RODRIGO SILVA PINTO JORGE

Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região

São Paulo
2008

RODRIGO SILVA PINTO JORGE

Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:
Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Ferreira

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1962
FMVZ

Jorge, Rodrigo Silva Pinto
Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região / Rodrigo Silva Pinto Jorge. – São Paulo: R. S. P. Jorge, 2008.
105 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira.

1. Carnívoros selvagens. 2. Doenças infecciosas. 3. Saúde pública veterinária. 4. Medicina da conservação. 5. Medicina veterinária preventiva. I. Título.

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens capturados na RPPN SESC Pantanal e de cães domésticos das comunidades vizinhas", Protocolo nº370/2003, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/10/03.

(We certify that the Research "Characterization of the sanitary status of wild carnivores captured in the private reserve (RPPN) SESC Pantanal and of domestic dogs of the communities located in the surroundings" protocol number 370/2003, under the responsibility of Prof. Dr. Fernando Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 10/29/2993, meeting.

São Paulo, 31 de outubro de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-000 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fones: (011) 3091-7671/3091-7676 Fax: (011) 3032-2224

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: JORGE, Rodrigo Silva Pinto

Título: Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha esposa, Juliana, que compartilha comigo os momentos difíceis e os alegres, agüenta minha rabugice, é minha companheira, minha amiga, minha cúmplice, enfim, meu amor; aos meus filhos, Rafa, Pedro e Duda, que são a alegria da minha vida; e ao meu Pai, Alberto, que é responsável por eu estar aqui, sempre me apoiou nas minhas decisões, a quem eu amo, admiro e respeito;

e, especialmente,

ao meu filho, Caio, e a minha mãe, Maria Eduarda, que foram tão importantes para mim e se foram repentinamente, deixando um enorme vazio. Apesar de não estarem fisicamente junto de nós, estão, e sempre estarão, presentes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Fernando Ferreira, pela sua orientação, por toda a ajuda no delineamento do estudo, pelas sugestões, pelas opiniões e, especialmente, pela sua amizade.

Ao Serviço Social do Comércio (SESC) por possibilitar a realização deste estudo ao permitir as capturas na RPPN SESC Pantanal, dar todo apoio logístico necessário e ainda financiar parte do estudo, em especial ao seu Presidente, Dr. Antonio de Oliveira Santos, como também ao Dr. Leopoldo Garcia Brandão, Maron Emile Abi-Abib, Nivaldo Pereira, Waldir Valutky, Afonso Ferreira.

Aos guardas-parque e brigadistas da RPPN SESC Pantanal que sempre deram apoio fundamental no campo para que este estudo pudesse ser realizado.

Aos moradores das comunidades de São Pedro de Joselândia, Retiro, Pimenteira e Colônia de Santa Isabel, por permitirem que eu coletasse amostras dos seus cães, sempre nos recebendo de forma acolhedora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Instituto Pasteur de São Paulo que além de auxiliarem na realização da sorologia para raiva, sempre se mostraram dispostos a ajudar em qualquer tema necessário para a realização deste trabalho, especialmente a Dra. Ivanete Kotait, Dra. Neide Takaoka, Dra. Maria Luiza Carrieri, Juliana Castilho, Karin Scheffer, Pedro Carnieli Jr., Luciana Botelho e Rafael Novaes.

À profa. Jane Megid e à residente Susan Allendorf pelo auxílio na realização da sorologia para o parvovírus.

À Biovet, especialmente ao Dr. Antonio Roberto Alves Corrêa, ao José Domingues de Ramos Filho, ao Hugo Scanavini Neto e aos funcionários do Controle de Qualidade, por todo o auxílio na realização da sorologia para cinomose.

Aos funcionários do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS/FMVZ/USP) pela realização da sorologia para leptospirose, especialmente à Zenaide e à Gisele.

À Profa. Caris Maroni Nunes pela realização do diagnóstico para as leishmânias e para os alunos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Odontologia da UNESP, Câmpus Araçatuba, que auxiliaram no diagnóstico.

À Profa. Lucille Winter-Flotter e Ricardo Zampieri pela ajuda na diferenciação das leishmânias no laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP.

Ao meu grande amigo, Laércio Ribeiro Porto Neto, pela ajuda e empenho pra que o diagnóstico para as leishmânias fosse incluído nesta tese.

Ao Prof. Silvio de Arruda Vasconcellos, coordenador da Pós-Graduação no VPS/FMVZ/USP durante a maior parte do meu doutoramento, por toda a sua ajuda fundamental com relação ao funcionamento do curso, das questões relacionadas à bolsa e pelo auxílio no diagnóstico para as leptospiras.

Ao Prof. José Soares Ferreira Neto pelas conversas sempre agradáveis sobre o projeto de doutorado, como também sobre vários outros assuntos, pela ajuda com as leptospiras e pela sua amizade.

Ao Edson Souza Lima por todo o auxílio e ensinamentos no campo. A partir de um primeiro projeto, vários outros foram surgindo, além das idéias que devem ser colocadas em prática no futuro. Além de um importante parceiro nestes projetos, tornou-se um grande amigo.

Ao Ronaldo e à Rose Morato por todo o incentivo e pelas oportunidades para trabalhar com carnívoros selvagens e, especialmente, pela sua amizade.

Ao Julio Dalponte pela oportunidade de participar do projeto envolvendo o estudo de carnívoros selvagens no Pantanal e pelo incentivo pra que eu aproveitasse a participação no projeto para escrever a proposta para estudar a exposição dos animais aos agentes patogênicos, o que acabou deflagrando esta tese.

Aos freqüentadores do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística do VPS/FMVZ/USP pelo convívio, pelas conversas sobre o projeto e pela ajuda na elaboração dos mapas, especialmente ao Prof. Marcos Amaku, Ricardo Dias, à Jucélia, à Patrícia e aos demais pós-graduandos.

Às pessoas que me acompanharam e auxiliaram em algumas viagens de campo ou no laboratório Patrícia, Marina, Danilo, Drauzio, Diana e Monicque.

Aos amigos do CENAP/ICMBIO pelo apoio ao projeto e pela agradável convivência.

Ao Paulo Brandão, Alexandre Sanches e Fábio Gregori pela ajuda nas tentativas de realizar a sorologia para o parvovírus.

Aos amigos da Tríade pelo apoio ao projeto e por compreenderem os momentos em que tive de estar ausente para o desenvolvimento da tese.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos do VPS/FMVZ/USP pela convivência agradável durante todo o doutorado, na realização das disciplinas, nas confraternizações do departamento.

Aos amigos Karina Preising Aptekman e Anderson Pontes por terem gentilmente me hospedado em Botucatu, sempre se esforçando por tornar minha estadia agradável.

RESUMO

JORGE, R. S. P. **Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região.** [Characterization of the health status of wild carnivores of the RPPN SESC Pantanal and of domestic animals of the region]. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Nas últimas décadas, pesquisadores vêm atribuindo crescente importância à ocorrência de agentes patogênicos para a conservação de animais selvagens. Epizootias em carnívoros selvagens na África e América do Norte levaram a declínios significativos nas populações afetadas. Por outro lado, animais selvagens podem agir como reservatórios para agentes que afetam o homem e animais domésticos. O objetivo deste estudo foi pesquisar a exposição de carnívoros selvagens e de animais domésticos da região da RPPN SESC Pantanal a patógenos importantes para a conservação dos carnívoros selvagens e para o homem. Para isto, entre 2002 e 2006, 76 carnívoros selvagens (43 cachorros-do-mato, *Cerdocyon thous*, 13 guaxinins, *Procyon cancrivorous*, oito lobos-guarás, *Chrysocyon brachyurus*, quatro jaguatiricas, *Leopardus pardalis,* sete suçuaranas, *Puma concolor* e um cachorro-vinagre, S*peothos venaticus*) foram capturados e tiveram amostras sangüíneas coletadas. Também foram amostrados 103 cães domésticos em comunidades humanas localizadas ao norte da RPPN e 27 cavalos utilizados no interior da reserva. Para os carnívoros (selvagens e domésticos) foi realizado sorodiagnóstico para o vírus da cinomose (soroneutralização), parvovírus (HI), raiva (SFIMT) e *Leptospira* spp. (MAT), além do diagnóstico direto para *Leishmania* spp., através da PCR. A sorologia para *Leptospira* spp. também foi realizada nos eqüinos. Dentre os carnívoros selvagens, 21 de 75 animais testados apresentaram título ≥ 8 de anticorpos para o vírus da cinomose, 70 de 76 apresentaram título ≥ 80 de anticorpos para o parvovírus, 4 de 76 apresentaram título ≥ 10 UI/ml de anticorpos para o vírus da raiva, 32 de 75 apresentaram título ≥ 100 de anticorpos para *Leptospira* spp. e 7 de 21 foram positivos para *Leishmania* spp. Dentre os cães domésticos, foram diagnosticados 65 positivos à sorologia para o vírus da cinomose dos 79 indivíduos testados, 98 de 102 para o parvovírus, 27 de 102 para o vírus da raiva e 18 de 103 para *Leptospira* spp. Para *Leishmania* spp., 20 de 70 foram positivos. As amostras dos animais positivos para *Leishmania* foram identificadas como pertencentes ao sub-gênero *Viannia,* sendo duas delas identificadas especificamente como *Leishmania (V.) braziliensis.* Vinte de 27 cavalos foram positivos sorologicamente para *Leptospira* spp. Os resultados obtidos indicam que os carnívoros selvagens e cães domésticos

foram expostos aos cinco agentes pesquisados, demonstrando a presença destes na região. Isto indica que os carnívoros selvagens da região podem ser ameaçados pela presença dos patógenos que comumente circulam nas populações de cães domésticos. Também demonstram que agentes zoonóticos circulam nestes animais na região. No entanto, nem a mortalidade de carnívoros selvagens em decorrência de doenças nem o papel dos animais selvagens como reservatórios de agentes zoonóticos puderam ser claramente demonstrados. Apesar disto, é evidente a necessidade de implementação de medidas preventivas visando evitar a transmissão de patógenos aos carnívoros selvagens, como vacinação e controle populacional dos cães domésticos, e de um sistema de vigilância para as leishmanioses, para a raiva e para a leptospirose, aliado a um programa de educação em saúde na comunidade de São Pedro de Joselândia e adjacências.

Palavras chaves: Carnívoros selvagens. Doenças infecciosas. Saúde pública veterinária. Medicina da conservação. Medicina veterinária preventiva.

ABSTRACT

JORGE, R. S. P. **Characterization of the health status of wild carnivores of the RPPN SESC Pantanal and of domestic animals of the region.** [Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região]. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

In the last decades, researchers have been giving growing importance to the occurrence of pathogens for the conservation of wild animals. Epizootics in wild carnivores in Africa and North America have led to declines in the affected populations. On the other hand, wild animals may act as reservoirs to pathogens that affect humans and domestic animals. The purpose of this study was to assess the exposure of wild carnivores and domestic animals from the Northern Pantanal region to pathogens that are important for the conservation of wild carnivores and for men. From 2002 to 2006, 76 wild carnivores (43 crab eating foxes, *Cerdocyon thous*, 13 raccoons, *Procyon cancrivorous*, eight maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*, four ocelots, *Leopardus pardalis,* seven pumas, *Puma concolor,* and one bush dog, S*peothos venaticus*) were captured and blood samples were collected. Additionally, 103 domestic dogs and 27 horses from the same area were also sampled. Serological tests were performed for wild carnivores and domestic dogs for CDV (SN), CPV (HI), rabies virus (SFIMT) and *Leptospira* spp. (MAT), along with PCR for *Leishmania* spp. MAT was also performed for horses. Among wild carnivores, 21 of 75 tested animals had titers ≥ 8 for CDV antibodies, 70 of 76 had titers ≥ 80 for CPV antibodies, 4 of 76 had titers ≥ 10 UI/ml for rabies virus antibodies, 32 of 75 had ≥ 100 for *Leptospira* spp. antibodies, and 7 of 21 were positive for *Leishmania* spp. Among domestic dogs, 65 of 79 animals tested positive for serology for CDV, 98 of 102 for CPV, 27 of 102 for rabies virus and 18 of 103 for *Leptospira* spp. For *Leishmania* spp., 20 of 70 were positive. Positive samples for *Leishmania* spp. were identified as belonging to the sub-genus *Viannia.* Two of these were identified to the species level as *Leishmania (V.) braziliensis.* Twenty of 27 horses were serologically positive for *Leptospira* spp. These results indicate that wild carnivores and domestic dogs were exposed to all five tested pathogens, showing their presence in the region. This indicates that wild carnivores in the region may be threatened by pathogens that commonly circulate among domestic dog populations. It also demonstrates that zoonotic agents circulate among the wild carnivore population in the region. However, neither a greater mortality of wild carnivores due to infectious diseases nor their role as reservoirs of zoonosis have been clearly

demonstrated. Nevertheless, the need to act to prevent the transmission of pathogens to wild carnivores, through vaccination of domestic dogs and population control, is evident. The implementation of a surveillance system for rabies, leishmaniasis and leptospirosis, together with a health education program in the human community, would also be very important.

Key words: Wild carnivores. Infectious diseases. Conservation medicine. Veterinary public health. Preventive veterinary medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da RPPN SESC Pantanal..... 19

Figura 2 – Localização das capturas de carnívoros selvagens e amostragem dos cães domésticos..... 47

Figura 3 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para cinomose..... 49

Figura 4 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para o Parvovírus..... 51

Figura 5 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para raiva..... 53

Figura 6 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos para *Leishmania* spp..... 55

Figura 7 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para *Leptospira interrogans*..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de referência para comparação entre as diluições onde os soros pesquisados neutralizaram 50% da fluorescência e a diluição na qual o soro padrão neutraliza 50% da fluorescência, para o cálculo do título sorológico em UI/mL..... 41

Tabela 2 – Lista das espécies de carnívoros selvagens testadas para a presença de anticorpos contra o vírus da cinomose, variação dos títulos obtidos, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie..... 48

Tabela 3 – Lista das espécies de carnívoros selvagens testadas para a presença de anticorpos contra o Parvovírus Canino, variação dos títulos obtidos, número de indivíduos suspeitos (10≥Título≥40), número de indivíduos positivos (Título≥80), número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie..... 50

Tabela 4 - Lista das espécies de carnívoros selvagens testadas para a presença de anticorpos contra o vírus da raiva, variação dos títulos encontrados, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie..... 52

Tabela 5 - Lista das espécies de carnívoros selvagens testados para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp., variação dos títulos encontrados, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados, porcentagem de animais positivos por espécie e variantes sorológicas mais prováveis..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	microlitro
CDV	*canine distemper vírus* – vírus da cinomose canina
CO_2	dióxido de carbono
CPV	*canine parvovirus* – vírus da parvovirose canina
DNA	*desoxirribonucleic acid* - ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido dietilenoaminotetracético
FPV	*feline parvovirus* – parvovírus felino
G6PD	glicose-6-fosfato dehidrogenase
HI	*hemmaglutination inhibition* – inibição da hemaglutinação
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade
IUCN	*International Union for the Conservation of Nature* – União Internacional para a Conservação da Natureza
kg	quilograma
kDNA	ácido desoxirribonucléico de kinetoplasto
LVA	leishmaniose visceral americana
LTA	leishmaniose tegumentar americana
MAT	*micro agglutination test* – teste de aglutinação microscópica
MEV	*mink enteritis vírus* – vírus da enterite dos visões
MMA	Ministério do Meio Ambiente
mg	miligrama
ml	mililitro
MT	Mato Grosso
pb	pares de base
PBS	*phosphate buffered saline solution*– solução salina fosfatada tamponada
PCR	*polimerase chain reaction* – reação em cadeia pela polimerase
PPA	posto de proteção ambiental
PV	*Pasteur vírus* – vírus Pasteur
RNA	*ribonucleic acid* - ácido ribonucléico
RFFIT	*rapid focal flurescence inhibition test* - inibição fluorescente-focal rápida
RPPN	reserva particular do patrimônio natural
SDS	dodecil sulfato de sódio
SESC	serviço social do comércio
SFIMT	microteste simplificado de inibição de focos fluorescentes
SSC	*standard saline citrate* – salina citrato padrão
SSU rDNA	*small subunit ribosomal DNA* - pequena sub-unidade de DNA ribossômico
$TCID_{50}$	*tissue culture infective dose 50%* - dose infectiva 50%
TE	Tris EDTA
UC	Unidade de Conservação
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso
UHA	unidades hemaglutinantes
UI	unidades internacionais
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultra violeta

LISTAS DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
=	igual
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
ºC	graus Celsius
®	marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 17
2 REVISÃO DE LITERATURA...... 21
2.1 MAMÍFEROS BRASILEIROS DA ORDEM CARNIVORA..... 21
2.2 AGENTES PATOGÊNICOS E SUA OCORRÊNCIA NOS CARNÍVOROS SELVAGENS..... 22
2.2.1 Vírus da Cinomose Canina (CDV)..... 22
2.1.2 Parvovírus..... 25
2.2.3 Vírus da Raiva...... 27
2.2.4 *Leishmania* spp...... 29
2.1.5 *Leptospira* spp...... 31
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 34
3.1 ÁREA DE ESTUDO..... 34
3.2 CAPTURA DOS CARNÍVOROS SELVAGENS E COLETA DAS AMOSTRAS..... 35
3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS..... 36
3.3.1 Detecção de anticorpos anti-CDV..... 37
3.3.2 Detecção de anticorpos anti-parvovírus..... 38
3.3.3 Detecção de anticorpos anti-vírus rábico..... 39
3.3.4 Detecção de *Leishmania* spp. e determinação das espécies detectadas..... 41
3.3.5 Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp...... 43
3.4 ANÁLISE DOS DADOS..... 45
4 RESULTADOS..... 46
4.1 AMOSTRAGEM DOS CARNÍVOROS SELVAGENS..... 46
4.2 DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS..... 46
4.2.1 Detecção de anticorpos anti-CDV..... 46
4.5.2 Detecção de anticorpos anti-parvovírus..... 50
4.5.3 Detecção de anticorpos anti-vírus rábico..... 52
4.5.4. Detecção de *Leishmania* spp...... 54
4.5.5 Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp...... 54
5 DISCUSSÃO..... 58
5.1 VÍRUS DA CINOMOSE..... 58
5.2 PARVOVÍRUS..... 61
5.3 VÍRUS DA RAIVA..... 64
5.4 *LEISHMANIA* SPP..... 69
5.5 *LEPTOSPIRA* SPP..... 71
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 75
7 CONCLUSÕES...... 80
REFERÊNCIAS..... 82
APÊNDICES..... 98

1 INTRODUÇÃO

A conservação de animais selvagens de vida livre é influenciada atualmente por diversos fatores. No caso das populações de carnívoros, podemos citar como aspectos que as pressionam de maneira negativa a destruição e a fragmentação de seus habitats, e sua caça, assim como a de suas presas, pelo homem. Recentemente, no entanto, o estado sanitário destes animais vem ganhando grande importância neste cenário (FUNK et al., 2001). Epidemias causadas por doenças infecciosas em carnívoros selvagens na África e na América do Norte nas últimas décadas levaram a declínios populacionais significativos em determinadas regiões nestes continentes (WILLIAMS et al., 1988; DAVIDSON et al., 1992b; ALEXANDER; APPEL, 1994; WEILER et al., 1995; ALEXANDER et al., 1996; ROELKE-PARKER et al., 1996; SILLERO-ZUBIRI et al., 1996; LAURENSON; SHIFERAW; SILLERO-ZUBIRI, 1997; VAN DE BILDT et al., 2002).

