLoS Negl Trop Dis;2: e228. 2008.

RODRIGUES, C.M. - **Entre o discurso oficial e a negligência da vigilância da leptospirose no Brasil**. Revista de Medicina e Saúde de Brasília, Artigo Original, 2018.

SHIMABUKURO, J.S. - **Estudo da Soroprevalência de *Leptospira* spp. em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na bacia hidrográfica do Alto Tietê, SP**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 2006.

SILVA, E.F.; SEYFFERT, N.; JOUGLARD, S.D.; ATHANAZIO, D.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; BROD, C.S. - **Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul**. Pesquisa Vet Brasil 29:174–176, 2009.

SILVA, F.J.; CONCEIÇÃO, W.L.F.; FAGLIARI, J.J.; GIRIO, R.J.S.; DIAS, R.A.; BORBA, M.R.; MATHIAS, L.A. - **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, p.303-312, 2012.

SINAN/SVS/MS, 2020 – Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/07/casos-conf-lepto-2007-2019.pdf>> e < <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/07/obito-lepto-2007-2019.pdf>> Acessado em: 01/02/2020.

SOUZA, C.E.; MORAES-FILHOS, J.; OGRZWALSKA, M.; UCHOA, F.C.; HORTA, M.C.; SOUZA, S.S.L.; BORBA, R.; LABRUNA, M. - **Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*** - *Veterinary Parasitology*. 161 (1-2): 116–121 / 2009.

VASCONCELLOS, S.A. - **Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil** - International Leptospirosis Society Barbados, p. 62. 2002.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N.; - **Leptospirosis: an emerging global public health problem**. J Biosci 33:557–569, 2008.

WHO (World Health Organization) - **Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG)** 2020 – Disponível em:

<<https://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/index2.html>> Acessado em 03/02/2020.

WOODS, C.A.; KILPATRICK, C.W. - **Infraorder Hystricognath** - In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. *Mammal Species of the World* 3 ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. pp. 1538–1600. 2005.

CAPITULO 2

ALUNA: THAMIRIS FIGUEIREDO DA SILVA

ORIENTADORA: GIANE REGINA PALUDO

BRASÍLIA – DF

MARÇO/ 2020

RESUMO

OCORRÊNCIA DE *Leptospira* spp. E DE SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NA POPULAÇÃO DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) NO DISTRITO FEDERAL.

Thamiris Figueiredo da Silva¹, Giane Regina Paludo²

¹Medica Veterinária/Mestranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

²Médica Veterinária/Doutora – UnB – Brasília/DF

A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é considerada o maior roedor do mundo, com excelente capacidade de adaptação em ambientes urbanizados e, por ser um animal sinantrópico, atua como transmissora de diferentes doenças. A leptospirose é uma doença contagiosa que atinge animais domésticos, silvestres e humanos, causada pela infecção por algumas espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Estudos sobre leptospirose em capivaras são escassos, e não existem pesquisas sobre essa doença nessa espécie no Distrito Federal e entorno. O objetivo desse estudo foi analisar a presença do DNA do agente e/ou de anticorpos anti-*Leptospira* spp em capivaras do Distrito Federal. Para isso, 56 capivaras de vida livre foram capturadas e o sangue coletado. As colheitas foram realizadas em dois locais distintos do Distrito Federal. As amostras foram utilizadas para a realização das análises hematológicas, bioquímicas, para detecção do DNA da *Leptospira* spp. pela reação da polimerase em cadeia (PCR) e para a realização da soroadglutinação microscópica (SAM). O ponto de corte utilizado no SAM foi 1:100. Nenhum animal apresentou amplificação na PCR para *Leptospira* spp., mas 41,1% (23/56) dos animais apresentaram anticorpos anti-*Leptospira* spp. no SAM. Os sorovares presentes foram *hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni* e *grippityphosa*. Nos exames laboratoriais foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas análises bioquímicas de creatinina, albumina e globulina, que poderiam indicar comprometimentos renais e hepáticos nos animais reagentes. Alterações no leucograma dos três animais com as maiores titulações (1:800 e 1:1600), podem denotar processos inflamatórios decorrentes de fases agudas da infecção pela *Leptospira* spp. A PCR utilizando amostras de sangue total para avaliação da infecção por *Leptospira* spp das capivaras de vida livre não se mostrou uma boa ferramenta. Mais estudos são necessários para a comprovação das alterações na hematologia e na bioquímica sérica. A presença de animais reagentes na sorologia mostra que a bactéria está circulante no ambiente urbano do Distrito Federal.

Palavras-Chaves: Roedores silvestres; Leptospirose; Sorologia; PCR; SAM; Diagnóstico.

ABSTRACT

OCURRENCE OF *Leptospira* spp. AND ITS LABORATORY ALTERATIONS IN THE CAPYBARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*) POPULATION IN DISTRITO FEDERAL.

The capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) is considered the largest rodent in the world, with excellent adaptability in urbanized environments, and being a synanthropic animal, they can serve as a transmitter of different diseases. Leptospirosis is a contagious disease that affects domestic, wild and human animals, and it is caused by infection by some pathogenic species of the genus *Leptospira*. Studies on leptospirosis in capybaras are scarce, and there are no research on this disease in this species in the Federal District and its surroundings. The aim of this study was to analyze the presence of the agent's DNA and/or anti-*Leptospira* spp antibodies in capybaras in the Federal District. For this, 56 free-living capybaras were captured and the blood collected. The samples were taken in two different locations in the Federal District. The samples were used to carry out hematological and biochemical analyzes, whole blood was used to detect the DNA of *Leptospira* spp. by polymerase chain reaction (PCR) and the serum was used for microscopic agglutination test (MAT). No animals showed amplification in the PCR test for *Leptospira* spp., however 41.1% (23/56) of the animals showed anti-*Leptospira* spp. in MAT, the cutoff point used was 100. The serovars present were hardjo, icterohaemorrhagiae, copenhageni and grippotyphosa. In general, the animals showed a significant difference ($p < 0.05$) in the biochemical analyzes of creatinine, albumin and globulin, this could represent that the reactive animals would have their renal and hepatic systems affected. When comparing the 3 animals with the highest titers (1: 800 and 1: 1600) with the non-reactive animals, changes in the leukogram were observed, and the inflammatory process caused by the leptospire in the acute phase of the disease could justify these changes. The PCR test for health evaluation of free-living capybaras was not a good tool when using only whole blood samples. Further studies are needed to prove changes in hematology and serum biochemistry. The presence of reactive animals in serology shows that the bacterium is circulating in the urban environment of the Federal District.

Key words: Wild rodents; Leptospirosis; PCR; Serology; MAT; Diagnose.

INTRODUÇÃO

O gênero *Leptospira* pertence à família Leptospiraceae da ordem *Spirochaetales*, ou seja, são espiroquetas, um grupo primitivo de bactérias (Paster *et al.*, 1991). Atualmente, todas as 24 espécies conhecidas do gênero *Leptospira* são classificadas e distribuídas em mais de 320 sorovares, tendo como base a expressão do lipopolissacarídeo (LPS) exposto na superfície bacteriana. As diferenças estruturais na porção de carboidrato do LPS determinam a diversidade antigênica entre os numerosos grupos de sorovares (Gomes, 2015). E com essa base, podem ser divididas em dois grandes grupos: patogênicas e saprófitas (Oliveira *et al.*, 2013), com atualmente 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans* (*sensu stricto*), *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, com mais de 260 sorovares. E as espécies saprófitas incluem *L. biflexa* (*sensu stricto*), *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, com mais de 60 sorovares (Adler & Moctezuma, 2010).