O crescimento da população humana com o conseqüente aumento da densidade de cães domésticos nos países em desenvolvimento (CLEAVELAND, 1997) e a crescente fragmentação das populações de carnívoros selvagens tendem a propiciar um aumento da taxa de contato entre estes dois grupos. Isto deve tornar cada vez mais comum a ocorrência de epidemias de doenças infecciosas nas populações selvagens de agentes provenientes dos animais domésticos (FUNK et al., 2001).

Por outro lado, não podemos descartar a possibilidade dos animais silvestres servirem como fonte de infecção para os domésticos e, em alguns casos, para o ser humano. Um desafio que vem sendo enfrentado pelas autoridades na área de saúde animal e pública são os focos em animais silvestres de doenças infecciosas que acometem animais domésticos e seres humanos. Estes ameaçam a eficácia de programas nacionais e internacionais de controle e erradicação de doenças, os quais vem sendo implementados e executados com sucesso significativo e a elevados custos (BENGIS; KOCK; FISCHER, 2002). Uma das maiores contribuições de um programa eficiente de monitoramento de doenças em animais selvagens de vida livre é a detecção em estágios iniciais da ocorrência de doenças novas ou emergentes, algumas das quais podem ter sérias implicações zoonóticas e econômicas (MÖRNER; OBENDORF; ARTOIS, 2002). Diante disto, percebemos que tanto os animais selvagens podem ser reservatórios de doenças que ameaçam a saúde de seres humanos e animais domésticos, como as doenças infecciosas emergentes representam uma ameaça para a

conservação dos animais selvagens e, conseqüentemente, para a biodiversidade (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000).

Geralmente, as estratégias de manejo relacionadas às doenças infecciosas nas populações de carnívoros selvagens tendem a ser reativas à ocorrência de epizootias. Desta forma, muitas vezes as decisões são tomadas repentinamente, sem o tempo e as condições de gerar e analisar os dados necessários para a adoção de medidas realmente efetivas. Esta falta de informações, aliada às diversas pressões provenientes de diferentes setores da sociedade para uma resolução do problema, acaba fazendo com que as estratégias de manejo, nessas situações emergenciais, sejam adotadas com base em aspectos de cunho muito mais político do que ecológico ou epidemiológico. Medidas preventivas, embora muitas vezes mais difíceis de serem justificadas (pela ausência de uma situação que exija uma reação imediata, como a morte em massa dos indivíduos de uma determinada espécie em uma certa região, por exemplo), são fundamentais para a conservação em longo prazo dos carnívoros selvagens de vida livre (FUNK et al., 2001).

Na América do sul há pouca informação sobre os efeitos, ou mesmo a presença, de doenças nos carnívoros selvagens de vida livre. Dados sobre a mortalidade de nossa fauna silvestre e suas possíveis causas são ainda pouco explorados.

A Reserva Particular Patrimônio Natural (RPPN) SESC Pantanal, localizada no município de Barão de Melgaço, MT, tem uma área de aproximadamente 106 mil hectares. Estão nela distribuídos sete Postos de Proteção Ambiental (PPAs), onde ficam sediados os guarda-parques, responsáveis pela fiscalização e manutenção da reserva (Figura 1). Nas proximidades da divisa norte da RPPN, estão localizadas comunidades humanas, nas quais os moradores possuem cães e gatos domésticos como animais de estimação, resultando em uma densidade considerável destes animais nesta região. As diferentes espécies de carnívoros selvagens de médio e grande porte presentes na região possuem área de vida relativamente extensa. Desta forma, alguns destes animais podem circular tanto dentro quanto fora da reserva, podendo assim entrar em contato, direto ou indireto, com os animais domésticos, potenciais fontes de agentes infecciosos. Ao sul, a RPPN faz divisa com fazendas, onde a concentração de carnívoros domésticos tende a ser mais baixa. Adjacente a RPPN, encontra-se também o Hotel SESC Porto Cercado e está nos planos da administração a utilização da RPPN para programas de turismo ecológico e científico, num futuro próximo, o que deve aumentar o afluxo de pessoas à reserva.

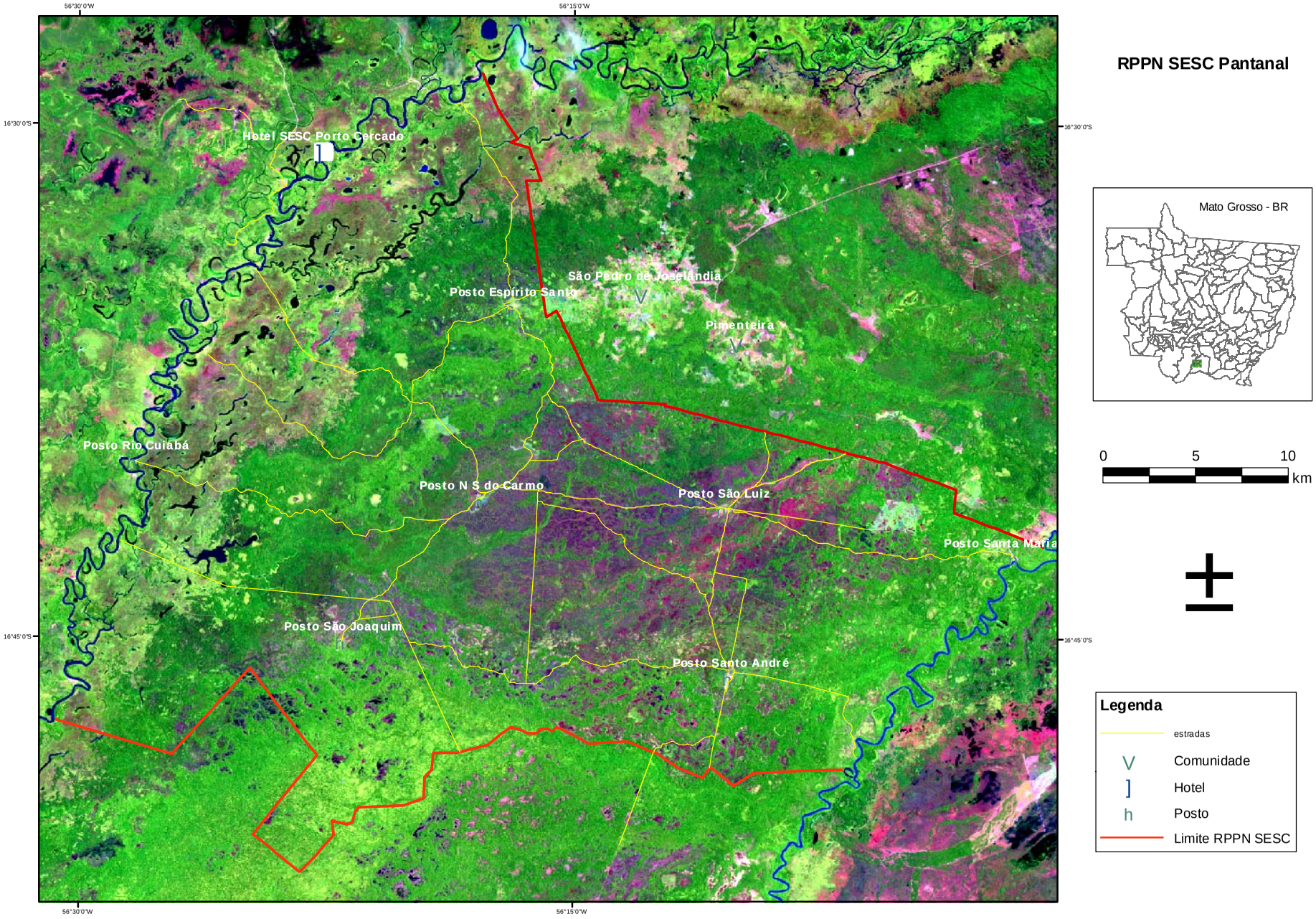

Figura 1 – Mapa da RPPN SESC Pantanal

O presente estudo teve como objetivo avaliar a exposição dos carnívoros selvagens capturados na RPPN SESC Pantanal a agentes infecciosos de potencial impacto para sua conservação e para a Saúde Pública, visando a elaboração e implementação de práticas de manejo para o controle da ocorrência dos agentes pesquisados. Adicionalmente, com o objetivo de avaliar o potencial de transmissão dos patógenos entre carnívoros silvestres e domésticos, foram coletadas amostras biológicas dos cães domésticos nas comunidades que vivem nas proximidades da divisa norte da RPPN para pesquisa de exposição aos mesmos agentes, com a devida autorização de seus proprietários.

Os objetivos propostos abrangem aspectos relacionados à saúde humana, à saúde animal e à saúde ambiental, assim como as interações entre estes. Desta forma, o presente estudo está inserido no conceito de Medicina da Conservação (TABOR, 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção é feita uma breve revisão sobre os mamíferos brasileiros da Ordem Carnivora, os agentes patogênicos abordados no presente estudo e sua ocorrência em animais selvagens, especialmente nos carnívoros.

2.1 MAMÍFEROS BRASILEIROS DA ORDEM CARNÍVORA

Os mamíferos da Ordem Carnivora estão distribuídos em todo o mundo (EISENBERG; REDFORD, 1999). As espécies representantes desta ordem ocorrem em uma grande variedade de fisionomias vegetacionais, condições climáticas e altitudes, desde zonas áridas, florestas tropicais, áreas abertas, montanhas, planícies e ambientes árticos (CHEIDA et al., 2006). No Brasil são encontradas 26 espécies, das quais nove são citadas na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (BRASIL, 2003).

O nome deste grupo taxonômico se deve à característica das espécies a ele pertencentes de consumirem uma proporção significativa de carne proveniente de vertebrados na dieta, capturando suas presas por meio da predação. Em decorrência desta característica inerente dos membros da Ordem Carnivora, eles desempenham importante papel no equilíbrio dos ecossistemas através, principalmente, da regulação das populações de suas presas (MACDONALD; KAYS, 2005). No entanto, a dieta dos mamíferos carnívoros é bastante variável, compreendendo desde as espécies exclusivamente carnívoras, até aquelas que se alimentam principalmente de frutas e invertebrados (EMMONS; FEER, 1997). Desta forma, é importante esclarecer que os carnívoros selvagens citados ao longo deste texto são os mamíferos brasileiros da Ordem Carnivora, uma vez que, além de existirem espécies pertencentes a este grupo que não consomem carne de vertebrados, existem espécies pertencentes a outros grupos taxonômicos que consomem carne, como alguns répteis, aves e peixes.

Os carnívoros selvagens têm um sistema social bastante diverso (MACDONALD; KAYS, 2005), incluindo espécies solitárias, que se encontram apenas na época do acasalamento (como lobos-guarás *Chrysocyon brachyurus*, onças-pardas *Puma concolor* e jaguatiricas *Leopardus pardalis*), espécies que formam pares reprodutivos duradouros (como

cachorros-do-mato *Cerdocyon thous* e guaxinins *Procyon cancrivorous*), espécies que formam pequenos grupos familiares (como cachorros-vinagres *Speothos venaticus*) e, finalmente, aquelas que formam grupos sociais complexos, compostos por dezenas de indivíduos (como hienas *Crocuta crocuta*, cachorros-selvagens-africanos *Lycaon pictus* e leões *Panthera leo* – não há espécies de mamíferos da Ordem Carnivora brasileiras que se encaixem nesta categoria). Esta característica ecológica é especialmente importante no que se refere à transmissão de agentes patogênicos.

2.2 AGENTES PATOGÊNICOS E SUA OCORRÊNCIA NOS CARNÍVOROS SELVAGENS

Nesta sub-seção é feita uma breve revisão sobre os agentes patogênicos abordados no presente estudo e sua ocorrência em animais selvagens, especialmente nos carnívoros.

2.2.1 Vírus da Cinomose Canina (CDV)

O CDV é causador de doença muti-sistêmica, altamente contagiosa, com evolução aguda ou sub-aguda, produzindo quadro febril, podendo atingir os sistemas respiratório, gastro-intestinal e nervoso central (APPEL; SUMMERS, 1995). A cinomose é conhecida na Europa há pelo menos 200 anos. Sua ocorrência foi descrita em carnívoros selvagens 50 anos depois dos primeiros relatos em domésticos (HELMBOLT; JUNGHERR, 1955). Ela ocorre em todas as famílias de carnívoros e está distribuída por todo o mundo. No entanto algumas espécies parecem ser mais suscetíveis que outras (DAVIDSON et al*.*, 1992a).

Diversos surtos de cinomose foram relatados em carnívoros de vida livre na África e América do Norte, alguns deles causando declínios populacionais significativos em decorrência de aumento da mortalidade. Nos Estados Unidos, um surto de cinomose atingiu aquela que era considerada, à época, a última colônia de furões-de-patas-negras (*Mustela nigripes)* na natureza, causando a morte de vários indivíduos (WILLIAMS et al*.*, 1988). Os animais que sobreviveram a este episódio foram recolhidos para a realização de um programa de reprodução da espécie em cativeiro com o objetivo de possibilitar a reintrodução destes

animais no seu ambiente natural. A espécie passou a ser considerada extinta na natureza. Davidson et al. (1992b) determinaram que o vírus foi responsável por 78% da mortalidade das raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) do sudeste norte-americano. Outra espécie sob risco de extinção bastante ameaçada por este agente patogênico é o cachorro-selvagem-africano (*Lycaon pictus)*. O agente foi implicado como responsável por mortalidade expressiva de indivíduos da espécie em Botswana (ALEXANDER et al., 1996) e Tanzânia (VAN DE BILDT et al., 2002), e pelo desaparecimento da espécie na Reserva de Masai Mara, no Quênia (ALEXANDER; APPEL, 1994). Neste mesmo Parque, 55% dos leões (*Panthera leo*) testados foram considerados positivos à sorologia (KOCK et al., 1998). No Serengeti, a cinomose causou a morte de cerca de 1/3 da população de leões (ROELKE-PARKER et al., 1996). Em alguns destes casos, cães domésticos foram identificados como sendo a origem mais provável do agente (ALEXANDER; APPEL, 1994; ROELKE-PARKER et al., 1996; CLEAVELAND et al., 2000). Diante dos surtos citados, devido ao significativo aumento de mortalidade causado pelo agente em populações de diversas espécies de carnívoros de vida livre, a cinomose é considerada como uma das doenças infecciosas que mais ameaça a conservação destes animais.

Para os mamíferos carnívoros da América do Sul, as publicações relacionadas à ocorrência da cinomose, ou mesmo exposição ao agente, ainda são escassas. A maior parte dos trabalhos publicados com espécies sul-americanas compreende relatos de casos ou levantamentos da ocorrência da doença em animais mantidos em cativeiro. Segundo Maia e Gouveia (2002), entre 1989 e 1998, 9% da mortalidade de lobos-guarás em cativeiro no Brasil foi atribuída às doenças infecciosas. Dentro deste grupo, a cinomose foi relacionada a 19,4% dos óbitos. Em um zoológico norte-americano, um surto de cinomose causou a morte de diversos felinos selvagens, dentre os quais uma onça-pintada (*Panthera onca*) (APPEL et al., 1994). Recentemente alguns estudos foram publicados com levantamentos sorológicos em carnívoros brasileiros de vida livre. Courtenay, Quinnel e Chalmers (2001) procuraram anticorpos em cães domésticos de uma comunidade rural no Maranhão e em cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) que freqüentavam as casas dos vilarejos da região em busca de comida. Os cachorros-do-mato foram todos negativos enquanto os cães apresentaram positividade em 2 dos 23 amostrados (9%). No Parque Nacional Noel Kempf Mercado, na Bolívia, dois lobos-guarás foram positivos à sorologia dentre quatro capturados (DEEM; EMMONS, 2005). Outro estudo na Bolívia detectou 4/9 graxains-do-campo (*Pseudalopex gymnocercus*) positivos sorologicamente para a exposição ao vírus da cinomose, enquanto todos os cinco cachorros-do-mato amostrados na região foram negativos (FIORELLO et al.,

2007). Em Minas Gerais, Curi (2005) testou sorologicamente três lobos-guarás, nove cachorros-do-mato e 2 raposinhas-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) capturados na região da Serra do Cipó. Todos foram considerados negativos. Cães domésticos amostrados na região tiveram 65,7% de positividade (46/70).

A transmissão do vírus da cinomose ocorre principalmente através de aerossóis ou contato com secreções orais, respiratórias ou oculares contendo o agente. Animais com infecção sub-clínica podem eliminar o vírus (APPEL, 1987) e o período de eliminação, de forma geral, pode atingir até 90 dias após a infecção (GREENE; APPEL, 1998). É necessário contato próximo entre os animais afetados e suscetíveis para que a transmissão ocorra, uma vez que o vírus é rapidamente inativado no ambiente pelos raios ultravioletas, calor e ressecamento. Portanto, populações densas de animais suscetíveis são necessárias para que uma epizootia ocorra em uma determinada região. Da mesma forma, o comportamento das espécies envolvidas também é fundamental na transmissão do vírus. Espécies gregárias e sociais tendem, portanto, a favorecer a transmissão, enquanto os animais solitários e territorialistas apresentam uma chance menor de transmitir ou contrair o vírus. Assim, diversos fatores são determinantes na epidemiologia da cinomose em uma determinada região, como a suscetibilidade dos hospedeiros, a densidade das populações de hospedeiros suscetíveis simpátricos e a existência de aspectos comportamentais que favoreçam o contato intra e inter-específicos e, portanto, a transmissão do agente (WILLIAMS, 2001).

Os sinais clínicos decorrentes da cinomose dependem da espécie envolvida, idade e estado imunológico. Na maioria das vezes, os sintomas são variações daqueles apresentados pelos cães domésticos. Os sinais clínicos mais característicos nos cães são depressão, secreção mucopurulenta nasal e ocular, dermatites e hiperqueratose dos coxins, tosse e outras manifestações respiratórias, distúrbios gastroentéricos e neurológicos (incoordenação motora, mioclonia, rigidez muscular, ataxia, convulsões, paresia, paralisia, cegueira) (GREENE; APPEL, 1998).

Nos canídeos, os animais jovens parecem ser mais suscetíveis (KRAKOWKA; KOESTNER, 1976). A mortalidade decorrente da infecção também é bastante variável entre as diferentes espécies (WILLIAMS, 2001). Algumas espécies selvagens apresentam-se especialmente suscetíveis e o número de animais infectados que se recuperam é extremamente baixo, como é o caso de furões-de–patas-negras (*Mustela nigripes*) (WILLIAMS et al., 1988) e raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) (DAVIDSON et al., 1992b). Estima-se 25 a 75% dos cães domésticos infectados desenvolvem infecção sub-clínica e eliminam o vírus sem desenvolver a doença (GREENE; APPEL, 1998).

Em áreas enzoóticas, com grandes populações de cães domésticos, a doença clínica é observada principalmente em filhotes de três a seis meses, coincidindo com o período de queda dos anticorpos maternos. Em populações isoladas, o vírus da cinomose, quando é introduzido, costuma ocorrer de forma epidêmica, acometendo cães de todas as idades (LEIGHTON et al., 1988).

2.2.2 Parvovírus

Os vírus pertencentes ao grupo dos parvovírus infectam e podem causar quadro clínico em uma grande parte das espécies de carnívoros selvagens. Este grupo inclui o Parvovírus felino (FPV), o Parvovírus canino (CPV), o Vírus da enterite dos visões (MEV), o Vírus da doença Aleutiana dos visões e o Parvovírus dos guaxinins (CLEAVELAND et al., 2006).

O parvovírus felino é reconhecido por causar a panleucopenia felina há bastante tempo. Estudos realizados nas décadas de 1930 e 1940 revelam que diversas doenças descritas em gatos domésticos anteriormente eram na realidade causadas por este agente (PARRISH, 1990). Naquela época, o FPV também foi implicado na mortalidade de felídeos selvagens em cativeiro (TORRES, 1941; GOSS, 1948; HYSLOP, 1955).

Em 1978 duas novas síndromes começaram a ser observadas com freqüência em cães domésticos. Uma delas era caracterizada como uma miocardite em filhotes abaixo dos quatro meses de idade e a outra como uma gastroenterite em animais de todas as idades. Os primeiros casos parecem ter ocorrido na Europa, mas rapidamente se espalharam pelo mundo todo (PARRISH, 1990). Robinson, Wilcox e Flower (1980) identificaram um parvovírus como agente causador de ambas as síndromes. Este passou a ser conhecido como parvovírus canino tipo 2, como forma de diferenciá-lo do Vírus minuto canino (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990). No entanto, este nome passou a ser preterido e o vírus passou a ser chamado de parvovírus canino (WILLIAMS, 2001). O vírus também atingiu os canídeos selvagens em um curto espaço de tempo. Já em 1979 foram detectados anticorpos em coiotes *Canis latrans* nos Estados Unidos e até 1981 a maioria dos animais desta espécie em Texas, Idaho e Utah eram soropositivos (THOMAS et al., 1984).

O CPV provavelmente derivou do FPV ou de um vírus intimamente relacionado (TRUYEN et al., 1996). Apesar das seqüências de DNA dos isolados de CPV e FPV terem uma identidade de superior a 98%, eles podem ser distinguidos através de anticorpos monoclonais (PARRISH; CARMICHAEL, 1983) e pela diferença de pH e temperatura característicos para a ocorrência de hemaglutinação (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980; SENDA et al., 1988). O encontro de seqüências de DNA intermediárias entre as dos dois vírus a partir de tecidos de raposas vermelhas *Vulpes vulpes* na Europa sugere que animais selvagens podem ter tido grande importância no processo de transmissão do FPV aos cães domésticos (TRUYEN et al., 1998).

Os parvovírus são bastante resistentes no ambiente. Quando protegidos da incidência direta dos raios solares, de altas temperaturas e ressecamento, podem permanecer viáveis por meses (GORDON; ANGRICK, 1986). Quando comparados com outros agentes virais, como os vírus da raiva e da cinomose, têm um período de infectividade relativamente longo e uma vez introduzidos em uma região, tendem a persistir. Devido a estas características, os parvovírus tendem a ocorrer de forma endêmica nas regiões de ocorrência (CLEAVELAND et al., 2006).

A idade dos animais acometidos tem grande importância na patogenia, pois os parvovírus necessitam de células em divisão para sua replicação. Animais jovens têm grandes quantidades de células em divisão e tecidos como o miocárdio e o cérebro são freqüentemente afetados. Nos animais adultos, as células do epitélio intestinal e tecidos linfáticos são geralmente as mais afetadas. Conseqüentemente, os animais desta faixa etária costumam apresentar gastroenterite, linfopenia e leucopenia (STEINEL et al., 2001).

A principal preocupação relacionada à conservação de carnívoros selvagens é a mortalidade de filhotes (JOHNSON; BOYD; PLETSCHER, 1994; WINDBERG, 1995). Segundo Creel et al. (1997), o número de filhotes por ninhada dos cachorros selvagens africanos tende a ser menor nas regiões onde os títulos de anticorpos são os mais altos para os indivíduos testados. Isto pode se constituir em uma ameaça à persistência da população (CREEL; CREEL, 1998).

Com relação aos canídeos sul-americanos, existem registros em zoológicos de doença atribuída ao CPV em lobos-guarás *Chrysocyon brachyurus* (FLETCHER et al., 1979; MANN et al., 1980; MAIA; GOUVEIA, 2002), em cachorros-do-mato (MANN et al., 1980) e em cachorros-vinagres *Speothos venaticus* (JANSSEN et al., 1982). Adicionalmente, alguns estudos foram publicados recentemente com levantamentos sorológicos em canídeos selvagens de vida livre no Brasil e na Bolívia. Courtenay, Quinnel e Chalmers (2001)

procuraram anticorpos em cães domésticos de uma comunidade rural no Maranhão e em cachorros-do-mato que freqüentavam as casas dos vilarejos da região em busca de comida. Os cachorros-do-mato foram todos negativos enquanto os cães apresentaram positividade em 3 dos 23 amostrados (13%). No Parque Nacional Noel Kempf Mercado, na Bolívia, quatro lobos-guarás capturados e submetidos à sorologia foram positivos, resultando em 100% de positividade na amostra (DEEM; EMMONS, 2005). Em Minas Gerais, Curi (2005) testou sorologicamente três lobos-guarás, nove cachorros-do-mato e duas raposinhas-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), capturados na região da Serra do Cipó. Todos foram considerados positivos. Cães domésticos amostrados na região tiveram 58,6% de positividade (41/70). Também na Bolívia, quatro cachorros-do-mato dentre cinco capturados e cinco entre nove graxains-do-campo, foram considerados positivos ao soro-diagnóstico (FIORELLO et al., 2007).

Filoni et al. (2006) realizaram um levantamento da exposição de felídeos selvagens de vida livre ao parvovírus felino. Foram analisadas amostras de soro de 21 animais, entre eles 18 onças-pardas (*Puma concolor*), dois gatos-do-mato-pequenos (*Leopardus tigrinus*) e 1 jaguatirica (*Leopardus pardalis*) de várias regiões do Brasil. Dez deles foram positivos à sorologia, sendo oito onças-pardas. Duas das onças positivas foram capturadas no Pantanal, indicando a presença do agente nesta região. Por outro lado, as seis onças testadas que haviam sido capturadas na RPPN SESC Pantanal, foram negativas.

2.2.3 Vírus da Raiva

O vírus da raiva pode infectar e afetar o sistema nervoso central de todas as espécies de mamíferos, inclusive o ser humano, acarretando altos níveis de mortalidade (RUPPRECHT; STOHR; MEREDITH, 2001). Representa atualmente um sério problema de Saúde Pública na América Latina (CARNIELI et al., 2004). Transmitido principalmente pela mordida de cães e morcegos infectados, o vírus é caracterizado por apresentar um ciclo urbano e outro silvestre. Embora a raiva urbana possa ser controlada, o ciclo silvestre contribui para a circulação e reintrodução do vírus, podendo inclusive iniciar epizootias (CHILDS, 2002).

Na Europa e América do Norte o controle de raiva em animais domésticos foi bem sucedido, permitindo às espécies de animais silvestres superar em importância os cães como

transmissores da doença nas últimas décadas, principalmente a raposa (*Vulpes vulpes*) (SMITH; BAER, 1988; WANDELER, 1988).

No continente Norte Americano, várias espécies silvestres são reconhecidas como reservatórios de raiva, em regiões geograficamente distintas. Nas partes árticas e sub-árticas do Canadá e do Alaska, a raiva é endêmica na raposa do ártico (*Alopes lagopus*), havendo relatos de transmissão para populações de lobos (*Canis lupus*) (WEILER; GARNER; RITTER, 1995). Nos Estados Unidos, tanto a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) quanto a cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) são encontradas em um ambiente muito favorável e comportam-se como importantes transmissores (TOMA; ANDRAL, 1977).

Na América Latina, onde os países se empenham em diminuir a incidência de raiva em humanos através do controle da doença nos cães, é provável que a raiva silvestre, mantida em uma variedade de hospedeiros mamíferos, venha a surgir como um novo problema para a Saúde Pública (BERNARDI et al*.*, 2005).

No Brasil, a raiva ainda é endêmica em muitas partes do país. Apesar da diminuição no número de casos de raiva humana nas últimas décadas, o país ainda atinge uma quantidade expressiva de óbitos nos anos em que são registrados surtos da doença, como ocorreu em 2005, quando foram registrados 44 óbitos, concentrados principalmente na região Norte e Nordeste (BRASIL, 2007a). O ciclo urbano no país tem no cão seu principal reservatório, enquanto o ciclo silvestre tem os morcegos hematófagos neste papel. Porém, nos últimos dez anos, o aumento na detecção de casos de raiva em outros mamíferos, como morcegos não hematófagos, canídeos silvestres e sagüis, e a identificação de novas variantes virais, vem apontando para uma mudança no perfil epidemiológico da raiva no Brasil, com a caracterização dos ciclos aéreo e silvestre terrestre, além dos ciclos urbano e rural (BRASIL, 2006a).

Em relação aos canídeos silvestres, a raiva vem sendo relatada há algum tempo na região Nordeste, incluindo episódios de transmissão destes para seres humanos (CARNIELI et al., 2004). Carnieli et al., 2006, identificaram a ocorrência de um ciclo independente de raiva em canídeos silvestres na região Nordeste do Brasil. Aparentemente, o agente teve origem nos cães domésticos, mas já vem sendo mantido no meio silvestre há algum tempo. O cachorro-do-mato foi identificado como o principal reservatório dentre as espécies de canídeo silvestre da região (CARNIELI et al., 2008), além de ter sido observado que a transmissão do agente se dá tanto dos animais domésticos para os silvestres como no sentido inverso (CARNIELI et al., 2006; CARNIELI et al., 2008). Nas demais regiões do país, informações sobre a exposição dos canídeos silvestres são insuficientes ou inexistentes. Existem ainda

registros da doença no estado do Ceará (BARROS; FREITAS; SOUZA, 1989), Paraíba (GOMES 2004), Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (ARAÚJO, 2002). Recentemente, confirmou-se o papel dos canídeos silvestres como reservatório do vírus da raiva na região da Paraíba, um fato preocupante para a Saúde Pública uma vez que esses animais são comumente criados como animais de estimação (GOMES, 2004; BERNARDI et al., 2005).

O aumento da importância dos canídeos silvestres na epidemiologia da raiva nos últimos anos se traduz nos dados do Ministério da Saúde (informação pessoal[1]), onde podemos observar uma diminuição significativa dos casos de raiva em cães domésticos em contraposição a um aumento acentuado nos registros de agressões de animais silvestres a pessoas. Em 1998 ocorreram 1746 casos de raiva em cães em comparação a 67 casos em 2006. Já o número de agressões de canídeos silvestres a pessoas saltou de dois, em 2000, para 1041, em 2005.

Além da ressaltada importância para a Saúde Pública, o vírus da raiva representa uma ameaça em potencial para a conservação de canídeos de vida livre. A introdução de uma doença de alta letalidade pode trazer graves conseqüências para populações de carnívoros selvagens, principalmente aquelas pequenas e isoladas (GASCOYNE et al., 1993). Um exemplo é a hipótese de que a raiva tenha sido responsável pelo óbito de quase metade de uma população de lobos-da-etiópia (*Canis simenses*) (SILLERO-ZUBIRI; KING; MACDONALD, 1996; LAURENSON et al., 1997). Nos anos subseqüentes, o agente continuou representando uma ameaça importante para a espécie (RANDALL et al., 2006). Outras espécies de canídeos selvagens que tiveram declínio populacional em decorrência da raiva foram os lobos cinzentos, *Canis lupus* (WEILER; GARNER; RITTER, 1995) e os cachorros selvagens africanos, *Lycaon pictus* (KAT et al., 1996; WOODROFFE et al., 1997; HOFMEYR et al.; 2000).

2.2.4 *Leishmania* spp

As espécies de leishmânia que ocorrem no Brasil causam duas doenças de importante impacto em Saúde Pública na América Latina: a leishmaniose visceral americana (LVA) e tegumentar americana (LTA). A LVA atinge pelo menos uma dúzia de países na região e tem

[1] Informação fornecida por Wada na Reunião dos Coordenadores Estaduais da raiva, em Brasília, em 2007.

importância ainda maior no Brasil, que responde por 90% dos casos do continente (MILES et al., 1999). Em nosso país, sua ocorrência predomina na região nordeste, mas vem se expandindo para o restante do país. Nos últimos anos, sua transmissão vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do país, com exceção da região Sul. A doença já foi registrada em 19 dos 27 estados brasileiros (BRASIL, 2006b). Mais de 4000 casos humanos da doença tem sido registrados anualmente no país, sendo 5 a 10% destas pessoas vem a óbito (GOMES et al., 2007).

A LTA está distribuída por todo o território brasileiro, sendo que todos os estados do país já apresentaram casos autóctones (BRASIL, 2007b). A média anual de casos autóctones entre os anos de 1985 e 2005 foi de 28.568, sendo que entre 1988 e 2005 o número de casos por ano oscilou entre 20.000 e 36.000 (BRASIL, 2007b). Apesar de não ser considerada fatal, a LTA pode causar lesões mutilantes (LAINSON; SHAW, 2005).

O agente causador da LVA é o protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* (também conhecido como *L. infantum*) que é transmitido pela picada do mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*). O cão doméstico é considerado o principal reservatório e o programa de controle tem se baseado na eutanásia de cães soropositivos e aplicação de inseticidas de efeito residual (COURTENAY et al., 2002b). Outros mamíferos infectados naturalmente são os canídeos selvagens (DEANE; DEANE, 1954; DEANE; DEANE, 1955; ALENCAR, 1961; LAINSON; SHAW; LINS, 1969; COURTENAY et al., 1996; COURTENAY et al., 2002a) e marsupiais do gênero *Didelphis* (CABRERA et al., 2003).