A leptospirose é reconhecida como um importante problema emergente de saúde pública global devido à crescente incidência, tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos países desenvolvidos (Vijayachari *et al.*, 2008). Ocorre principalmente em locais de clima tropical, por propiciar condições favoráveis à transmissão da doença. Contudo, nos países desenvolvidos, a leptospirose continua sendo uma doença rara, e quando encontrada, tem sido cada vez mais associada a atividades recreativas (Farr, 1995; CDC, 1997; CDC, 1998). Embora a leptospirose não tenha o potencial de ser usada como arma, seus sinais clínicos podem imitar as febres hemorrágicas virais, merecendo atenção. Os ratos são o reservatório universal dessa zoonose, mas quase todas as espécies conhecidas de mamíferos podem transportar e excretar *Leptospira* (Cueto, 2013).

A capivara é considerada o maior roedor existente, pertencente à família Caviidae e à subfamília Hydrochoerinae (Woods & Kilpatrick, 2005). É um animal extremamente adaptável e pode ser encontrada em diversos ambientes alterados pelo homem. Pode alcançar altas densidades nesses locais caso falte predadores, se a capacidade de suporte do ambiente ajudar, sendo considerada uma praga em algumas ocasiões (Ferraz *et al.*, 2007). Frequentemente, pode ser encontrada em grandes populações em áreas urbanas, parques e até mesmo, áreas residenciais (Moreira *et al.*, 2013).

No Brasil, as capivaras também têm sido estudadas como reservatórios de *Leptospiras* e alguns trabalhos foram realizados para a detecção desses agentes (Vasconcellos, 2002). De acordo com os experimentos já realizados, as capivaras não mostram sinais de doença durante

o período de amostragem. Estudos sobre soroprevalência em capivaras selvagens em várias regiões do Brasil mostraram taxas entre 30% e 94% (Silva *et al.* 2009; Gonçalves *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2012).

A leptospirose é uma doença infecciosa de grande importância, pois é uma zoonose de distribuição global cujo diagnóstico ainda é negligenciado (Rodrigues, 2018), e por outro lado, há o aumento na população de capivaras nos grandes centros, observado através dos meios de comunicação do distrito Federal onde são encontradas cada vez mais notícias (Globo, 2018; Globo 2020; R7, 2017; Metrôpoles, 2020; Correio Brasiliense, 2020), mostrando famílias de capivaras em contato íntimo com casas e clubes privados próximos ao Lago Paranoá, e no Jardim Zoológico. Por isso é de extrema importância avaliar a presença do agente causador desta doença nas capivaras no Distrito Federal bem como as espécies infectantes e as principais alterações laboratoriais ocasionadas pela infecção.

O presente trabalho visou determinar a ocorrência e identificar dos sorovares de *Leptospira* patogênicas que acometem as capivaras no Distrito Federal, verificar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas ocasionadas pela *Leptospira* spp. e comparar os resultados da PCR e da Sorologia.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Comitê de ética

Este projeto foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o protocolo N° 43798-1 e pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB) sob o protocolo N° 20/2019.

2.2. Área de estudo e amostragem

Foram capturadas 56 capivaras de vida livre em dois locais de recreação do Distrito Federal: Área 1 - 41 animais oriundos de uma área de Brasília (Latitude: 15°50'40.78"S Longitude: 47°56'36.21"O) composta por três pequenos lagos próximos; e Área 2 - 15 animais oriundos de uma área central do Lago Paranoá (Latitude: 15°47'33.05"S, Longitude: 47°49'22.22"O) (Figuras 2A e 2B).



Figura 2. A. Imagem da área de colheitas das amostras dos grupo A (Latitude: $15^{\circ}50'48.34''S$, Longitude: $47^{\circ}56'27.34''O$), B (Latitude: $15^{\circ}50'59.29''S$, Longitude: $47^{\circ}55'57.70''O$) e C (Latitude: $15^{\circ}51'3.28''S$, Longitude: $47^{\circ}56'18.18''O$) **B.** Imagem da área de colheita das amostras no Lago Paranoá próximo ao Palácio da Alvorada, grupo D (Latitude: $15^{\circ}47'45.85''S$, Longitude: $47^{\circ}49'33.43''O$).

2.3. Captura dos animais

Os animais foram capturados com a utilização de bretes de contenção e cevas constituídas de frutas, legumes e vegetais. Após a captura, os indivíduos foram sedados por via intramuscular, com utilização de zarabatana (Figura 3B) e dardo anestésico contendo uma

associação de cetamina 1% (5,0 mg/kg) e xilazina 2% (4,0 mg/kg) (Figura 3A). Uma vez anestesiados foi realizada colheita de sangue e marcação. Os animais só foram liberados após completa recuperados da sedação.

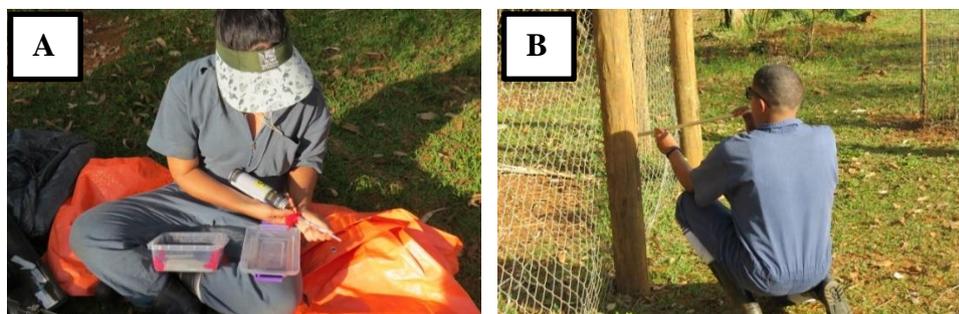


Figura 3. **A.** Preparação do dardo anestésico com as medicações e o gás butano. **B.** Utilização da zarabatana para a aplicação dos dardos anestésicos nos animais contidos no brete (Fonte: Arquivo Pessoal)

2.4. Colheita de amostra

A colheita de sangue foi realizada por meio de venopunção da veia femoral ou safena (Figura 4), em tubos de 4 ml contendo anticoagulante (EDTA) e em tubos secos de 8 ml para a obtenção de soro.



Figura 4. Colheita de sangue da veia femoral de uma capivara, utilizando scalp 24 e seringa de 10 ml (Fonte: Arquivo Pessoal).

2.5. Análises Hematológicas

O material foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília para a análise hematológica e posteriores análises diagnósticas. Com o sangue presente no tubo com EDTA foi realizada a determinação manual do número de eritrócitos ($/\mu\text{L}$) e leucócitos totais ($/\mu\text{L}$) com a utilização do hemocitômetro (câmara de Neubauer). Para contagem de eritrócitos foi preparada uma diluição de $10\mu\text{L}$ de sangue total em $2.000\mu\text{L}$ de líquido de Hayem (IMBRALAD[®]), diluição 1:200, com auxílio de pipetas automáticas e, uma vez preenchida a câmara, foram contados os eritrócitos contidos nos cinco

quadrantes secundários do quadrante central e multiplicados por 10.000 (fator de correção). Para determinação do número de leucócitos totais, o sangue total foi diluído com o líquido de Turk (NewProv[®]) na diluição de 1:20, e contados nos quadrantes das extremidades da câmara sendo posteriormente multiplicados por 50 (fator de correção). Em ambas as contagens, após o preenchimento da câmara, foi respeitado o tempo de 5 minutos para completa sedimentação das células.