Em relação aos canídeos selvagens, Deane e Deane (1954) encontraram animais parasitados com *Leishmania chagasi*. Estes canídeos foram identificados como raposinhas-do-campo *(Pseudalopex vetulus*). Courtenay et al. (1996) questionaram a identificação deste reservatório. Eles realizaram um estudo comparando medidas craniais e dentárias de crânios de canídeos coletados na mesma região onde os animais foram capturados por Deane e Deane (1954). Através da comparação deste material com crânios de *Cerdocyon thous* e *Pseudalopex vetulus* de uma coleção de referência, os crânios foram identificados como pertencentes a espécimes de *C. thous* e os autores concluíram que este seria o único canídeo selvagem reservatório da leishmaniose visceral na região. Courtenay et al. (2002a) também encontraram uma proporção significativa de cachorros-do-mato de vida livre naturalmente infectados com o agente na região amazônica, na região de Marajó, no Pará (26 positivos de 37 capturados).

Os causadores da LTA são protozoários do gênero *Leishmania* distribuídos em pelo menos 15 espécies (LAINSON; SHAW, 2005). As principais espécies que ocorrem no Brasil

são *Leishmania (Viannia) braziliensis, Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi, Leishmania (V.) shawii, Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Os vetores são mosquitos flebotomíneos da Ordem Díptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, de diversas espécies (BASANO; CAMARGO, 2004). Dentre os possíveis reservatórios das diferentes espécies de leishmânias causadoras da LTA são citados com grande freqüência os roedores silvestres e, em menor escala, marsupiais, edentados e carnívoros, além dos animais domésticos, como cães, gatos, cavalos e mulas (LAINSON; SHAW, 2005). No entanto, a importância de cada um destes potenciais reservatórios ainda é pouco compreendida.

Curi, Miranda e Talamoni (2006) encontraram evidências de exposição de lobos-guarás e cachorros-do-mato a protozoários do gênero *Leishmania.*

Estes estudos demonstram o possível papel dos canídeos selvagens na epidemiologia das leishmanioses. No entanto, é necessário um aprofundamento maior a este respeito, inclusive com relação à participação de outras espécies de canídeos e mesmo de representantes de outras famílias pertencentes à ordem Carnivora. Ao mesmo tempo, o possível impacto do protozoário sobre as populações de carnívoros selvagens é ainda muito pouco explorado (SILVA; MARVULLO, 2006).

2.1.5 *Leptospira* spp

Leptospira spp. é uma espiroqueta patogênica, causadora da leptospirose, com mais de 170 sorovares organizados em 19 sorogrupos (NIELSEN; ARMSTRONG; NIELSEN, 1989). A leptospirose é uma doença cosmopolita, de caráter zoonótico, que acomete a maioria dos mamíferos (THIERMANN, 1984). Ocorre no meio urbano, rural e silvestre. Sua ocorrência pode se caracterizar como epidêmica ou endêmica, influenciada por fatores ambientais e pelas interações dos diferentes grupos animais (VASCONCELLOS, 1987). Os sinais clínicos mais observados são espasmos musculares, incoordenação, icterícia, hemoglobinúria, febre, perda de peso e vômitos (HORSH, 1999).

Animais de muitas espécies domésticas, assim como a maioria das espécies silvestres, podem se tornar portadores, contribuindo assim para a disseminação do microrganismo na natureza. A eliminação da *Leptospira* pela urina dos portadores ocorre por períodos de tempo

que podem variar de poucas semanas a vários meses, entre os animais domésticos, e por toda vida no caso dos roedores (WEBSTER; ELLIS; MACDONALD, 1995).

Levantamentos sorológicos em animais selvagens de cativeiro demonstram níveis significativos de exposição destes animais. Corrêa et al. (2004) diagnosticaram no Zoológico de São Paulo 59 mamíferos positivos à sorologia dentre 302 testados (19,1 %). Os sorovares encontrados como mais prováveis nos carnívoros foram *pomona* (12/17=70.5%) e *icterohaemorrhagiae* (2/17=11.7%) na Família Felidae, e *grippotyphosa* (1/17=5.8%) e *castellonis* (2/4=50%) na Família Canidae. Segundo Fedullo, carnívoros selvagens mantidos em cativeiro podem, eventualmente, desenvolver os sinais clínicos (informação verbal)[1]. Farias, Silva e Pimentel (1999) descreveram um surto de leptospirose em ariranhas (*Pteronura brasiliensis*) mantidas no zoológico de Brasília.

Em relação aos mamíferos selvagens de vida livre, levantamentos por sorodiagnóstico, isolamento e caracterização genética têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies de carnívoros na epidemiologia da leptospirose. Em Ontario, Canada, 12 raposas vermelhas (*Vulpes vulpes)* foram positivas ao sorodiagnóstico de 100 indivíduos testados, para os sorovares *autumanalis e pomona* (KINGSCOTE, 1986). No entanto, isolados obtidos a partir de rins apenas detectaram a presença de *pomona*. Em Illinois, EUA, 222 guaxinins norte americanos (*Procyon lotor*) dentre 459 amostrados (48%) foram diagnosticados positivos ao sorodiagnóstico para o agente, sendo 220 para o sorovar *grippotyphosa* (MITCHELL et al., 1999). Amostras de urina de cinco dos animais soropositivos foram positivas à cultura para o sorovar *grippotyphosa*. Em outro estudo realizado com guaxinins em Nebraska (EUA), foi diagnosticada uma proporção menor de indivíduos soropositivos (7/63), para *grippotyphosa* (6), *bratislava* (2) e *pomona* (1) (BISCHOF; ROGERS, 2005). Neste mesmo estudo, 67 coiotes (*Canis latrans)* foram testados e considerados negativos. Cirone et al. (1978) testaram amostras de diversas espécies de mamíferos de vida livre capturados na Califórnia (EUA). Dentre os carnívoros, foram testados e positivos ao sorodiagnóstico coiotes (12/12, sorovares mais frequentes *pomona* e *autumnalis*) guaxinins norte americanos (10/10, *pomona* e *autumnalis*), raposas cinzentas (*Urocyon cineroargenteus* – 8/10, *autumnalis*), e pumas (*Puma concolor* – 1/2, *australis*). Khan et al. (1991) amostraram 457 amostras de lobos em Minnesota (EUA) e encontraram 52 indivíduos soropositivos. Os sorovares mais freqüentes foram *gryppotyphosa* (24), *bratislava* (18), *autumnalis* (15) e *canicola* (13).

[1]Informação fornecida por Fedullo em São Paulo, em 2006.

No Brasil, Mathias, Girio e Duarte (1999) realizaram um levantamento sorológico para leptospirose em 17 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) do Pantanal Mato-grossense, MS, e 24 do Parque Nacional de Emas, GO; 24% das amostras do Pantanal Mato-grossense foram reagentes, contra os sorovares *hardjo*, *wolffi* ou *mini*. Nenhuma amostra do Parque Nacional de Emas foi reagente. Girio et al. (2004) testaram 67 bois da raça baguá (*Bos taurus indicus*), 39 porcos-monteiros (*Sus scrofa*), 39 búfalos (*Bubalus bubalis*), nove quatis (*Nasua nasua*), 41 veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*), 10 veados-mateiros (*Mazama americana*) e 110 ovinos (*Ovis aries*), na região pantaneira de Nhecolândia, Corumbá, MS. Sessenta e quatro animais foram positivos (20,3%), com índices mais altos para os bois (41%) e búfalos (40,3%). Souza Júnior et al. (2002) amostraram 427 indivíduos de diversas espécies de mamíferos silvestres resgatados durante o enchimento de uma barragem em Tocantins. Foram positivos ao sorodiagnóstico 46 de 286 macacos-prego (*Cebus apella),* 2/82 bugios (*Allouata caraya)*, 4/31 quatis (*Nasua nasua)* e 2/10 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous)*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção são descritos a área de estudo, os métodos de captura e os métodos utilizados nas análises laboratoriais.

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A Reserva Particular do Patrimônio Natural do SESC Pantanal (RPPN – SESC Pantanal), com aproximadamente 106.000 hectares, situa-se no município de Barão de Melgaço entre as coordenadas geográficas 16º - 17º S e 56º - 57º W, à cerca de 150 km de Cuiabá, capital do estado de Mato Grosso (Figura 1).

A Reserva apresenta um mosaico de vegetação, constituído de várias fitofisionomias típicas do pantanal. Estas são caracterizadas como Campo de Murundus, Cerrado *sensu stricto,* Cerradão, Mata Ciliar, Mata Seca com Taboca (*Guadua* sp.), Mata Seca com Acuri (*Scheelea phalerata*), Campos Arbustivos com capim alto, Formações Arbustivas, Caapão, Cambarazal e Cordilheiras, entre outras menos representativas (informação verbal)[1].

O clima da região apresenta duas estações bem definidas, uma chuvosa (outubro a março) e outra seca (abril a setembro) sendo do tipo Aw na classificação de Köppen (NIMER, 1989). A precipitação pluviométrica anual oscila entre 1.000 e 1.400mm (informação verbal)[2], apresentando relevo essencialmente plano, com solos arenosos e argilosos, de forma alternada e descontínua (ALLEM; VALLS, 1987).

Em virtude da dimensão e características peculiares dos habitats da RPPN, esta área pode ser considerada de grande importância para estudos e conservação dos carnívoros selvagens, especialmente na região do Pantanal.

[1] LIMA, em Barão de Melgaço, MT, em 2004.
[2] HASENACK; CORDEIRO, em Barão de Melgaço, MT, em 2003.

3.2 CAPTURA DOS CARNÍVOROS SELVAGENS E COLETA DAS AMOSTRAS

Para a captura das onças-pardas foi utilizada a técnica de perseguição com cães farejadores. Nesta, membros da equipe saíam ao clarear do dia percorrendo as estradas próximas ao Posto de Proteção Ambiental (PPA) onde estivéssemos sediados, a procura de vestígios de onças, como pegadas ou fezes, por exemplo. Ao achar algum destes vestígios, os cães eram colocados para farejar, na tentativa de fazê-los encontrar a trilha por onde a onça havia passado através do olfato. Quando conseguiam localizá-la, os cães perseguiam-na até que ela subisse em uma árvore. Neste momento o dardo anestésico era preparado e atirado na musculatura do membro posterior do animal com o auxílio de um rifle de ar comprimido.

As demais espécies de carnívoros silvestres foram capturadas através de armadilhas do tipo gaiola, iscadas com carne bovina ou de frango, crua ou levemente assada. As armadilhas foram colocadas ao longo das estradas, nas proximidades do PPA no qual estivéssemos hospedados naquela ocasião. Este procedimento foi embasado na frequente utilização das estradas da RPPN pelos animais silvestres (TROLLE; KÉRY, 2005), já que estas são pouco utilizadas por veículos motorizados. Todos os animais foram marcados através da colocação de um microchip sub-cutâneo, para identificação em uma eventual recaptura.

Para os lobos-guarás, mãos-peladas, cachorros-do-mato, cachorros-vinagres e jaguatiricas foram realizadas em média duas campanhas de captura de aproximadamente 10 dias nas proximidades de cada PPA, na tentativa de conseguir uma amostragem espacialmente completa da RPPN. No entanto, houve um viés de esforço na região central da RPPN, onde se localiza o PPA São Luiz, devido a questões logísticas. Desta forma, apesar de todos os PPAs terem sido amostrados, o PPA São Luiz recebeu um esforço consideravelmente maior do que os demais.

As coletas de amostras em onças-pardas foram realizadas apenas no início dos trabalhos, em 2002 e 2003, devido a maior dificuldade e gastos elevados para sua realização. Nesta época havia interesse nas capturas de indivíduos desta espécie por parte da administração da RPPN para a colocação de rádios-colares para a realização de um projeto envolvendo estudo da ecologia da espécie e turismo-científico e, desta forma, este procedimento foi financiado e incentivado pelo SESC. Estas capturas tiveram uma distribuição ampla dentro da RPPN pela diferença na técnica de captura desta espécie. As onças-pardas também se diferenciam das outras espécies capturadas pelo fato de terem uma

área de vida significativamente maior, o que possibilita que, mesmo um indivíduo que tenha sido capturado numa região mais central da reserva, possa utilizar áreas externas à RPPN, aumentando sua chance de contato com os animais domésticos.

Os cães domésticos de quatro comunidades localizadas nas proximidades da RPPN SESC Pantanal – Retiro, São Pedro de Joselândia, Pimenteira e Colônia Santa Isabel (Figura 1) - tiveram seu sangue coletado para realização dos mesmos testes diagnósticos realizados nos carnívoros selvagens, mediante autorização verbal de seus proprietários. Foi realizada contenção física para punção da veia cefálica dos cães para a coleta. Também foram coletadas amostras dos eqüinos que são utilizados para deslocamento na RPPN, especialmente na época de cheia, quando veículos motorizados ficam impossibilitados de transitar.

Para a colheita do material biológico, os carnívoros foram anestesiados com cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (Zoletil 50®), na dosagem de 5 a 10 mg/kg, considerando estimativa de peso.

O sangue foi retirado através de punção venosa da veia cefálica ou jugular através de tubos a vácuo sem aditivos e tubos com citrato de sódio, para alguns indivíduos. O soro foi separado por centrifugação, dividido em alíquotas de 0,5 a 1 mL e, em seguida, congelado a 20°C negativos. Os coágulos resultantes dos tubos em que o soro havia sido retirado também foram acondicionados em tubos criogênicos e congelados, assim como o sangue total com citrato de sódio, separado em alíquotas de 1,5 ml, aproximadamente.

3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Nesta sub-seção são descritos os métodos empregados para a detecção de anticorpos anti-CDV, anti-parvovírus, anti-vírus rábico, anti-*Leptospira* spp e para a detecção de *Leishmania* spp.

3.2.1 Detecção de anticorpos anti-CDV

Para a detecção de anticorpos contra a cinomose no soro dos animais capturados foi realizada a técnica de soroneutralização microscópica (APPEL; ROBSON, 1973), adaptada para a utilização de fibroblastos de embriões de galinha (BIAZZONO; HAGIWARA; CORRÊA, 2001), células utilizadas no laboratório do setor de "Controle de Qualidade" da empresa BIOVET, que gentilmente cedeu sua estrutura laboratorial e auxílio técnico para a realização deste diagnóstico sorológico para o presente estudo.

As amostras de soro conservadas a -20 ºC foram descongeladas e inativadas a 56ºC em banho-maria por 30 minutos. Foram utilizadas placas de 96 orifícios de fundo chato sem células para a diluição seriada dos soros a serem analisados, de forma que cada orifício da placa continha apenas 50 µL de meio 209 acrescido de gentamicina (0,625 g/mL) e, no primeiro orifício foram adicionados 50 µL do soro inativado.

A seguir realizou-se a diluição seriada na base 2, com o uso de pipeta multicanal, perfazendo dez diluições (1:2 a 1:1028).

Ao vírus previamente liofilizado (cepa Lederle BIOVET adaptada à cultura de fibroblastos de embriões de galinha) foram adicionados 10 ml de meio 209, obtendo-se uma suspensão considerada diluição mãe; em seguida adicionou-se 4 ml desta diluição a 36 ml de meio 209, obtendo-se assim a suspensão 10^{-1}, realizando-se o mesmo procedimento para a obtenção das diluições 10^{-2} e 10^{-3}, tendo, a 100 $TCID_{50}$, sido encontrada na diluição mãe.

Às microplacas sem células e com o soro diluído foram adicionados 50 µl da suspensão viral contendo 100 $TCID_{50}$.

Realizou-se a agitação cuidadosa das placas para a homogeneização da mistura vírus-soro e as mesmas foram colocadas em estufa úmida a 37 ºC, com 3% de CO_2 por uma hora. Em seguida, foram acrescentados 100 µl de suspensão de fibroblastos de embriões de galinha, contendo aproximadamente 50.000 células. As microplacas foram incubadas em estufa úmida a 37 ºC, com 3% de CO_2 por cinco dias.

Cada placa continha controle de células e controle de vírus, além do soro padrão e eram observadas em microscópio invertido diariamente para a visualização dos controles.

Decorridos cinco dias, as placas foram lidas em microscópio invertido para verificar a presença ou ausência de efeito citopático que, quando presentes, indicavam a ausência de anticorpos em títulos suficientes para neutralizar o vírus e, assim, impedir sua replicação pelo tapete celular. O título para o CDV foi determinado como o inverso da maior diluição que

determinou proteção completa do tapete celular (100%), considerado como ponto final (HOOVER; BALDWIN; RUPPRECHT, 1989).

3.2.2 Detecção de anticorpos anti-parvovírus

Para a detecção de anticorpos contra o Parvovírus no soro dos animais capturados foi realizada a técnica de inibição da hemaglutinação (HI – CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980) no Laboratório de Imunodiagnóstico aplicado a Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Publica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu.

As amostras de soro conservadas a -20 ºC foram descongeladas. Foram separados 100 µl e inativados a 56ºC em banho-maria por 30 minutos. Ao soro inativado foram acrescidos 900 µl de tampão borato salina (PBS), resultando em uma diluição da amostra a 1:10. Em seguida foram adicionados 100 µl de suspensão a 50% de hemácias de suíno para inativação de hemaglutinantes inespecíficos. Esta mistura foi então incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 1.500 g por 10 minutos para a retirada dos eritrócitos e o sobrenadante foi separado para a realização do teste.

Em uma placa de 96 orifícios com fundo em "U", colocamos 50 µl do soro tratado na primeira coluna. Nas colunas 2 a 8, foram colocados 25 µl de PBS. Em seguida, foram realizadas diluições dos soros na base 2, de 1:10 até 1:1280. Em seguida, 25 µl de vírus atenuado da vacina Parvoguard – L (Solvay Saúde Animal Ltda., Brasil) contendo 8 unidades hemaglutinantes (UHA) foram acrescentados a todos os orifícios. As placas foram então incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período, foram acrescentados 50 µl de suspensão de hemácias a 1% em PBS com soro albumina bovina (0,1%). Os testes foram incubados em geladeira por 24 horas e em seguida realizamos a leitura das placas. Foram considerados positivos para exposição ao Parvovírus os animais para os quais foi observada a formação do "botão" de hemácias na diluição 1:80, ou seja, onde ocorreu inibição pelo soro da hemaglutinação que seria propiciada pelo antígeno. O título de anticorpos foi considerado o inverso da maior diluição das amostras de soro que foi capaz de inibir a hemaglutinação. Os animais para os quais houve inibição da hemaglutinação pelo soro entre as diluições 1:10 e 1:40 foram considerados suspeitos. Em cada lote de placas foram incluídos controles do antígeno, de hemácias, de uma amostra de soro sabidamente positiva e de soro negativo. As

amostras foram testadas em duplicata e, no caso de resultados incompatíveis, o procedimento foi repetido.

3.2.3 Detecção de anticorpos anti-vírus rábico

Para a detecção de anticorpos contra a raiva foi realizado o microteste simplificado de inibição de focos fluorescentes (SFIMT) (FAVORETTO et al., 1993), desenvolvido pelo Instituto Pasteur de São Paulo. Esta é uma técnica simplificada para a detecção de anticorpos neutralizantes nos soros testados que apresenta resultados semelhantes aos obtidos quando da realização da inibição fluorescente-focal rápida (RFFIT), descrito por Smith, Yager e Baer (1996) (CHAVES et al., 2006). O teste foi realizado no laboratório de sorologia do Instituto Pasteur (SP).

As amostras de soro conservadas a -20 ºC foram descongeladas e inativadas a 56 ºC em banho-maria por 30 minutos. Foram realizadas duas séries de seis diluições do soro padrão (200 unidades internacionais por mililitro - UI/ml), uma com diluição inicial de 1:2000 e a outra 1:3000.

Uma série de seis poços foi utilizada para cada amostra de soro. No 1º poço de cada fileira, foram colocados 20 µl do soro inativado juntamente com 180 µL de meio Eagle básico, a fim de se atingir uma diluição 1:10. Nos demais poços, foram adicionados 100 µl de meio. Após homogeneizar o conteúdo do 1º poço, são transferidos 100 µl para o 2º poço, onde o conteúdo é novamente homogeneizado para ser transferido para o 3º poço e assim segue-se até chegar ao 6º poço, quando os 100 µl finais são desprezados. Desta forma, os soros foram diluídos de 1:10 até 1:320.

Foram adicionados 50 µL de vírus PV (“Pasteur Virus”) em todos os poços, em diluição pré-determinada suficiente para infectar 80% das células. Também foi realizada a titulação do vírus de 2:1 a 1:4, a partir da diluição utilizada na placa.

As microplacas foram incubadas a 37ºC, em estufa a 5% de CO_2, por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 50µL de suspensão de células BHK-21 (10.000 células/poço). Então, as placas foram incubadas novamente durante 24 horas.

O meio de cultura foi aspirado cuidadosamente com bomba a vácuo para que o tapete celular pudesse ser fixado com 200 µl de acetona 80%, gelada. Após 15 minutos em banho de gelo, a acetona foi desprezada e as placas foram secas. Em seguida, foram adicionados 40 µl

de conjugado anti-rábico, produzido no Instituto Pasteur, em diluição 1:120, e as placas foram incubadas por 1 hora.

As placas foram então lavadas duas vezes por imersão em PBS e quatro vezes em água destilada. Depois de secas, foram adicionados 50 µl de glicerina tamponada. Procedeu-se em seguida à leitura das placas em microscópio de fluorescência.

Os resultados correspondem à diluição onde ocorre decréscimo de 50% de infecção, ou seja, o poço em que metade das células encontram-se infectadas pelo vírus (fluorescente) e outra metade não (fundo escuro), indicando, assim, que há uma concentração significativa de anticorpos neutralizantes no soro. Vale lembrar que leituras intermediárias (entre um poço e outro) também podem ser feitas.

Para a obtenção do título sorológico, a diluição em que o soro padrão apresenta 50% de decréscimo de infecção servirá de base para o cálculo de cada amostra testada, uma vez que o título do soro padrão é conhecido. Dessa forma, através de regra de três, comparamos os resultados obtidos com o soro padrão e o soro problema, resultando no título sorológico em UI/ml.

Como o título do soro padrão é sempre constante, pode-se obter o título do soro problema, localizando a diluição onde o soro problema e o soro padrão neutralizaram 50% da infecção e observando a intersecção dos resultados na tabela 1. Por exemplo, se a leitura do soro padrão indicar a diluição onde há decréscimo de 50% de infecção na diluição 1:32000, este valor servirá de base para o cálculo dos títulos de todas as amostras seguintes. Se a leitura de uma amostra apontar para o terceiro poço (diluição 1:40), o seu título será de 0,20 UI/mL, assim como, se na amostra seguinte, a leitura indicar o quarto poço (diluição 1:80), o título dessa amostra será de 0,40 UI/mL.

Consideramos que um animal não vacinado teve contato com o vírus rábico quando seu título foi igual ou superior a 0,10 UI/mL.

Tabela 1 – Valores de referência para comparação entre as diluições onde os soros pesquisados neutralizaram 50% da fluorescência e a diluição na qual o soro padrão neutraliza 50% da fluorescência, para o cálculo do título sorológico em UI/mL

Poço 50% de infecção	Diluição da amostra	Diluição do Soro Padrão				
		1: 12.000	1: 16.000	1: 24.000	1: 32.000	1: 48.000
1	1:10	0,13	0,10	0,07	0,05	0,03
1/2	1:15	0,20	0,15	0,10	0,08	0,05
2	1:20	0,27	0,20	0,13	0,10	0,07
2/3	1:30	0,40	0,30	0,20	0,15	0,10
3	1:40	0,53	0,40	0,27	0,20	0,13
3/4	1:60	0,80	0,60	0,40	0,30	0,20
4	1:80	1,07	0,80	0,53	0,40	0,27
4/5	1:120	1,60	1,20	0,80	0,60	0,40
5	1:160	2,13	1,60	1,07	0,80	0,53
5/6	1:240	3,20	2,40	1,60	1,20	0,80
6	1:320	4,30	3,20	2,13	1,60	1,07

3.2.4 Detecção de *Leishmania* spp. e determinação das espécies detectadas

Para a detecção da *Leishmania* spp. em amostras de sangue total ou coágulo, foi utilizada a reação em cadeia pela polimerase (PCR) realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Odontologia da UNESP, Câmpus Araçatuba. A utilização de *primers* na PCR que amplificam fragmentos de ácido desoxirribonucléico (DNA) de kinetoplasto permite a detecção de protozoários do gênero *Leishmania*, não sendo possível em princípio determinar a espécie. Inicialmente, foi realizada a extração do DNA através de técnica descrita por Sambrook et al. (1989). Para isto, as amostras de sangue foram descongeladas e foram separadas em alíquotas de 700 µl para o procedimento. Os coágulos também foram descongelados e em seguida macerados. Após o descongelamento, foram adicionados 800 µl de tampão SSC (*standard saline citrate* – salina citrato padrão) e centrifugou-se o resultante por 2 minutos, a 14.000 g. O sobrenadante foi descartado (1 ml) com posterior adição de 1 mL de tampão SSC. Após

agitação, centrifugou-se por mais 2 minutos e removeu-se o líquido sobrenadante. Ao sedimento obtido, adicionou-se uma solução de lise contendo 375 µl de acetato de sódio (0,2M), 25 µl dodecil sulfato de sódio-SDS (10%) e 5,0 µl de Proteinase K (20,0 mg/mL em água). Após a adição destes reagentes, agitou-se vigorosamente a amostra e incubou-se a 56ºC, por 2 horas. Nas amostras de coágulo este tempo de incubação foi aumentado para 3 horas, sendo que após 2 horas, acrescentou-se novamente 5,0 µl de Proteinase K (20,0 mg/ml em água). Posteriormente, adicionou-se 400 µl da solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e agitou-se vigorosamente por 30 segundos. Em seguida centrifugou-se por 2 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente removido e colocado em outro tubo de 1,5 ml. À camada aquosa obtida no passo anterior adicionou-se 1,0 ml de álcool etílico absoluto gelado, misturando-os, por inversão e em seguida incubando a amostra à 20ºC durante 15 minutos.

Após incubação, centrifugou-se por 2 minutos e removeu-se o líquido sobrenadante por decantação. Ao sedimento resultante adicionarou-se 180 µl de tampão TE, (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 7,5) agitando-se vigorosamente. Posteriormente, a amostra permaneceu em banho-maria por 10 minutos, a 56ºC. Decorridos 10 minutos, adicionaram-se 20 µl de acetato de sódio 2M e agitou-se vigorosamente a amostra por 5 segundos adicionando-se, à solução, 500 µl de álcool etílico absoluto gelado. Misturou-se a amostra cuidadosamente até atingir uma solução homogênea. Em seguida, centrifugou-se por 2 minutos e removeu-se o líquido sobrenadante por decantação. Ao sedimento foi adicionado 1mL de álcool etílico a 70%, à temperatura ambiente, e centrifugou-se por 1 minuto removendo-se, logo após, o líquido sobrenadante, por decantação. O material obtido no passo anterior foi colocado em centrífuga a vácuo por 10 minutos a 37ºC. Logo após a secagem, ressuspendeu-se o sedimento em 100 µl de tampão TE, estando dessa maneira o DNA pronto para ser avaliado por espectrofotometria ou eletroforese.

Para a amplificação do DNA foi realizada a PCR**.** Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers, Popper e Wirth (1990), que resultam em amplificação de fragmento de 120 pares de base (pb) de DNA de kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp.:

13A (5´-GTC GGG GAG GGG CGT TCT -3´) e

13B (5´-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3´)

As reações de PCR foram realizadas em duplicata, em tubos de polipropileno de 0,2 ml contendo tampão da Taq Platinum DNA polimerase 1x (Invitrogen, Carlsbad, California), 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 µM cada *primer*, 0,04 U de

Taq DNA polimerase e 5 µl de DNA, num volume final de 50 µl. As amostras foram amplificadas em um aparelho termociclador com denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, sendo seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para denaturação, 63°C por 45 segundos para anelamento, 72°C por 30 segundos para extensão e 72°C por 5 minutos para extensão final. Em cada reação foram incluídos um controle positivo (DNA de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* mantidas em cultivo), um controle negativo (DNA de sangue de cão de área não endêmica para leishmaniose visceral canina e negativo para anticorpos anti-*Leishmania* spp.) e um tubo controle com água ultra-pura (sem DNA).

Os produtos da PCR foram analisados através de Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corados com nitrato de prata em tampão TAE x1, em cuba de eletroforese horizontal a 80 V (~ 1 hora) e fotografados em luz UV.

O material genético extraído das amostras consideradas positivas à PCR para *Leishmania* spp., foi encaminhado ao laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo para a determinação da espécie de leishmânia detectada. Para tanto, foi realizado neste material uma PCR com os *primers* S4 (5'-GATCCAGCTGCAGGTTCACC-3') e S12 (5'-GGTTGATTCCGTCAACGGAC-3'), descritos por Uliana et al. (1994), que amplificam um fragmento com 539 nucleotídeos da pequena sub-unidade de DNA ribossômico (*small subunit ribosomal DNA - SSU rDNA)*. O material resultante da PCR foi então seqüenciado e as seqüências comparadas com aquelas descritas por Uliana et al. (1994), para a determinação da espécie ou grupo de leishmânias presentes nas amostras.

Para leishmânias do sub-gênero *Viannia*, a técnica de amplificação e seqüenciamento da SSU rDNA apenas possibilita a identificação do grupo e não de cada uma das espécies. Desta forma, as amostras identificadas como positivas para este grupo foram submetidas a PCRs com *primers* que amplificam fragmentos do gene que codifica para a enzima glicose-6-fosfato dehidrogenase (G6PD), descritos por Castilho, Shaw e Floetter-Winter (2003).

3.2.5 Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp

Para detecção das aglutininas anti-leptospira foi realizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), descrita por Faine (1982), com uma coleção de antígenos vivos que

inclui 25 variantes sorológicas de *Leptospira interrogans* patogênicas e duas saprófitas (Quadro 1).

Nesta técnica, antígenos cultivados em meio líquido são expostos a diluições seriadas do soro dos animais. Leva-se em consideração para a titulação, a diluição mais alta que causa aglutinação de 50% dos antígenos. A diluição inicial do soro é de 1:100, a partir da qual as amostras reativas são consideradas positivas. Em seguida, são realizadas diluições pareadas para os antígenos que tiveram resultado positivo, para determinar anticorpos para quais variantes estão presentes na maior concentração. Os animais positivos para um sorovar têm, freqüentemente, reação cruzada para outros sorovares.

Leptospiras patogênicas		**Leptospiras patogênicas**	
Sorogrupo	*Variante Sorológica*	*Sorogrupo*	*Variante Sorológica*
Australis	australis bratislava	Javanica	Javanica
Autumnalis	autumnalis butembo	Panamá	Panamá
Ballum	castellonis	Pomona	pomona Fromm
Batavia	bataviae brasiliensis	Pyrogenes	Pyrogenes
Canicola	canicola mini	Sejroe	hardjo wolffi
Celledoni	whitcombi	Shermani	Shermani
Cynopteri	cynopteri	Tarassovi	Tarassovi
Grippotyphosa	grippotyphosa	Djasiman	Sentot
Hebdomadis	hebdomadis	**Leptospiras saprófitas**	
Icterohaemorrhagiae	copenhageni icterohaemorrhagiae	Andamana	Andamana
		Seramanga	Patoc

Quadro 1 - Antígenos utilizados na MAT para o sorodiagnóstico para *Leptospira* spp. - São Paulo - 2007

3.3 ANÁLISE DOS DADOS

Por se tratar de um estudo descritivo, a análise dos dados está baseada no cálculo de freqüências e respectivos intervalos de confiança, com o auxílio do programa MINITAB 14. Paralelamente, as informações foram mapeadas para que pudéssemos caracterizar a distribuição espacial dos animais silvestres e domésticos positivos e negativos à exposição aos diversos agentes pesquisados, através do programa ArcGIS 9.0. Com o auxílio deste mesmo programa, foram calculadas as distâncias dos pontos de captura dos carnívoros selvagens em relação à divisa da RPPN. Para cada agente patogênico para o qual realizamos diagnóstico neste estudo, foram calculadas as médias destas distâncias para os animais considerados positivos e para aqueles considerados negativos. Comparamos então estas médias através do teste t, ou, quando os dados analisados não apresentaram distribuição normal ou variâncias iguais, as distâncias foram comparadas através do teste não paramétrico U de Mann Whitney, também com o auxílio do programa Minitab 14. Desta forma, procuramos determinar se os animais positivos estavam, em média, mais próximos ou mais distantes da divisa da RPPN que os animais negativos, o que seria um indicativo do possível efeito do contato dos animais selvagens com a população de animais domésticos do entorno da RPPN.

4 RESULTADOS

Nesta seção são descritos os resultados da amostragem dos carnívoros selvagens e animais domésticos e dos diagnósticos laboratoriais. Trabalhos apresentados em eventos científicos com base em parte destes resultados encontram-se nos apêndices C, D e E.

4.1 AMOSTRAGEM DOS CARNÍVOROS SELVAGENS

Foram capturados 76 carnívoros selvagens entre janeiro de 2002 e agosto de 2006, dentre eles 43 cachorros-do-mato, oito lobos-guarás, um cachorro-vinagre, 13 guaxinins, sete onças-pardas e quatro jaguatiricas. Todos tiveram amostras coletadas.

Foram coletadas amostras de 103 cães domésticos e de 27 eqüinos.

As capturas de carnívoros selvagens e coletas de amostras nos cães domésticos estão mapeadas na figura 2.

4.2 DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS

Nesta sub-seção são descritos os resultados da detecção de anticorpos anti-CDV, anti-parvovírus, anti-vírus rábico, anti-*Leptospira* spp e da detecção de *Leishmania* spp para os carnívoros selvagens e cães domésticos. Os resultados individualizados estão disponíveis nos apêndices A e B.

4.2.1 Detecção de anticorpos anti-CDV

Os resultados da soroneutralização microscópica para as amostras dos carnívoros selvagens para a titulação dos anticorpos que neutralizam o vírus da cinomose estão representados na tabela 2.