O volume globular (%) foi determinado através da centrifugação de um capilar preenchido com sangue total a 10.000 rpm durante cinco minutos, e posterior leitura em tabela específica. Já a concentração de hemoglobina (g/dL) foi realizada utilizando uma diluição de 10 μ L de sangue total em 2500 μ L de líquido de Drabkin. Após o preparo dessa solução foram aguardados 5 minutos para a completa lise dos eritrócitos, e posterior leitura em um analisador bioquímico semiautomático (Bioplus 2000) utilizando comprimento de onda de 540nm, acertando o zero com Drabkin.

As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Uma vez obtidos os valores das análises sanguíneas, foram obtidos os índices hematimétricos através de cálculo padrão. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos e corados com Panótico NewProv[®] rápido para realização da contagem diferencial de leucócitos.

A contagem de plaquetas foi realizada através de visualização em lâmina, onde foram contadas as plaquetas presentes em dez campos. E utilizando o fator de correção $x/10 \times y$, onde x foi o número de plaquetas encontradas nos dez campos e y o fator de correção 20000. Após realizar todos esses procedimentos, o sangue total foi guardado para posterior extração de DNA para as análises moleculares.

As amostras colhidas em tubos secos foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 min para a obtenção do soro, o qual foi transferido para tubos de 1,5 ml para realização da determinação sérica da atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), e a quantificação de ureia, creatinina, proteínas totais, albumina utilizando o analisador automático Cobas C-111 (Roche Diagnostics), e o cálculo de globulina através da subtração da albumina das proteínas totais.

2.6. Análise Molecular (PCR)

Foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB) os exames de reação da polimerase em cadeia (PCR).

2.6.1. Extração de DNA

A extração de DNA com 200µL de sangue contendo EDTA, utilizando o Kit Illustra Blood Genomicprep (GE Health Care®) de acordo com as orientações do fabricante. As amostras de DNA posteriormente a extração foram armazenadas a -20° C até o momento da realização da PCR

2.6.2. Protocolos de amplificação

2.6.2.1. GAPDH

O GAPDH (Gliceraldeido 3-Fostato desidrogenase) é utilizado para confirmar o sucesso na extração de DNA, e tem como gene alvo o mRNA, gene comum as espécies de mamíferos. A sequência de oligonucleotídeos utilizados para esse processo são GAPDH-F (5' CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 3' e GAPDH-R 5' CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 3') segundo Birkenheuer e colaboradores (2003). A mistura da PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 10ng de DNA, 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

2.6.2.2. *Leptospira* spp.

Para detectar a *Leptospira* spp. os oligonucleotídeos utilizados foram LIPL3245Fw (5'- AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e LIPL32286Rv (5'- GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') dirigidos ao gene LipL32, apresentando a amplificação de 242pb segundo Cordeiro e colaboradores (2017). A reação de PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 1 µL da amostra (DNA) a 10ng/µL, 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen® Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo a 10pmol e 1,0 U de Taq DNA (Recombinant® Taq DNA Polymerase, Invitrogen), para um volume final de 25µL. O protocolo de amplificação foi composto de etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 5

minutos. Foi utilizado o termociclador BioRad C100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc. Berkeley, EUA).

2.6.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen™) a 2%. Depois de realizada a eletroforese, os géis foram corados no brometo de etídeo (Vetec Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) 0,3 µg/mL por aproximadamente 30 minutos. Os resultados foram visualizados através de fotodocumentador de luz ultravioleta (UVP®), sendo consideradas positivas amostras que apresentassem produtos cujos tamanhos eram correspondentes a aproximadamente 242 pb (Figura 5) comparados com marcador de peso molecular 100pb (EasyGen®). Todas as amostras testadas foram testadas em duplicata. Como controle negativo foi utilizado água (H₂O miliQ) e como controle positivo foi utilizada a vacina Guard-Vac LCI/GP (Zoetis Inc.®).

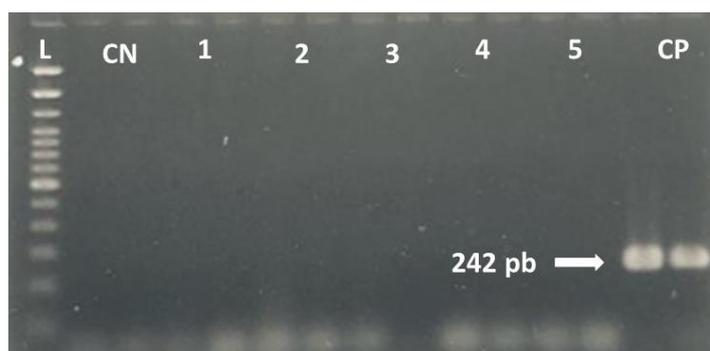


Figura 5. Eletroforese em Gel de Agarose 2% corado com Brometo de Etídeo mostrando os resultados de diferentes PCR para Família *Leptospira* spp. L: Marcador de peso Molecular; Todas as amostras estavam em duplicata. CN: Controle negativo; CP: controle positivo; 1, 2, 3, 4, 5: negativos. (Fonte: Arquivo Pessoal)

2.7. Diagnóstico Sorológico

O teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi realizado no Laboratório de Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução animal – FCAV/UNESP Jaboticabal/SP.

Para o diagnóstico, utilizou-se a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) (Galton *et al.*, 1965; Cole *et al.*, 1973), método de referência para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. que se baseia na adição de soro, em diluições crescentes, a culturas de diversas sorovariedades de *Leptospira* spp.

O diagnóstico foi realizado utilizando uma coleção de antígenos vivos que inclui 24 variantes sorológicas (sv) de leptospiros patogênicas (australis, bratislava, autumnalis, butembo, castellonis, batavie, canicola, whitcombi, cynopteri, grippotyphosa, hebdomadis, copenhageni, icterohaemorrhagiae, javanica, panamá, pomona, pyrogenes, hardjo, wolffi, shermani, tarassovi, sentot) e duas de leptospiros saprófitas (andamana e patoc). A triagem foi efetuada na diluição final 1:100; quando houve aglutinação, os soros foram titulados em uma série geométrica de diluições de razão dois. O título foi dado como a recíproca da maior diluição em que houve aglutinação (Santa Rosa, 1970).

O soro foi diluído em 1:50 (20 μ L de soro + 980 μ L de solução fisiológica), posteriormente distribuiu-se 25 μ L da diluição do soro 1:50 em placas com 96 poços, acrescentado 25 μ L da solução antigênica correspondente (diluição final 1:100). Depois foi misturado levemente e deixado em repouso na estufa 28°C por +/- 40 minutos, após isso foi examinado no microscópio de condensador de campo escuro a seco, objetiva 10x e ocular 10 a 16x.

Foram considerados reagentes os soros que apresentaram presença de 50% ou mais de aglutinação, a partir da diluição de 1:100 segundo métodos propostos por Myers (1985) e Silva e colaboradores (2012).

2.8. Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste t de student para amostras não pareadas foi conduzido para comparar as médias das variáveis quantitativas entre os animais reagentes e não reagentes dos parâmetros com distribuição normal, e o teste de Mann-Whitney para os parâmetros com distribuição não normal. Essas variáveis foram apresentadas na forma de média e desvio-padrão. Todas as análises estatísticas acima descritas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA) para Windows e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

3. RESULTADOS

Na Tabela 11 estão apresentadas as distribuições das capivaras capturadas de acordo com a área, sexo e idade.

Tabela 1. Quantidade total de animais amostrados divididos entre idade e sexo por região.

		Machos	Fêmea	TOTAL	%
Área 1	Filhote	02	07	09	73,2
	Adulto	12	20	32	
Área 2	Filhote	00	00	00	26,8
	Adulto	00	15	15	
TOTAL		14	42	56	100

Nenhum animal apresentou amplificação na PCR para *Leptospira* spp. A tabela 2 apresenta o resultado da sorologia, onde 41,1% dos animais foram reagentes e 58,9 % não reagentes.

Tabela 1. Animais reagentes e não reagentes na sorologia e a divisão por grupo de acordo com a origem.

		TOTAL POR LOCAL	TOTAL DE ANIMAIS
Área 1	Reagente	13/41 (31,7%)	13/23 (56,2%)
	Não Reagente	28/41 (68,3%)	28/33 (84,8%)
Área 2	Reagente	10/15 (66,7%)	10/23 (43,5%)
	Não reagente	05/15 (33,3%)	05/33 (15,2%)
TOTAL	Reagente		23/56 (41,1%)
	Não Reagente		33/56 (58,9%)

Alguns animais apresentaram titulações para mais de uma variante sorológica. Dentre as 24 variantes sorológicas avaliadas, os animais só apresentaram titulações para 4 (16,7%) delas. Alguns animais apresentaram titulações para mais de uma variante sorológica (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Variantes sorológicas mais prováveis e títulos detectados nos animais reagentes na Soroaglutinação Microscópica (SAM).

Variante Sorológica

Área	Grupo	Amostra	Idade	Sexo	hardjo	icterohaemorrhagiae	copenhageni	grippotyphosa
1	A	1	Adulto	Macho	-	200	400	-
1	B	2	Adulto	Macho	-	100	-	-
1	B	3	Adulto	Fêmea	-	100	200	-
1	B	4	Adulto	Macho	-	100	200	-
1	C	5	Adulto	Fêmea	-	100	200	-
1	C	6	Adulto	Fêmea	-	200	200	-
1	C	7	Adulto	Fêmea	-	100	100	-
2	D	8	Adulto	Fêmea	-	-	400	-
2	D	9	Adulto	Fêmea	-	100	200	-
2	D	10	Adulto	Fêmea	-	400	1600	-
2	D	11	Adulto	Fêmea	-	100	-	-
2	D	12	Adulto	Fêmea	-	200	200	-
2	D	13	Adulto	Fêmea	-	100	-	-
2	D	14	Adulto	Fêmea	-	200	1600	-
2	D	15	Adulto	Fêmea	-	100	-	-
2	D	16	Adulto	Fêmea	-	-	400	-
2	D	17	Adulto	Fêmea	-	400	800	-
1	A	18	Adulto	Fêmea	-	100	-	-
1	A	18	Adulto	Fêmea	-	200	200	-
1	A	20	Adulto	Fêmea	-	100	-	-
1	A	21	Adulto	Fêmea	-	100	200	-
1	A	22	Adulto	Fêmea	100	-	-	-
1	A	23	Adulto	Macho	-	-	-	100

Tabela 4. Variantes sorológicas encontradas e títulos detectados nos animais reagentes.

Sorovares mais prováveis	Título de Anticorpos					Total	(%)
	100	200	400	800	1600		
hardjo	01	-	-	-	-	01	2,78
icterohaemorrhagiae	12	05	02	-	-	19	52,80
copenhageni	01	08	03	01	02	15	41,67
grippotyphosa	01	-	-	-	-	01	2,78
Total	15	13	05	01	02	36	100

Os resultados dos hemogramas e análises bioquímicas, considerando os animais sororeagentes e os não reagentes, estão apresentados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Valores das médias, desvio padrão (DP) e comparação dos valores hematológicos entre os animais reagentes e não reagentes do grupo total, identificados por meio da sorologia.

Parâmetros Hematológicos	Reagente		Não Reagente		p
	Média	DP	Média	DP	
VG (%)	37,39	2,589	38,73	3,907	0,1576 [■]
Hemácias(x10 ⁶ /µl)	2,819	0,5006	2,978	0,5991	0,3111 [■]
Hemoglobina(g/dl)	12,14	3,398	11,56	2,039	0,4298 [■]
VCM (fl)	133,4	32,14	132,4	30,48	0,9041 [■]
CHCM (%)	32,47	8,757	29,98	4,986	0,1818 [■]
Leucócitos(x10 ³ /µl)	7.291	2.230	7.027	2.291	0,6697 [■]
Monócitos (x10 ³ /µl)	927,2	606,6	791,7	379,0	0,3083 [■]
Linfócitos (x10 ³ /µl)	1.883	813,9	1.816	939,2	0,7868 [■]
Segmentados (x10 ³ /µl)	3.253	1319	3.336	1762	0,8721 [▲]
Eosinófilos (x10 ³ /µl)	1.078	611,4	1.046	596,9	0,8423 [■]
Basófilos (x10 ³ /µl)	3,696	17,72	17,94	46,57	0,1889 [▲]
PPT(g/dl)	6,678	0,4253	6,455	0,6601	0,0802 [▲]
Plaquetas (µl)	202.000	63.900	202.281	55.326	0,9862 [■]

VG: Volume Globular; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PPT: Proteínas Plasmáticas Totais. [■]Teste t não pareado; [▲]Teste Mann-Whitney;

Tabela 6. Valores das médias, desvio padrão (DP) e comparação dos valores bioquímicos entre os animais reagentes e não reagentes do grupo total, identificados por meio da sorologia.

Análises Bioquímicas	Reagente		Não Reagente		p
	Média	DP	Média	DP	
ALT (UI/L)	49,39	25,50	59,24	22,30	0,1311 [■]
AST (UI/L)	42,78	25,30	43,12	21,21	0,4790 [▲]
FA (UI/L)	127,3	109,1	154,5	93,50	0,0325 [▲]
Creatinina (mg/dL)	1,574	0,2220	1,247	0,2501	< 0,0001 [■]
Uréia (mg/dL)	28,26	10,27	34,25	12,08	0,0592 [■]
PT (g/dL)	5,926	0,7448	6,109	0,6925	0,3498 [■]
Albumina (g/dL)	2,422	0,5624	2,967	0,6513	0,0020 [■]
Globulina (g/dL)	3,504	0,6034	3,142	0,6577	0,0409 [■]

ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; FA: Fosfatase Alcalina; PT: Proteínas totais; [■]Teste t não pareado [▲]Teste Mann-Whitney;

Na tabela 7 pode-se avaliar os dados hematológicos obtidos nos animais reagentes, 23 (41,1%), divididos entre os grupos reagentes, 13 (56,5%) animais da Área 1, 10 (43,5%) animais da Área 2 e o total de não reagentes, 33 (58,9%) . E na tabela 8 os dados das análises bioquímicas.