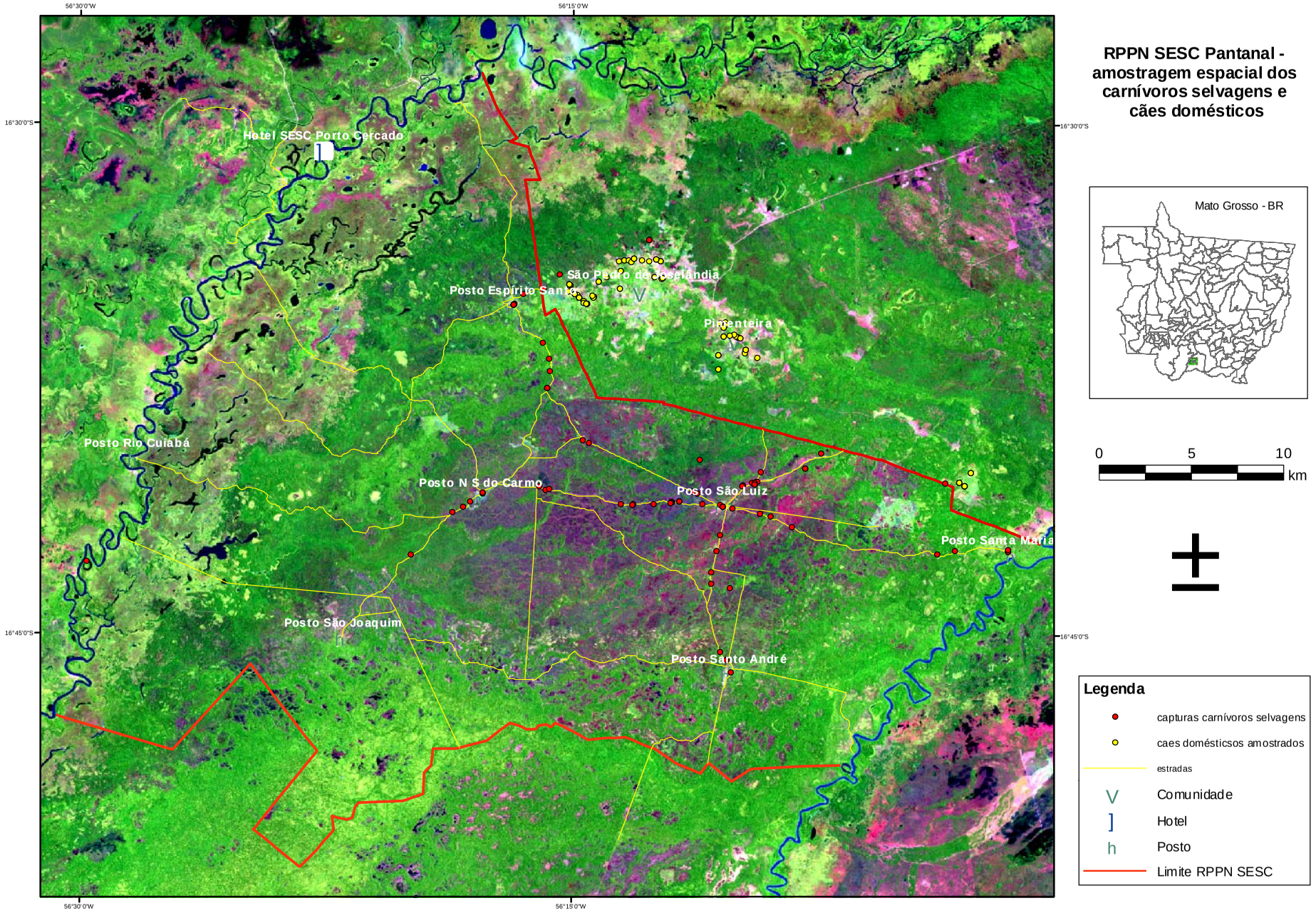

Figura 2 – Locais de captura dos carnívoros selvagens e de amostragem dos cães domésticos

A freqüência de carnívoros selvagens positivos para a presença de anticorpos contra o vírus da cinomose foi de 28% [18,24; 39,56].

Tabela 2 - Lista das espécies de carnívoros selvagens testadas para a presença de anticorpos contra o vírus da cinomose, variação dos títulos obtidos, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie

Espécie	**Variação dos títulos**	**Positivos**	**Testados**	**% Positivos**
Cerdocyon thous	8-64	12	43	27,9
Chrysocyon brachyurus	16-32	3	8	37,5
Procyon cancrivorous	16-64	2	13	15,4
Puma concolor	8	1	7	14,3
Leopardus pardalis	32-64	3	4	75
TOTAL		21	75	28

A média da distância do local de captura dos carnívoros selvagens considerados positivos para a exposição ao vírus da cinomose foi de 3648,24 metros, enquanto a média dos negativos foi de 4232,78 metros. A diferença entre as médias, de 584,54 metros, não foi considerada estatisticamente significativa através do teste U de Mann-Whitney (p = 0,640).

Dentre os 69 cães domésticos amostrados, 56 (81,16%) foram soropositivos para cinomose [71,70; 90,62].

A distribuição espacial destes resultados está ilustrada na figura 3.

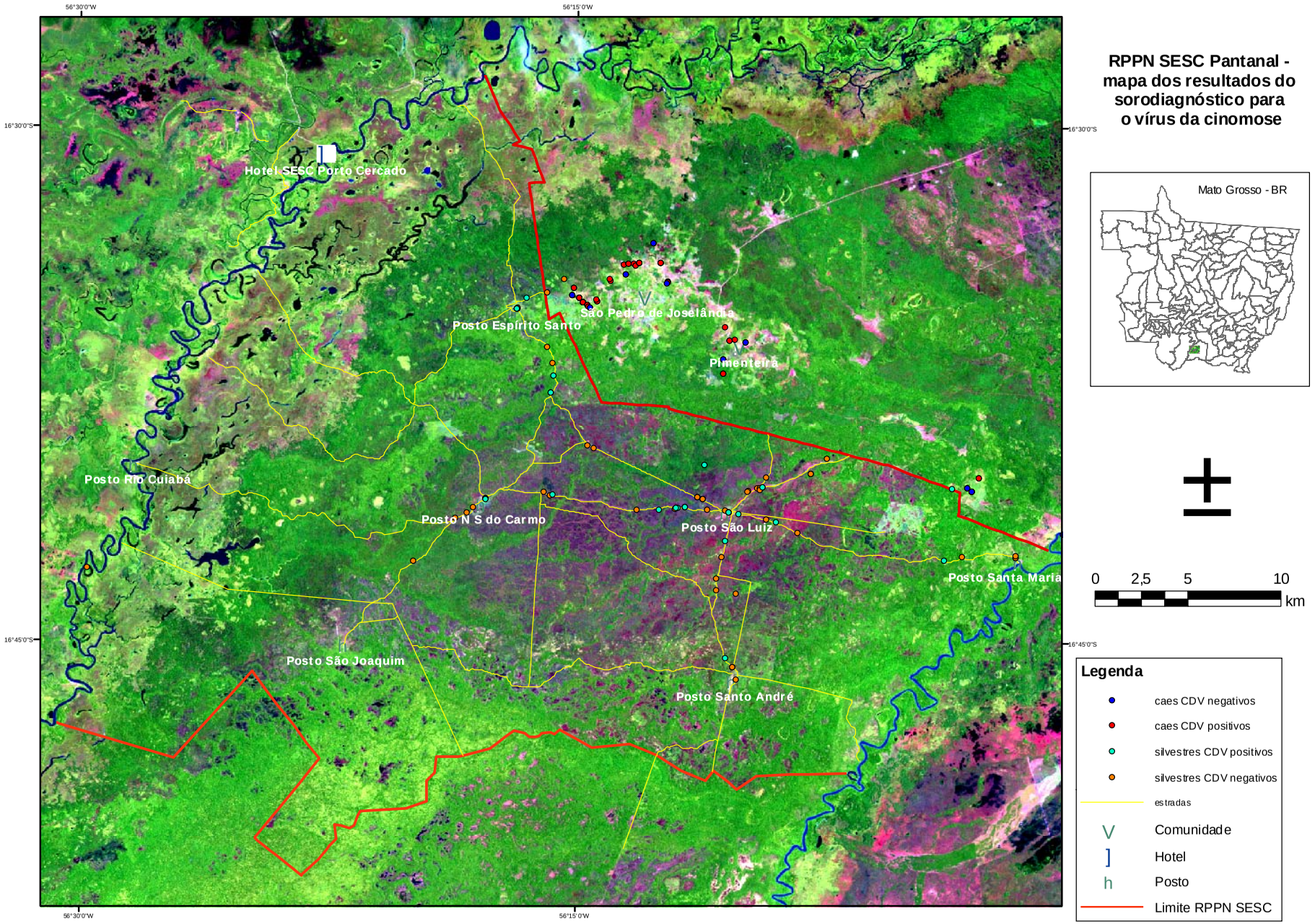

Figura 3 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para cinomose

4.5.2 Detecção de anticorpos anti-parvovírus

Os resultados do teste sorológico de inibição da hemaglutinação nas amostras dos carnívoros selvagens para a titulação dos anticorpos que combatem o parvovírus estão representados na tabela 3.

A freqüência de carnívoros selvagens positivos para a presença de anticorpos contra o Parvovírus Canino foi de 92,11% [85,90; 98,31].

Tabela 3 - Lista das espécies de carnívoros selvagens testadas para a presença de anticorpos contra o Parvovírus Canino, variação dos títulos obtidos, número de indivíduos suspeitos (10≥Título≥40), número de indivíduos positivos (Título≥80), número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie

Espécie	**Variação dos títulos**	**Suspeitos (10≥T≥40)**	**Positivos (T≥80)**	**Testados**	**% Positivos**
Cerdocyon thous	0-320	0	42	43	97,67
Chrysocyon brachyurus	40-160	1	7	8	87,5
Procyon cancrivorous	40-320	3	10	13	76,92
Puma concolor	80-160	0	7	7	100
Leopardus pardalis	40-160	1	3	4	75
Speothos venaticus	160	0	1	1	100
TOTAL	0-320	4	70	76	92,11

A média da distância do local de captura dos carnívoros selvagens considerados positivos para a exposição ao parvovírus foi de 3969 metros, enquanto a média dos negativos foi de 4514,8 metros. A diferença entre as médias, de 545,8 metros, não foi considerada estatisticamente significativa através do teste U de Mann-Whitney (p = 0,396).

Dentre os 102 cães domésticos amostrados, 98 (96,08%) foram soropositivos para o parvovírus canino [92,25; 99,91].

A distribuição espacial destes resultados está ilustrada na figura 4.

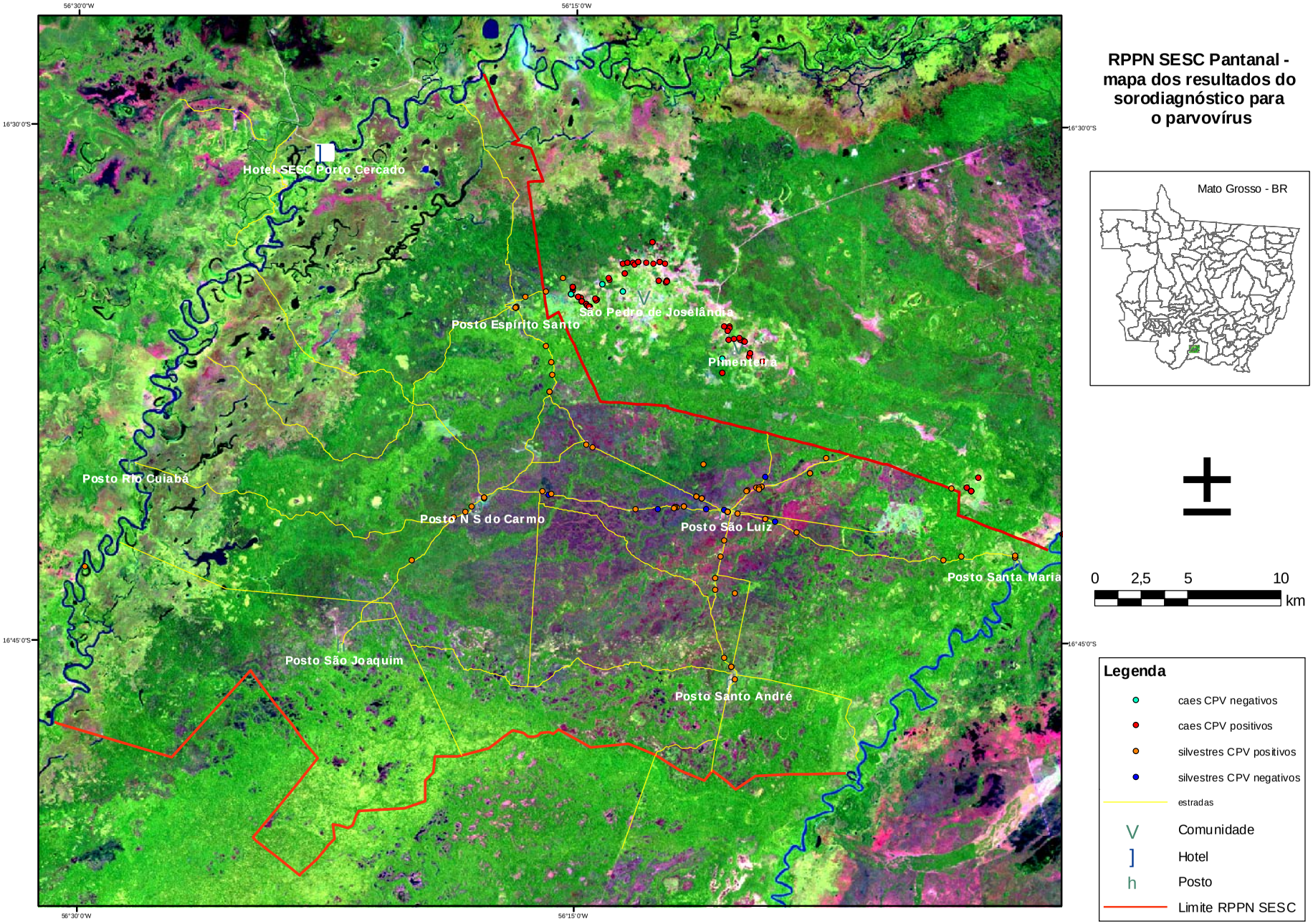

Figura 4 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para o Parvovírus

4.5.3 Detecção de anticorpos anti-vírus rábico

Os resultados do SFIMT para as amostras dos carnívoros selvagens para a titulação dos anticorpos anti-vírus rábico estão representados na tabela 4.

A freqüência de ocorrência de carnívoros selvagens positivos para a presença de anticorpos contra o vírus da raiva foi de 5,26% [0,13; 10,40].

Tabela 4 - Lista das espécies de carnívoros selvagens testadas para a presença de anticorpos contra o vírus da raiva, variação dos títulos encontrados, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie

Espécie	**Variação dos títulos**	**Positivos**	**Testados**	**% Positivos**
Cerdocyon thous	0 – 0,20 UI/mL	1	43	2,33
Chrysocyon brachyurus	< 0,07 UI/mL	0	8	0
Speothos venaticus	1,60 UI/mL	1	1	100
Procyon cancrivorous	0 – 0,27 UI/mL	1	13	7,69
Puma concolor	0 – 0,10 UI/mL	1	7	14,29
Leopardus pardalis	< 0,07 UI/mL	0	4	0
TOTAL		4	76	5,26

A média da distância do local de captura dos carnívoros selvagens considerados positivos para a exposição ao vírus da raiva foi de 1752,5 metros, enquanto a média dos negativos foi de 4140 metros. A diferença entre as médias, de 2387,5 metros, não foi considerada estatisticamente significativa através do teste U de Mann-Whitney (p = 0,075).

Em relação aos cães domésticos, 27 foram considerados positivos (26,47%) dentre 102 animais testados [17,76; 35,58].

A distribuição espacial destes resultados está ilustrada na figura 5.