Tabela 07. Valores das médias, desvio padrão (DP) e comparação dos valores hematológicos entre os animais reagentes da Área 1 e reagentes da Área 2, contra o total de não reagentes, identificados por meio da sorologia.

Parâmetros Hematológicos	Reagente Área 1		Reagente Área 2		Total de Não Reagentes	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP

VG (%)	37,92 ^a	2,691	36,70 ^a	2,406	38,73 ^a	3,907
Hemácias(x10⁶/µl)	2,862 ^a	0,4758	2,768 ^a	0,5502	3,073 ^a	0,8031
Hemoglobina(g/dl)	12,75 ^a	3,201	11,35 ^a	3,652	11,56 ^a	2,039
VCM (fl)	130,6 ^a	37,14	137,0 ^a	25,70	132,4 ^a	30,48
CHCM (%)	33,45 ^a	7,347	31,21 ^a	31,21	29,98 ^a	4,986
Leucócitos(x10³/µl)	6.215 ^a	2.049	8.690 ^b	1.646	7.027 ^a	2.291
Monócitos (x10³/µl)	558,2 ^a	432,9	1.228 ^b	404,9	791,7 ^a	379,0
Linfócitos (x10³/µl)	1475 ^a	540,4	2.711 ^b	1.067	1.816 ^a	939,2
Segmentados (x10³/µl)	3.40 ^a	1.583	3.058 ^a	913,3	3.336 ^a	1762
Eosinófilos (x10³/µl)	641,0 ^a	359,6	1.647 ^b	325,1	1.046 ^c	596,9
PPT(g/dl)	6,692 ^a	0,2660	6,660 ^a	0,5892	6,455 ^a	0,6601
Plaquetas (µl)	212.000 ^a	70.475	189.000 ^a	55.017	202.281 ^a	55.326

VG: Volume Globular; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PPT: Proteínas Plasmáticas Totais. Letras diferentes em uma mesma linha, diferiram (p<0,05) pelo teste t.

Tabela 8. Valores das médias, desvio padrão (DP) e comparação dos valores das análises bioquímicas entre os animais reagentes da Área 1 e reagentes da Área 2, contra o total de não reagentes, identificados por meio da sorologia.

Análises Bioquímicas	Reagente Área 1		Reagente Área 2		Total de Não Reagentes	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
ALT (UI/L)	56,77 ^{ab}	28,48	39,80 ^a	18,07	59,24 ^{ab}	22,30
AST (UI/L)	45,08 ^a	32,52	39,80 ^a	11,72	43,12 ^{▲a}	21,21
FA (UI/L)	172,1 ^{ac}	128,6	69,20 ^b	19,13	154,5 ^{▲ac}	93,50
Creatinina (mg/dL)	1,585 ^a	0,2230	1,560 ^a	0,2319	1,667 ^{ab}	0,4323
Uréia (mg/dL)	32,15 ^a	10,39	20,89 ^b	3,333	34,25 ^{▲a}	12,08
PT (g/dL)	6,323 ^a	0,3586	5,410 ^b	0,8130	6,109 ^{▲a}	0,6925
Albumina (g/dL)	2,831 ^a	0,2720	1,890 ^b	0,3446	2,967 ^{▲a}	0,6513
Globulina (g/dL)	3,492 ^a	0,4991	3,520 ^a	0,7465	3,142 ^{▲a}	0,6577

ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; FA: Fosfatase Alcalina; PT: Proteínas totais; Letras diferentes em uma mesma linha, diferiram (p<0,05) pelo ■Teste t não pareado ou ▲Teste Mann-Whitney;

Nas tabelas 9 e 10 estão as comparações entre as amostras com maiores titulações e o grupo não reagente, para análise das possíveis alterações hematológicas e bioquímicas.

Tabela 09. Hemograma das amostras com maiores titulações na SAM (Sorovar copenhagueni) comparado com a média dos animais não reagentes.

Parâmetros Hematológicos	Amostra 10 1:1.600	Amostra 14 1:1.600	Amostra 17 1:800	Total de Não Reagentes	
				Média	DP
VG (%)	36	36	39	38,73	3,907
Hemácias(x10⁶/µl)	3,76	2,7	2,61	3,073	0,8031
Hemoglobina(g/dl)	9,7	15,8	7,3	11,56	2,039
VCM (fl)	95,74	133,33	149,43	132,4	30,48
CHCM (%)	26,94	43,89	18,72	29,98	4,986
Leucócitos(x10³/µl)	11.300	8.500	10.600	7.027	2.291

Monócitos (x10³/μl)	1.582	1.445	1.590	791,7	379,0
Linfócitos (x10³/μl)	4.859	1.785	2.650	1.816	939,2
Segmentados (x10³/μl)	2.599	3.570	4.664	3.336	1762
Eosinófilos (x10³/μl)	2.260	1.615	1.590	1.046	596,9
PPT(g/dl)	6,6	6,2	8,0	6,455	0,6601
Plaquetas (μl)	220.000	138.000	288.000	202.281	55.326

VG: Volume Globular; VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PPT: Proteínas Plasmáticas Totais.

Tabela 10. Análises bioquímicas das amostras com maiores titulações na SAM (Sorovar copenhageni) comparado com a média dos animais não reagentes.

Análises Bioquímicas	Amostra 10 1:1.600	Amostra 14 1:1.600	Amostra 17 1:800	Animais Não Reagentes	
				Média	DP
ALT (UI/L)	52	73	20	59,24	22,30
AST (UI/L)	68	52	36	43,12	21,21
FA (UI/L)	74	49	91	154,5	93,50
Creatinina (mg/dL)	1,7	1,4	1,8	1,667	0,4323
Uréia (mg/dL)	24	19	44	34,25	12,08
PT (g/dL)	5,4	4,6	6,8	6,109	0,6925
Albumina (g/dL)	2,1	2,1	2,5	2,967	0,6513
Globulina (g/dL)	3,3	2,5	4,3	3,142	0,6577

ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; FA: Fosfatase Alcalina; PT: Proteínas totais;

Não foi possível comparar idades (filhotes e adultos) e sexo (machos e fêmeas) pois um dos grupos (reagentes ou não reagentes) não possuía número amostral suficiente para as análises estatísticas. Mas em relação à idade, 100% dos reagentes eram adultos, e em relação ao sexo, 86,96% dos reagentes eram fêmeas e 13,04% machos.

4. DISCUSSÃO

Devido ao processo sinantrópico que tem afetado diversas espécies de animais silvestres, as pesquisas envolvendo-os têm se intensificado com o intuito de descobrir qual a importância de cada espécie no ciclo epidemiológico das doenças, principalmente aquelas zoonóticas. Por causa da sinantropia as capivaras vêm passando por mudanças em seu habitat natural, resultando no encurtamento da distância entre essas espécies animais e seres humanos. Pesquisas foram desenvolvidas com o objetivo de verificar a presença de *Leptospira* spp. através de testes sorológicos e os resultados variaram de acordo com os diferentes locais de estudo (Cueva *et al.*, 2010; Chiacchio *et al.*, 2014).

Alguns roedores, *Mus musculus* e outras espécies *Mus*, servem como reservatórios para uma série de sorovares patogênicos, principalmente copenhageni e icterohaemorrhagiae. Estes reservatórios embora abriguem leptospiras nos rins, geralmente não mostram sintomatologia, tornando-se uma importante fonte de infecção para seres humanos e outros animais (Bharti *et al.*, 2003). Já o sorovar hardjo tem sido evidenciado em rebanhos bovinos de todo mundo com variáveis aspectos de patogenicidade. Em muitos países, tem sido reconhecido como significativa causa de falhas e alterações nos parâmetros reprodutivos de rebanhos bovinos (Faine, *et al.*, 1999). Já o sorovar grippotyphosa está geralmente associado a caprinos e canídeos (Oliveira, *et al.*, 2013). Desta forma, por serem as capivaras roedores também, vem sendo estudadas como reservatórios para a leptospirose (Ito *et al.*, 1998; Marvulo *et al.*, 2002; Pimentel *et al.*, 2009).

No presente estudo, todas as amostras testadas por meio da PCR foram negativas, o que pode ser explicado por provavelmente não termos capturado os animais durante a fase de leptospiremia. Segundo Adler e Moctezuma (2010) as leptospiras circulam na corrente sanguínea, tendo a fase bacterêmica (leptospiremia) com duração de até 7 dias. Depois disso o número de leptospiras no sangue e nos tecidos atinge um nível crítico, causando assim, lesões decorrentes da ação de toxinas leptospirais. Com isso começa o aparecimento de sinais clínicos nos animais não adaptados a essa bactéria.

Mesmo assim, a ferramenta PCR é muito bem vista para utilização no diagnóstico clínico precoce da leptospirose. Em 1994, Kee e colaboradores avaliaram essa ferramenta com amostras de sangue de cobaias experimentalmente infectados com *L. interrogans*, e a PCR foi capaz de detectar o DNA da *Leptospira* dois dias depois da infecção experimental, enquanto na SAM os anticorpos só foram detectados sete dias após a infecção. No entanto, como diversos métodos diagnósticos que apresentam certas limitações, a PCR é incapaz de identificar o sorovar infectante. Para o paciente isso não é significativo, uma vez que o tratamento é o mesmo, independente do sorovar, mas essa identificação é imprescindível no quesito epidemiológico e de saúde pública (Levett, 2004).

Em virtude de ter sido colhido apenas sangue total para a realização da PCR, isso pode ser a causa da não amplificação nas amostras, a colheita de urina foi impossibilitada pela anatomia do sistema urinário do animal e os métodos disponíveis no momento. Em 2006, Shimabukuro considerou a técnica da PCR mais rápida e prática em relação ao exame bacteriológico para detecção do agente em amostras de tecido renal em suínos de abatedouros, isso corrobora com a ideia de que a análise de tecidos com a ferramenta PCR, no caso tecidos renais e/ou hepáticos (locais de predileção do agente), seriam mais eficientes no caso de

doenças em fase crônica, ou em animais que não apresentam sinais clínicos devido às adaptações fisiológicas.

Por mais que a literatura fale que geralmente é necessária a avaliação de amostras seriadas, para verificar o aumento no título de anticorpos entre a primeira e a última amostra, esse processo não foi realizado nesse estudo por se tratar de animais silvestres. A sorologia é frequentemente usada para diagnosticar leptospirose. Deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados dos testes sorológicos, pois infecções subclínicas são comuns além de existirem animais adaptados ou sorovares infectantes menos patogênicos (Chiacchio *et al.*, 2014). Nos resultados encontrados na soroaglutinação microscópica (SAM), 23 (41,1%) animais apresentaram anticorpos anti-*Leptospira* spp., com titulações iguais ou maiores que 1:100. Como até o presente momento não existem estudos com levantamento sorológico para leptospirose em capivaras na região Centro-Oeste do país, os dados foram comparados com o encontrado em outras regiões. Com isso, a porcentagem de animais reagentes do presente estudo (41,1%) está na média de muitos dados já encontrados no Brasil.

Estudos sobre soroprevalência feito por Silva e colaboradores (2009) em capivaras selvagens em várias regiões do Brasil mostraram taxas entre 30% e 60%. Shimabukuro (2006) observou através do SAM as prevalências de 3,6% e 35% ao estudar as capivaras bacia do Alto Tietê e região metropolitana de São Paulo respectivamente, valores abaixo do encontrado no presente estudo. Os resultados da presente estudo e da região metropolitana de São Paulo mostram que os animais que vivem em área urbanizada apresentam maior prevalência do agente, provavelmente causada pela maior exposição dos animais à poluição biológica dos cursos d'água.

Chiacchio e colaboradores (2014) coletaram o sangue de 31 capivaras do Parque Estadual Alberto Löfgren na cidade de São Paulo e detectaram anticorpos anti-*Leptospira* spp. através do SAM em 26% dos animais testados. Silva e colaboradores (2009) observaram 27,3% de animais reagentes dentre as 22 amostras que testaram de capivaras que foram abatidas em um frigorífico no Rio Grande do Sul. Enquanto Gonçalves e colaboradores (2020) em Araras, São Paulo, encontraram 93,55% de animais reagentes no SAM.

Albuquerque e colaboradores (2017) encontraram no Acre, 43,9% de animais reagentes e Langoni e colaboradores (2016) em São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (41,82%) resultados próximos ao encontrado no presente estudo. Em 1998, Ito e colaboradores, fizeram um estudo em capivaras de vida livre no pantanal sul-matogrossense e encontraram uma taxa de 33% se soroprevalência. Desta forma, podemos constatar que os resultados de animais reagentes no Brasil variam bastante (20% a 94%) dependendo da região estudada.

No presente estudo, o maior número de animais soropositivos foram fêmeas (86,96%). Isso pode ser por dois fatores, geralmente as colônias são compostas por muitas fêmeas e poucos machos (Moreira *et al.*, 2013) e as fêmeas enfrentam períodos constantes de baixa imunidade, relacionados ao período de gestação e lactação, e este fato pode estar associado à maior frequência de anticorpos (Uzêda *et al.*, 2005).

Das 24 variantes sorológicas avaliadas, os animais apresentaram titulações para quatro, hardjo, icterohaemorrhagiae, copenhageni e grippotyphosa. Sendo que 13 animais apresentaram titulações para mais de uma variante sorológica (Tabela 3). As variantes icterohaemorrhagiae e copenhageni foram as que se apresentaram em 13 (56,52%) animais reagentes concomitantemente. E a variante copenhageni foi a que apresentou titulações mais elevadas com dois (8,69%) animais apresentando titulações 1:1600 e um (4,35%) animal apresentando 1:800. No Brasil, os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni frequentemente estão relacionados aos casos mais graves em seres humanos (Brasil – Informações Técnicas, 2020). Geralmente amostras únicas com altos títulos aumentam a suspeita de leptospirose, embora não sejam definitivas (Brasil, 2014).