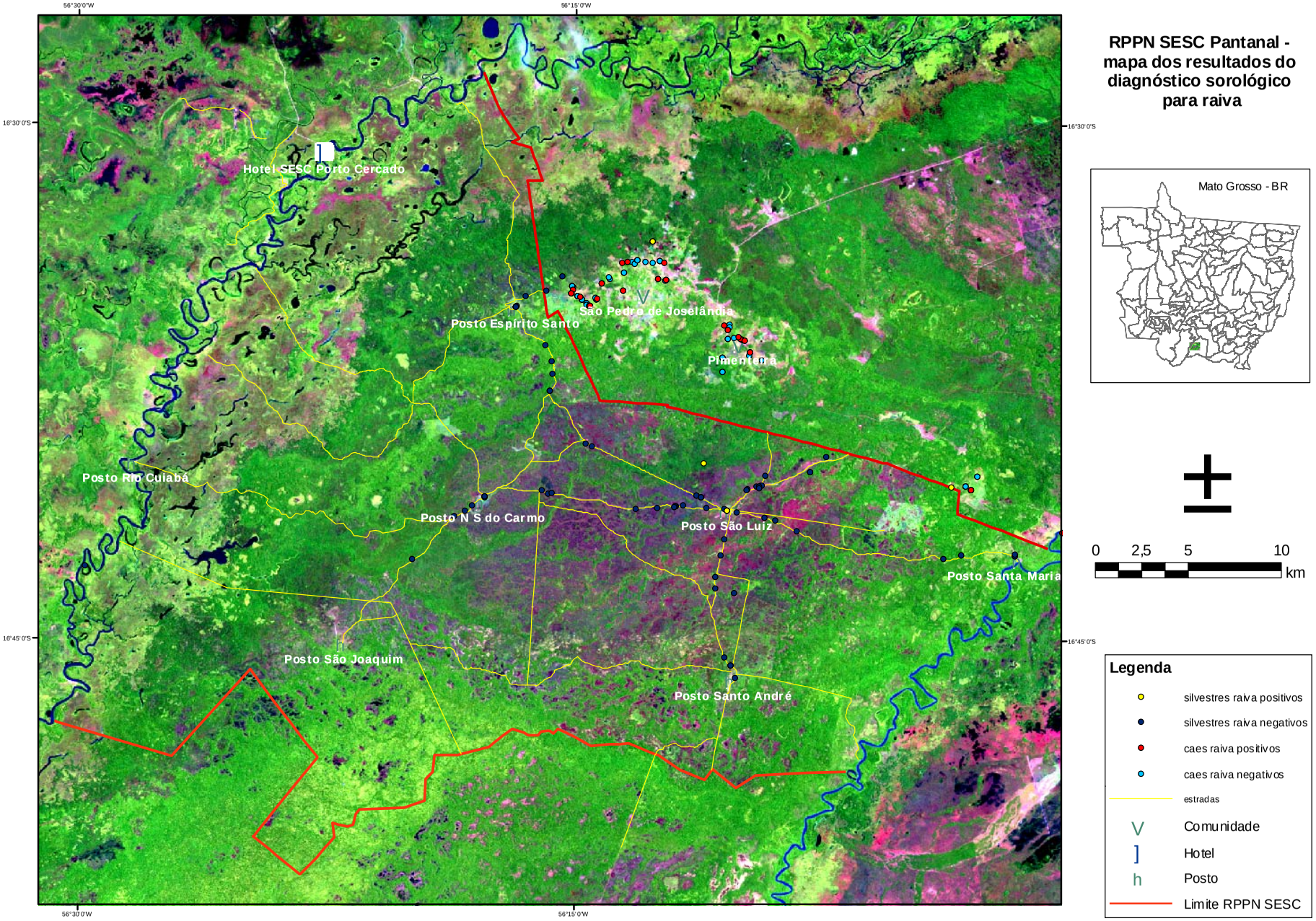

Figura 5 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para raiva

4.5.4. Detecção de *Leishmania* spp

Foram encontrados sete carnívoros selvagens positivos para a presença de *Leishmania* spp. dentre os 16 testados (4/9 *C. thous*, 1/4 *P. cancrivorous*, 1/2 *C. brachyurus*, 1/1 *L. pardalis*), resultando em uma freqüência de 43,75% [16,45; 71,05].

A média da distância do local de captura dos carnívoros selvagens considerados positivos para a exposição à *Leishmania* spp. foi de 3295,43 metros, enquanto a média dos negativos foi de 4005 metros. A diferença entre as médias, de 709,57 metros, não foi considerada estatisticamente significativa através do teste U de Mann-Whitney (p = 0,125).

Entre os cães domésticos, 20 foram positivos de 70 amostrados (28,57%) [17,72; 39,42].

A distribuição espacial destes resultados está ilustrada na figura 6.

A determinação das espécies de leishmânia detectadas identificou que todas as amostras pertencem ao sub-gênero *Viannia*, sendo que as duas amostras (uma de cão doméstico e uma de *C. thous*) para as quais foi possível determinar a espécie, foram identificadas como *Leishmania (V.) braziliensis.*

4.5.5 Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

Os resultados do MAT para as amostras dos carnívoros selvagens para a titulação dos anticorpos anti-*Leptospira* spp. estão representados na tabela 5.

A freqüência de carnívoros selvagens positivos para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi de 42,67% [31,21; 54,12].

Em relação aos cães domésticos, 18 foram considerados positivos (17,48%) dentre 103 animais testados [10,02; 24,93]. As variantes sorológicas mais prováveis foram: *pyrogenes* (8 animais), *autumnalis* (3), *hebdomadis* (2), *canícola* (2), *wolfii* (1), *icterohaemorrhagiae* (1), *hardjo* (1) e *sentot* (1).

Para os eqüinos utilizados na RPPN, 20 foram positivos entre 27 testados, resultando em uma freqüência de 74,07% [53,72; 88,89]. As variantes sorológicas mais prováveis foram: *icterohaemorrhagiae* (5), *autumnalis* (4), *bratislava* (3), *patoc* (3), *hebdomadis* (2), *pomona* (1), *pyrogenes* (1) e *castellonis* (1).

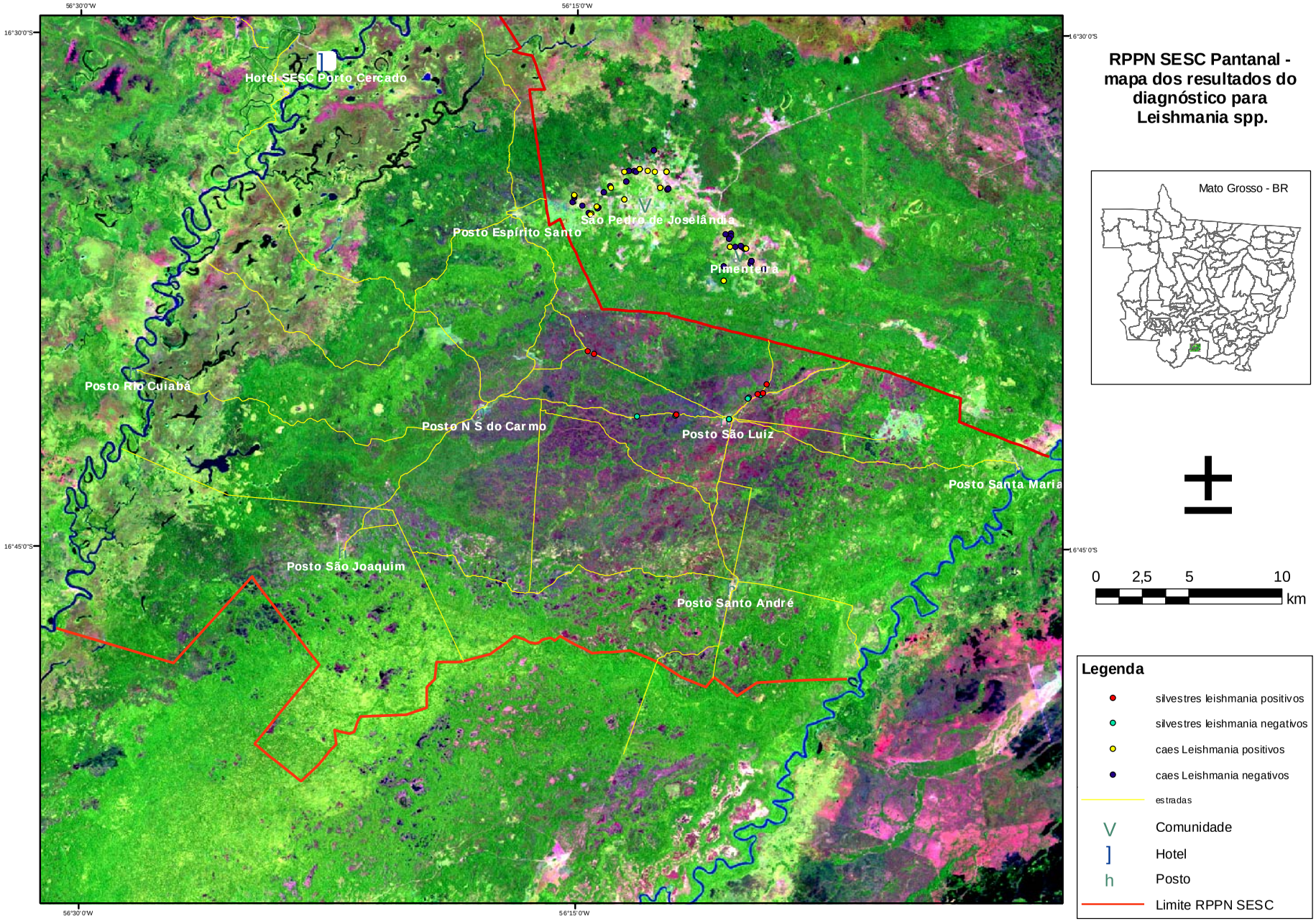

Figura 6 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos para *Leishmania* spp

Tabela 5 - Lista das espécies de carnívoros selvagens testados para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp., variação dos títulos encontrados, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados, porcentagem de animais positivos por espécie e variantes sorológicas mais prováveis

Espécie	**Variação dos títulos**	**Positivos**	**Testados**	**% Positivos**	**Variantes Sorológicas mais prováveis**
Cerdocyon thous	0 - 3200	17	43	39,53	*autumnalis* (6), *canícola* (5), *pyrogenes* (4), *pomona* (1), *australis* (1)
Chrysocyon brachyurus	0 - 800	3	8	37,5	*canícola* (1), *pyrogenes* (1), *autumnalis* (1)
Procyon cancrivorous	0 - 1600	6	12	50	*canícola* (2), *pomona* (2), *pyrogenes* (2)
Puma concolor	0 - 1600	2	7	28,57	*autumnalis* (1), *bratislava* (1)
Leopardus pardalis	0 - 800	3	4	75	*canícola* (1), *pomona* (1), *pyrogenes* (1)
Speothos venaticus	800	1	1	100	*autumnalis, pomona*
TOTAL		32	75	42,67	*canícola* (9), *pyrogenes* (8), *autumnalis* (8), *pomona* (4), *australis* (1), *bratislava* (1)

A distribuição espacial destes resultados está ilustrada na figura 7.

A média da distância do local de captura dos carnívoros selvagens considerados positivos para a exposição a *Leptospira* spp. foi de 4781,91 metros, enquanto a média dos negativos foi de 3440,21 metros. A diferença entre as médias, de 1341,7 metros, foi considerada estatisticamente significativa através do teste U de Mann-Whitney ($p = 0,012$).

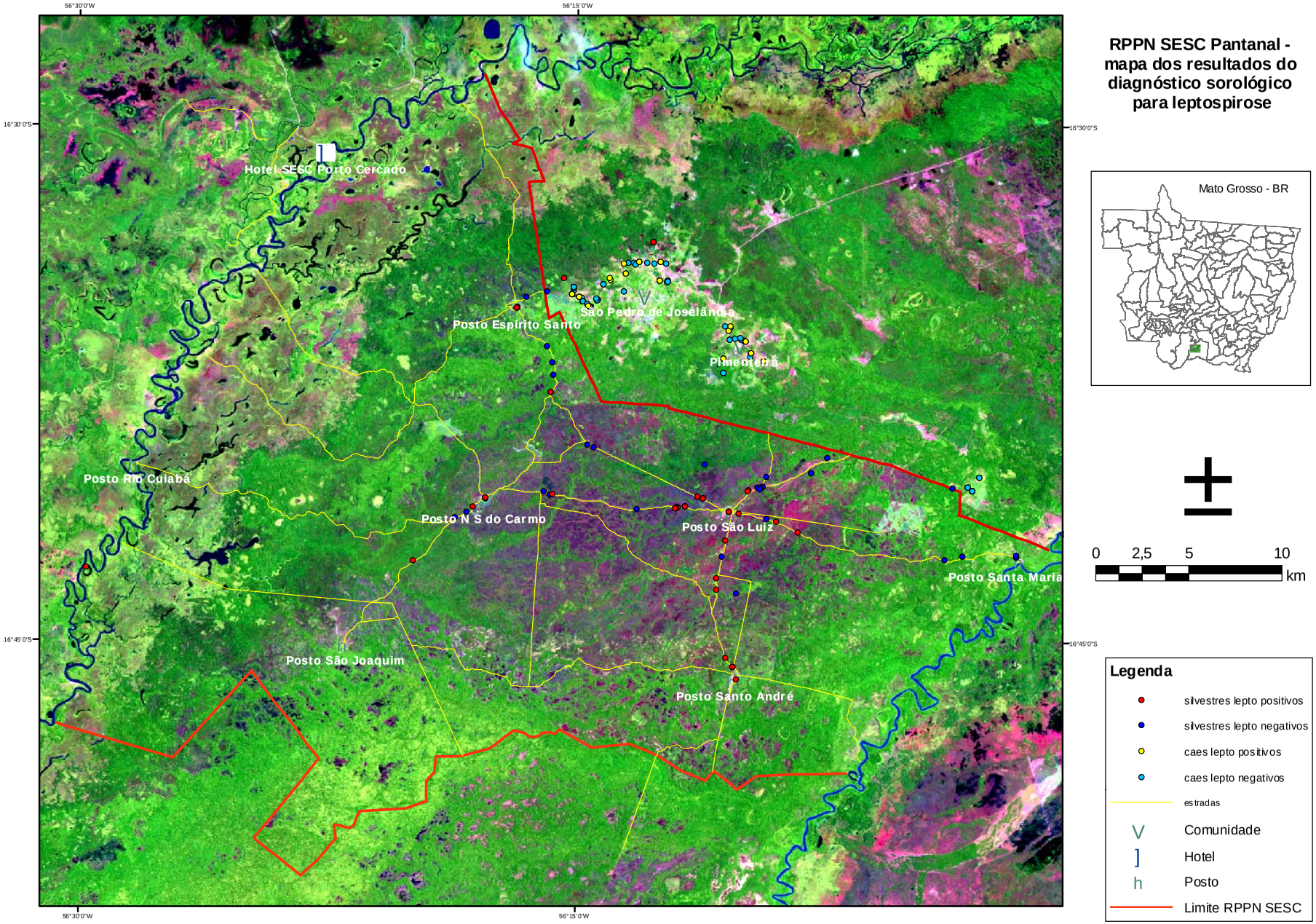

Figura 7 – Local de amostragem dos carnívoros selvagens e cães domésticos positivos e negativos à sorologia para *Leptospira* spp

5 DISCUSSÃO

Nesta seção são discutidos os resultados obtidos para a exposição de carnívoros selvagens e animais domésticos ao vírus da cinomose, parvovírus, vírus da raiva, *Leishmania* spp e *Leptospira* spp.

5.1 VÍRUS DA CINOMOSE

Os resultados obtidos indicam que os carnívoros selvagens foram expostos ao vírus da cinomose em algum momento de suas vidas. Adicionalmente, a freqüência de cães domésticos positivos na sorologia foi bastante elevada. Por tratar-se de exames sorológicos não podemos afirmar que o agente estivesse presente no organismo dos animais no momento da captura. Também não podemos classificar os animais positivos à sorologia como animais doentes. Inclusive, ao exame clínico, no momento da amostragem, nenhum dos carnívoros selvagens apresentava sinais clínicos característicos da cinomose. Os cães domésticos amostrados também não apresentavam sintomas da doença. No entanto, a presença de animais positivos à sorologia sugere que o agente está presente na região.

Este é o primeiro relato de exposição de cachorros-do-mato, guaxinins, onças-pardas e jaguatiricas de vida livre ao CDV.

A cinomose é uma doença comum em cães domésticos. Durante epizootias da doença que causaram mortalidade de carnívoros selvagens na África, os cães foram identificados como sendo a origem mais provável do agente (CLEAVELAND et al., 2000). Provavelmente, no caso dos carnívoros da RPPN SESC Pantanal, a transmissão deve ter ocorrido dos cães domésticos para os carnívoros selvagens. A maior porcentagem de animais positivos entre os domésticos reforça esta idéia: os cães estariam mantendo o vírus circulante em sua população, como é relativamente comum em populações de cães domésticos, e estariam transmitindo o agente através do contato com os carnívoros selvagens.

A média das distâncias dos carnívoros selvagens capturados considerados negativos à exposição ao vírus foi superior à média dos positivos, o que poderia sugerir uma maior chance de exposição para animais capturados em locais mais próximos da divisa da RPPN. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. Este resultado pode ter sido

influenciado pelo número de animais silvestres amostrados, que apesar de ter sido relativamente alto em comparação com outros estudos envolvendo amostragem de carnívoros selvagens, parece não ter sido estatisticamente suficiente. Outra alternativa que possibilita explicar a ausência de diferença estatística é que o agente esteja sendo mantido e transmitido entre os carnívoros selvagens. Desta forma sua ocorrência estaria de fato distribuída de forma mais uniforme na RPPN.

A presença do vírus da cinomose nos carnívoros selvagens na região pode estar causando um declínio na população de carnívoros selvagens da RPPN através da mortalidade de indivíduos adultos em idade reprodutiva (LEIGHTON et al., 1988), ou da mortalidade de filhotes com idade de três a seis meses, período de queda dos anticorpos maternos (WILLIAMS, 2001), ou de ambos os fatores associados.

Pelo menos uma espécie tem demonstrado indícios de declínio populacional. Comparando os anos de 2002 e 2003 com os de 2005 e 2006, observamos uma diminuição nos vestígios de lobos-guarás na RPPN. Também pudemos notar uma diminuição acentuada no sucesso de captura de indivíduos desta espécie. Outro fato ocorrido que reforça esta possibilidade foi o óbito de uma ninhada de filhotes de lobo-guará em 2003. Na época, acompanhamos os 3 filhotes desta ninhada até os 3 meses de idade, quando eles morreram sem que pudéssemos determinar a causa. No momento em que suas carcaças foram recuperadas, já estavam em estado avançado de autólise e não possibilitavam qualquer diagnóstico de acometimento por agente infeccioso. No entanto, também não havia qualquer sinal de predação por outros animais.