Gonçalves e colaboradores (2020) encontraram as variantes sorológicas grippotyphosa (69.23%), autumnalis (26.92%) e bratislava (3.85%) dentre os 20 sorovares testados, no estudo realizado em Araras, São Paulo e nesse experimento um dos animais apresentou positividade na PCR. Em 2001 no município de Piracicaba, São Paulo, Paula e colaboradores encontraram dois (20%) animais dentre os dez testados com sorovar grippotyphosa. Langoni e colaboradores (2016) encontraram os sorovares icterohaemorrhagiae (56.52%) em 13 amostras, seguido por copenhageni em nove (39.13%) amostras, pomona em quatro amostras (17.39%), djasiman e castellonis em três amostras cada (13.04%), grippotyphosa, hardjo, canicola, e cynopteri em duas amostras cada (8.7 %), e andamana e bratislava em uma amostras cada (4.34%) em estudos realizados nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo em 55 amostras analisadas de capivaras para fim comercial e de vida livre.

Já Chiacchio e colaboradores (2014) encontraram 13 sorovares em 28 amostras das 31 analisadas de um parque estadual em São Paulo. Por isso, a positividade e os títulos expressivos para um isolado do ecossistema local reforçam a recomendação do uso de isolados locais na sorologia, para maior especificidade (WHO, 2003).

Artigos que representem parâmetros hematológicos e bioquímica sérica de capivaras são escassos, e geralmente apresentam pequeno número de amostras, o que pode distorcer os resultados apresentados. Portanto, os dados analisados somente são os de confronto entre os grupos reagentes e não reagentes, e o grupos reagentes da Área 1 e reagentes da Área 2. Quando

compara-se o grupo reagente com o grupo não reagente, obteve-se uma significância estatística ($p < 0,05$) para as análises bioquímicas de creatinina, albumina e globulina. No confronto entre os grupos reagentes da Área 1 e reagentes da Área 2, obteve-se uma significância estatística ($p < 0,05$) nas análises hematológicas de leucócitos, monócitos, linfócitos e eosinófilos, e nas análises bioquímicas de FA, ureia, PT e albumina. Quando comparamos os dados entre os grupos reagentes da Área 1 e da Área 2 isolados e o total de não reagentes, obteve-se significâncias estatísticas ($p < 0,05$) nos eosinófilos, e entre o grupo Lago Paranoá X total de não reagentes a significâncias estatísticas ($p < 0,05$) ocorreu na ALT, FA, creatinina, ureia, PT e albumina.

Esses dados corroboram com as alterações descritas na literatura para mamíferos afetados pela *Leptospira* spp., onde a lesão primária é vasculite, isquemia localizada nos órgãos, resultando em lesão tubular renal, necrose, dano hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite. Hemorragias podem ocorrer em casos graves, assim como icterícia e, frequentemente, trombocitopenia. Geralmente, ocorre granulocitose leve e esplenomegalia (Faine *et al.*, 1999; Adler & Moctezuma, 2010; Fraga *et al.*, 2015), por mais que a presente espécie animal estudada não apresente sinais clínicos da doença. De acordo com os resultados observados, a infecção por *Leptospira* poderia estar ocasionando alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos desses animais, mas como não possuímos confirmação de higidez dos animais, isso não poderia ser confirmado apenas com esses dados.

Analisando os dados das tabelas 9 e 10 foi observado que as amostras com altas titulações em comparação com a média dos animais não reagentes, não apresentaram alterações nos bioquímicos, mas no hemograma foi observado leucocitose (amostras 10 e 17), monocitose (Amostras 10, 14 e 17), linfocitose e eosinofilia (amostra 10), PPT alta (amostra 17), trombocitopenia (amostra 14) e trombocitose (Amostra 17). Esses dados mostram que os animais poderiam estar apresentando algum processo inflamatório, que poderiam ser por diversas causas, já que poderiam não ser hígidos, ou estarem apresentando um processo inflamatório da fase aguda da leptospirose, que geralmente cursa com vasculite. Por mais que a literatura tente apresentar que as capivaras poderiam ser resistentes à infecção, esses dados observados no hemograma corroboram os dados observados em animais e seres humanos em fase aguda da doença, que apresentam como lesão primária vasculites e também trombocitopenias e granulocitoses leves (Faine *et al.*, 1999; Adler & Moctezuma, 2010; Fraga *et al.*, 2015).

Um dado importante é que os animais que apresentaram titulação aos sorovares grippotyphosa e hardjo, eram do grupo A e possuíam contato íntimo com ruminantes, dividiam

comina e andavam na mesma área, isso pode justificar como esses animais se contaminaram, já que esses sorovares são comumente encontrados em ruminantes. De acordo com os resultados apresentados, onde grande parte dos animais apresentaram titulações para sorovares patogênicos (icterohaemorrhagiae - 82,61% e copenhageni - 65,22%) para seres humanos, mostra um sinal de alerta, pois fica comprovado que há, nesses locais, a bactéria circulante no ambiente. A presença dos sorovares reagentes neste estudo sugere o contato prévio de capivaras com animais domésticos e roedores sinantrópicos ou com água e solo contaminados. O fato de uma espécie portadora de *Leptospira* coabitar com outra favorece a disseminação do patógeno.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que um elevado número de capivaras do Distrito Federal apresenta anticorpos anti-*Leptospira* spp. sem apresentar sinais clínicos, o que fortalece a ideia de que esta espécie desempenhe um papel importante na manutenção da doença na natureza.

A utilização da PCR para a avaliação sanitária das capivaras de vida livre no presente estudo não foi uma boa ferramenta pois somente foi utilizado para análise o sangue total, mais estudos são necessários utilizando outros tipos de amostras, como urina e tecidos.

Os animais apresentaram algumas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, mas que não podem ser confirmadas como causadas pela *Leptospiras* spp., pois não existe confirmação de higidez dos animais., mais estudos são necessários para essa comprovação.

A presença de animais reagentes na sorologia mostra que a bactéria está circulante no ambiente urbano do Distrito Federal e merece ser considerado, uma vez que pode comprometer a saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. - **Leptospira and leptospirosis**. Veterinary Microbiology, Amsterdam, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.

ALBUQUERQUE N.F.; MARTINS, G.; MEDEIROS, L.; LILENBAUM, W.; RIBEIRO, V.M.F. - **The role of capybaras as carriers of leptospires in periurban and rural areas in the western Amazon**. Acta Tropica, v. 169, n. 1, p. 57-61, 2017.

BHARTI, A.; NALLY, J.; RICALDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. - **Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance**. Lancet Infectious Diseases 3, 757–771. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais, Programa Nacional de Leptospirose - **Manual de Leptospirose/Ministério da Saúde, 2ed.**, - Brasília, DF: Coordenação de Comunicação, Educação e Documentação – COMED/ASPLAN/FNS, 1995. 98 p.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. - **Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype) and B. canis DNA in Canine Blood Samples**. J Clin Microbiol.; 41(9): 4172-4177. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. - **Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention - **Outbreak of leptospirosis among white-water rafters** - Costa Rica, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 46: 577–79. 1997.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention - **Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in triathlons** - Wisconsin and Illinois, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 47: 585–88. 1998.

CHIACCHIO, R.G.D.; PRIOSTE, F.E.S.; VANSTREELS, R.E.T.; KNÖBL, T.; KOLBER, M.; MIYASHIRO, S.I.; MATUSHIMA, E.R. - **Health evaluation and survey of zoonotic pathogens in free-ranging capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 496-504. 2014.

COLE J.R., SULZER C.R.; PULSSELY P.R. **Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination**. Appl. Microbiol. v. 25, p. 976-980, 1973.

CORDEIRO, C.T.; OLIVEIRA, S.T.; VIEIRA, R.F.C. - **Anticorpos anti-leptospira spp. e leptospirúria em gatos na região metropolitana de Curitiba/PR-Brasil** - Archives of Veterinary Science. v.22, n.3, p.131-138, 2017

CORREIO BRASILENSE – **Polícia Ambiental resgata capivara perto da Catedral de Brasília** 12/01/2020. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2020/01/12/interna_cidadesdf,820024/policia-ambiental-resgata-capivara-perto-da-catedral-de-brasilia.shtml>. Acessado em: 01/03/2020.

CUETO, G.R. - **Disiases of Capybara**. In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species*. Nova Iorque: Springer. p. 117. 2013.

CUEVA, A.; RIVERA, G.; SÁNCHEZ, P.; RAMÍREZ, V. - **Incidence of infection for *Leptospira* spp. in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) reared in captivity in Iquitos**. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 21(1), 106-112. 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P.- **Leptospira and leptospirosis**. Medisci, Melbourne. 1999.

FARR, R.W. – **Leptospirosis** - *Clin Infect Dis*; 21: 1–6. 1995.

FERRAZ, K.M.P.; FERRAZ, S.F.; MOREIRA, J.R.; COUTO, H.T.Z.; VERDADE, L.M. - **Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis** - *Journal of Biogeography*. **34**: 223-230. 2007.

FRAGA, T.R.; CARVALHO, E.; ISAAC, L.; BARBOSA, A.S.; **Chapter 107 - Leptospira and Leptospirosis**, Editor(s): Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman, *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 2015, Pages 1973-1990.

GALTON M.M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C.A.; FIELDS, M.J. - **Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies**. *Appl. Microbiol.* v 13, p. 81-85, 1965.

GLOBO (G1) – **Capivara é resgatada em área residencial na Asa Norte, em Brasília**, 02/01/2020. Disponível em: <<https://g1.globo.com/df/distrito-federal/noticia/2020/01/02/capivara-e-resgatada-em-area-residencial-na-asa-norte-em-brasilia-veja-video.ghtml>>. Acessado em: 01/03/2020.

GLOBO (DF1) – **As capivaras ocupam cada vez mais a orla do Lago Paranoá**, 23/07/2018. Disponível em: <<https://globoplay.globo.com/v/6890822/>>. Acessado em: 01/03/2020.

GOMES, M.J.P - **Gênero *Leptospira* spp FAVET – UFRGS**, 2015. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/393176/mod_folder/content/0/G%C3%AAnero%20Leptospira%20%202015.pdf?forcedownload=1>. Acessado em 24/01/2020

GONÇALVES, D.D.; LOPES, K.F.C.; CHIDEROLLI, R.T.; SAMPIERI, B.R.; *et al.* - **Leptospirosis in free-living capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from a university campus in the city of Araras in São Paulo, Brazil**. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 41, n. 1, p. 159-166, jan./fev. 2020.

ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A.; BERNARDI, F.; NASCIMENTO, A.A.; LABRUNA, M.B.; ARANTES, I.G. - **Evidência sorológica de brucelose e leptospirose e parasitismo por 49 ixodídeos em animais silvestres do pantanal sul-mato-grossense.** *Ars Veterinária*, v. 14, n. 3, p. 302-310, 1998.

KEE, S.H.; KIM, I.S.; CHOI, M.S.; CHANG, W.H. - **Detection of leptospiral DNA by PCR.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.32, n.4, p. 1035-1039, 1994.

LANGONI, H.; KURIBARA, I.Y.; FERREIRA LOPES CORREA, A.P.; ULLMANN, L.S.; SÁNCHEZ, G.P.; LUCHEIS, S.B. - **Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**

LEVETT, P.N. - **Leptospirosis: A forgotten zoonosis?** *Clinical and Applied Immunology Reviews*, Chicago, v.4, n.6, p.435-448, 2004.

MARVULO, M.F.V.; PAULA, C.D.; FERREIRA, P.M.; *et al.* - **Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil.** *Anais..* Bridgetown: International Leptospirosis Society, 2002.

METRÓPOLES – **Filhotes de capivaras são resgatados de piscina no DF**, 03/01/2020. Disponível em: <<https://www.metropoles.com/distrito-federal/filhotes-de-capivara-sao-resgatados-de-piscina-no-df-videos>>. Acessado em 28/02/2020.

MOREIRA, J.R.; ALVAREZ, M.R.; TARIFA, T.; PACHECO, V.; *et al.* - **Taxonomy, Natural History and Distribution of the Capybar.** In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. *Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species.* Nova Iorque: Springer. pp. 3–39. 2013.

MYERS, D. M. - **Manual de Metodos para el diagnostico de la leptospirose.** Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonoses. Nota Tecnica, 30. 1985.

OLIVEIRA, S.V.; ARSKY, M.L.N.S.; CALDAS, E.P. - **Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica** - *Rev. Saúde (Santa Maria)*, Santa Maria, v.39, n.1, p. 920, Jan./Jul.2013.

PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; WEISBURG, W.G.; *et al.* - **Phylogenetic analysis of the spirochetes** - *J Bacteriol* 1991; 173: 6101–09.

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, dez. 2009.

R7 NOTÍCIAS – **Capivaras invadem piscina de casa no Lago Sul (DF)**, 02/11/2017. Disponível em: <<https://noticias.r7.com/distrito-federal/df-record/videos/capivaras-invadem-piscina-de-casa-no-lago-sul-df-21022018>>. Acessado em: 28/02/2020.

RODRIGUES, C.M. - **Entre o discurso oficial e a negligência da vigilância da leptospirose no brasil.** *Revista de Medicina e Saúde de Brasília*, Artigo Original, 2018.

SANTA ROSA, C.A. - **Diagnostico laboratorial das leptospiroses.** Ver. Microbiol., 1: 97-109, 1970.

SHIMABUKURO, J.S. - **Estudo da Soroprevalência de *Leptospira* spp. em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na bacia hidrográfica do Alto Tietê, SP.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 2006.

SILVA, E.F.; SEYFFERT, N.; JOUGLARD, S.D.; ATHANAZIO, D.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; BROD, C.S. - **Soroprevalência da infecção leptospiral em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) abatidas em um frigorífico do Rio Grande do Sul.** Pesquisa Vet Brasil 29:174–176, 2009.

SILVA, F.J.; CONCEIÇÃO, W.L.F.; FAGLIARI, J.J.; GIRIO, R.J.S.; DIAS, R.A.; BORBA, M.R.; MATHIAS, L.A. - **Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.32, p.303-312, 2012.

UZÊDA, S.R.; FERNANDEZ, S.Y.; DE JESUS, E.E.V; PINHEIRO, A.M.; *et al.* - **Fatores relacionados à presença de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do Estado da Bahia.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, América do Norte, 5, ago. 2005.

VASCONCELLOS, S.A. - **Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil** - International Leptospirosis Society Barbados, p. 62. 2002.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N.; - **Leptospirosis: an emerging global public health problem.** J Biosci 33:557–569, 2008.

WHO (World Health Organization) - **Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG) 2020** – Disponível em: <<https://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/index2.html>> Acessado em 03/02/2020.

WOODS, C.A.; KILPATRICK, C.W. - **Infraorder Hystricognath** - In: Wilson, D.E.; Reeder, D.M. *Mammal Species of the World* 3 ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. pp. 1538–1600. 2005.