A percepção do aumento da mortalidade em carnívoros da fauna brasileira é dificultada em nosso país pelas características dos nossos biomas. Isto é particularmente verdadeiro para o Pantanal, que é formado por um mosaico de vegetação composto por matas e campos, onde mesmo os últimos são consideravelmente densos, dificultando a observação direta sobre os animais. Na RPPN SESC Pantanal este fato é ainda mais acentuado do que em outras áreas do Pantanal, pois é uma área protegida e a administração da reserva mantém, nos períodos de seca, uma brigada de incêndio que tem como objetivo diminuir os impactos dos incêndios na região, aumentando assim a densidade da vegetação. Em contraposição a esta situação podemos citar o exemplo da África, onde o tipo de vegetação predominante é a savana, que, por ser bastante aberta, permite que os pesquisadores possam observar a fauna, e os eventos que ocorrem com ela, com maior facilidade.

A freqüência relativamente elevada de animais selvagens positivos para anticorpos anti-CDV é, de certa forma, surpreendente, devido às características ecológicas da maioria

das espécies de carnívoros brasileiros, principalmente considerando o fato de que indivíduos capturados em locais mais centrais da RPPN também apresentaram uma proporção importante de positivos. Os carnívoros da nossa fauna são geralmente solitários, territorialistas e ocorrem em baixas densidades populacionais. Estas características são desfavoráveis ao contato direto entre os indivíduos, que seria um fator predisponente para a transmissão deste vírus. Isto é acentuado se considerarmos que indivíduos capturados em áreas distantes do limite norte da RPPN, pertencentes a espécies com área de vida pequena, portanto com poucas chances de contato com cães domésticos, foram considerados positivos. No entanto, podemos citar algumas exceções importantes entre os carnívoros da nossa fauna. Os cachorros-do-mato, por exemplo, vivem em densidades mais altas na região, haja vista a grande quantidade de indivíduos capturados durante o estudo. Eles também costumam viver em casais, ou até mesmo em pequenos grupos familiares, formados pelos pais e pelos filhotes de sua última prole, até o nascimento de outra ninhada, ou seja, por cerca de um ano. Desta forma, é possível inferir que esta espécie possa manter o agente circulando em sua população no meio silvestre, com episódios eventuais de transmissão para indivíduos de outras espécies. Outra exceção importante são os cachorros-vinagres. Eles vivem em grupos familiares que podem chegar a 12 indivíduos. Mas esta espécie, ainda que ocorra na região, não é tão abundante.

Para outras espécies que tem área de vida maior, como é o caso de onças-pardas e lobos-guarás, é maior a chance de contato com cães domésticos, ainda que alguns animais tenham sido capturados em locais bastante distantes das comunidades localizadas ao norte da reserva.

O provável contato entre cachorros-do-mato que utilizam as áreas próximas aos aglomerados de casas dos moradores da comunidade e cães domésticos é compatível com os resultados de Courtenay, Quinnel e Chalmers (2001). Neste estudo, 22 cachorros-do-mato dentre os 24 aparelhados com rádios-colares visitaram vilas localizadas na região amazônica, no estado do Maranhão, demonstrando o alto potencial de contato entre os domésticos e selvagens.

As medidas voltadas ao controle da circulação do CDV na região passíveis de serem implementadas no curto prazo são principalmente aquelas voltadas ao controle do agente nos cães domésticos. Estas são discutidas de forma mais aprofundada na próxima seção.

5.2 PARVOVÍRUS

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os cães domésticos e os carnívoros selvagens foram expostos ao parvovírus canino ou a um agente bastante semelhante. Anticorpos anti-CPV já haviam sido detectados anteriormente em lobos-guarás e cachorros-do-mato de vida livre (CURI, 2005; DEEM; EMMONS, 2005; FIORELLO et al., 2007). No entanto, para cachorros-vinagres, onças-pardas, jaguatiricas e guaxinins de vida livre, indícios de exposição ao CPV são inéditos. No caso das onças-pardas e jaguatiricas, anticorpos para o parvovírus felino foram detectados em animais de vida livre capturados no Brasil (FILONI et al., 2006), inclusive no Pantanal, no caso das onças-pardas.

Inicialmente, é importante que sejam esclarecidos os critérios utilizados para a determinação do ponto de corte utilizado no presente estudo no diagnóstico sorológico para o parvovírus, uma vez que este variou consideravelmente entre os diferentes estudos consultados que utilizaram a técnica de HI para detecção de anticorpos para o agente, ainda que todos eles tenham citado Carmichael, Joubert e Pollock (1980) como referência para a técnica. A maioria dos autores considerou como positivos animais para os quais a amostra de soro na diluição de 1:10 foi capaz de inibir a aglutinação das hemácias de suínos (COURTENAY; QUINNEL; CHALMERS, 2001; DEEM; EMMONS, 2005; FIORELLO et al., 2004; FIORELLO et al., 2007). Curi (2005) adotou a diluição de 1:20 como ponto de corte. Outros artigos utilizam pontos de corte consideravelmente distantes destes anteriores: Mech e Goyal (1993) consideraram a diluição de 1:320 e Alexander et al. (1994), 1:256. Diluições muito baixas utilizadas como ponto de corte podem ocasionar resultados falso-positivos, uma vez que, no caso da utilização da técnica de HI para a sorologia para os parvovírus, inibidores inespecíficos da hemaglutinação podem estar presentes no soro, podendo influenciar no resultado (CARMICHAEL; JOUBERT; POLLOCK, 1980). Por outro lado, a utilização de diluições muito altas pode levar a um número elevado de resultados falso-negativos, já que animais que de fato foram expostos ao agente podem eventualmente ser considerados negativos. Camichael, Joubert e Pollock (1980), ao descrever a técnica, mencionam que os inibidores inespecíficos da hemaglutinação costumam estar presentes no soro apenas até a diluição de 1:80. Desta forma, decidimos utilizar esta diluição como ponto de corte para considerar indivíduos positivos para a exposição, considerando ainda os animais que apresentaram reação entre as diluições 1:10 e 1:40 como suspeitos.

Conforme citado anteriormente na descrição da sorologia para o parvovírus, o antígeno utilizado foi o CPV. No entanto, não é possível afirmar que os anticorpos presentes nas amostras que apresentaram reação positiva ao HI foram produzidos em reação a exposição exclusivamente a esta espécie de parvovírus. Outras espécies de parvovírus, como o FPV ou o MEV, podem estar presentes na região e podem levar a produção de anticorpos que reajam com o antígeno utilizado no teste. Apesar das diferentes espécies de parvovírus terem sido batizadas de acordo com os hospedeiros nos quais elas ocorrem mais comumente, esta nomenclatura pode causar confusão no entendimento de sua epidemiologia. O FPV, por exemplo, pode eventualmente infectar canídeos, assim como o CPV pode infectar felídeos (BARKER; PARRISH, 2001). Para se ter certeza de quais parvovírus exatamente estão presentes na população de carnívoros da região, seria necessário caracterizar geneticamente o agente através de métodos moleculares, ou conseguir o seu isolamento, e então caracterizá-lo biológica e antigenicamente (BARKER; PARRISH, 2001). No entanto, é importante citarmos que seis onças-pardas para as quais havia sido realizado o diagnóstico sorológico para o FPV com resultado negativo (FILONI et al., 2006), tiveram anticorpos anti-CPV detectados no presente estudo.

O parvovirus é um agente relativamente resistente no ambiente (GORDON; ANGRICK, 1986) e quando introduzido em uma região tende a persistir. Desta forma, levando em consideração os resultados dos cães domésticos, indicando a circulação do agente na população destes animais nas comunidades humanas localizadas no entorno da RPPN, o encontro de títulos de anticorpos para o parvovírus não é um fato surpreendente. Adicionalmente, os resultados positivos dos carnívoros por nós capturados para a exposição ao vírus da cinomose, agente lábil no ambiente, que requer contato direto para sua transmissão, demonstram uma alta probabilidade de que exista um contato relativamente próximo entre os cães domésticos e carnívoros selvagens na região e, possivelmente, entre as diferentes espécies de carnívoros que ocorrem nesta área. No entanto, a alta freqüência de animais selvagens positivos para a presença de anticorpos anti-CPV é um fato preocupante no que diz respeito à sobrevivência da população de carnívoros em médio e longo prazo.

A média das distâncias dos carnívoros selvagens capturados considerados positivos à exposição ao vírus foi superior à média dos negativos. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa e, portanto, não podemos descartar que esta diferença tenha ocorrido devido a uma variabilidade aleatória da amostra. Este resultado pode estar relacionado ä característica dos parvovírus de serem resistentes no ambiente (GORDON; ANGRICK, 1986) e, por isto, não precisarem de contato direto entre indivíduos para a sua

transmissão. Também pode ter sido influenciado pelo número de animais silvestres amostrados, que apesar de ter sido relativamente alto em comparação com outros estudos envolvendo amostragem de carnívoros selvagens, pode não ter sido estatisticamente suficiente.

Tanto carnívoros selvagens como cães domésticos não apresentavam sinais clínicos da parvovirose no momento da amostragem. Isto pode estar relacionado à característica dos parvovírus de geralmente causarem doença em filhotes, enquanto adultos infectados muitas vezes apresentam apenas sintomas brandos ou mesmo infecção sub-clínica (PARRISH; OLIVER; MCNIVEN, 1982). A grande maioria dos animais capturados e dos cães amostrados eram adultos, com exceção de alguns animais com idade próxima a um ano e de um filhote de lobo-guará, com aproximadamente 4 meses de idade. Também é importante lembrarmos que o exame clínico realizado nos carnívoros capturados foi pontual e superficial, baseado exclusivamente nas condições físicas dos animais ao momento da captura. Infelizmente não dispúnhamos de recursos financeiros para a aquisição de rádios-transmissores com os quais pudéssemos aparelhar os indivíduos capturados, para que fosse realizado um acompanhamento dos animais após as capturas, no sentido de observar se estes animais, em algum momento, apresentariam sintomas da parvovirose ou de outras doenças. O hemograma completo, que poderia fornecer informações complementares para a avaliação da saúde dos animais, não pôde ser realizado em virtude das dificuldades logísticas impostas pela localização da RPPN. O material para a realização de um hemograma deve chegar ao laboratório em no máximo 24 horas, algo impossível nas nossas condições.

O possível incremento na mortalidade de filhotes é citado em diversos artigos como o principal problema que pode ser causado pelo CPV em populações de carnívoros selvagens. Em uma população de lobos (*Canis lupus*) de Minnesota (EUA) amostrada e monitorada entre 1979 e 1990, percebeu-se que, em anos onde a prevalência para o CPV dos animais amostrados era mais alta, a proporção de filhotes capturados era menor e, no ano subseqüente, observava-se uma diminuição na taxa de aumento da população (MECH; GOYAL, 1993). Outro estudo com a mesma espécie realizado em Montana (EUA), observou que nas matilhas de lobos onde ocorreu mortalidade de filhotes, os títulos dos indivíduos adultos amostrados eram altos para anticorpos para o CPV e para o CDV, enquanto nas matilhas que conseguiram criar seus filhotes, os títulos de anticorpos para estes agentes eram baixos (JOHNSON; BOYD; PLETSCHER, 1994). Para o cachorro-selvagem-africano, Creel et al. (1997) observaram que o número de filhotes nas ninhadas era menor nas regiões em que a prevalência para anticorpos para o CPV era mais alta.

O aparente declínio na população de lobos-guarás na RPPN SESC Pantanal nos últimos anos, assim como a mortalidade de filhotes da espécie observada, citados anteriormente, também podem estar relacionados à presença do parvovírus na região.

Segundo Mech e Goyal (1993), populações bem estabelecidas de carnívoros selvagens podem resistir à circulação do parvovírus. No entanto, populações isoladas e com um número reduzido de indivíduos podem ter sua sobrevivência ameaçada. Este pode ser o caso da população de lobos-guarás da RPPN. A região da reserva é considerada limite da distribuição geográfica da espécie. As áreas localizadas ao norte e nordeste da RPPN, que poderiam funcionar como uma conexão da população residente com as demais populações de lobos, sofre uma acentuada pressão antrópica. Esta possível descontinuidade geográfica da espécie pode estar reduzindo a possibilidade da população em perigo ser reforçada pela migração de indivíduos jovens provenientes das populações localizadas ao norte da RPPN.

As medidas de controle a serem implementadas para o controle da transmissão do parvovírus serão discutidas juntamente com a de outros agentes na próxima seção.

5.3 VÍRUS DA RAIVA

Este é o primeiro relato de exposição de um guaxinim, uma onça-parda e um cachorro-vinagre de vida livre ao vírus da raiva.

O primeiro ponto a ser discutido com relação ao diagnóstico da raiva é a utilização da titulação de anticorpos no soro. A produção de níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes evidencia ocorrência de resposta imune, que pode ser em decorrência de exposição natural ou de vacinação (FEKADU, 1991). No entanto, anticorpos raramente são encontrados antes da fase terminal da doença (HATTWICK; GREGG, 1975; FEKADU, 1991), já que a sua produção ocorre somente após a infecção disseminada no sistema nervoso central (MURPHY, 1977). Portanto, a detecção de anticorpos neutralizantes no soro pode não ser possível em uma infecção recente (FEKADU, 1991). O teste sorológico pode ser utilizado para avaliação da efetividade vacinal, como ferramenta diagnóstica e em estudos epidemiológicos (SMITH, 1991), sempre tendo em mente que o número de animais positivos pode não corresponder exatamente ao número de animais infectados no momento da amostragem.

Outra questão importante é o ponto de corte utilizado para determinar se um animal é positivo ou negativo. A maioria dos trabalhos que realizaram levantamentos sorológicos em populações de animais selvagens de vida livre para diagnóstico de exposição ao vírus rábico considerou como ponto de corte aquele recomendado pela Organização Mundial da Saúde, ou seja, títulos iguais ou maiores do que 0,50 UI/mL (GASCOYNE et al., 1993; ALEXANDER et al., 1994; ALMEIDA et al., 2001; EAST et al., 2001; DEEM et al., 2004). Entretanto, esta recomendação visa avaliar a resposta dos animais ou pessoas à vacinação e não inferir sobre exposição de indivíduos não-vacinados quando em contato com o vírus. Assim, a presença de anticorpos neutralizantes, mesmo que em níveis mais baixos, pode significar contato prévio com antígeno viral, como foi demonstrado por Hill, Beran e Clark (1992), ao combinarem três tipos de testes sorológicos em uma população de guaxinim norte-americano (*Procyon lotor*).

Os resultados positivos na sorologia para a raiva de carnívoros de vida livre obtidos neste estudo são bastante significativo, principalmente por tratar-se seguramente de animais que nunca foram vacinados. Dos 4 animais soropositivos, 3 (um cachorro-do-mato, um guaxinim e uma onça parda) apresentaram baixos títulos de anticorpos neutralizantes, variando entre 0,10 a 0,27 UI/ml, enquanto um cachorro-vinagre apresentou título considerado alto (1,6 UI/ml). Todos os indivíduos aparentavam estar saudáveis no momento da captura, quando foi realizado exame clínico. Nenhum deles apresentava nenhum dos sintomas característicos da raiva ou de qualquer outro agravo.

Considerando que os carnívoros selvagens positivos não foram vacinados, a única explicação para a conversão sorológica destes animais seria a exposição natural ao vírus da raiva. Neste caso, por se tratar de uma doença com alta letalidade (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001), seria esperado que estes indivíduos desenvolvessem os sintomas e viessem a óbito em um curto período de tempo. Infelizmente estes animais não foram monitorados após a sua soltura. Desta forma, não podemos determinar se desenvolveram os sintomas da doença. Na realidade, o cachorro-vinagre foi aparelhado com um rádio-colar para monitoramento posterior. Mas infelizmente o aparelho, apesar de ter sido testado previamente, apresentou problemas técnicos logo após a soltura do animal, impossibilitando qualquer acompanhamento posterior.

A existência de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva em animais sadios já foi relatada em diversas espécies de carnívoros selvagens, como o cangambá (*Mephitis mephitis*) (CAREY; MCLEAN, 1983, ROSATTE; GUNSON, 1984), a hiena (*Crocuta crocuta*) (EAST et al., 2001), o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) (DEEM;

DAVIS; PACHECO, 2004), o cachorro selvagem africano (*Lycaon pictus*) (GASCOYNE et al.,1993), o chacal (*Canis mesomelas, C. adustus e C. aureus*) (ALEXANDER et al., 1994) e o guaxinim norte-americano (*Procyon lotor*) (HILL; BERAN; CLARK, 1992), além de alguns primatas (ALMEIDA et al., 2001). Além da possibilidade dos carnívoros capturados no SESC Pantanal que apresentaram título detectável de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva estarem no período de incubação, em uma fase muito próxima do momento de desenvolvimento de sintomas, outras explicações possíveis para a detecção de anticorpos nestes animais podem estar relacionadas ao desenvolvimento de infecção não-letal (GASCOYNE et al., 1993), podendo consistir em infecção sub-clínica, ingestão ou inalação de material infectado (CHARLTON, 1988), ou infecção com variantes virais que normalmente ocorrem e causam doença em outras espécies de hospedeiro (ROSATTE; GUNSON, 1984). A única forma de se certificar que um animal se recuperou de uma infecção pelo vírus da raiva é através da mensuração de anticorpos neutralizantes no líquido cérebro-espinhal, uma vez que tais anticorpos apenas são encontrados após infecção do sistema nervoso central (FEKADU, 1991).

Animais infectados natural ou experimentalmente com o vírus da raiva podem sobreviver, com ou sem a presença de seqüelas neurológicas (NIEZGODA et al., 1997), ainda que a freqüência de animais que sobrevivem seja bem menor do que aquela dos que evoluem para o óbito (FEKADU, 1991). A infecção pelo vírus nem sempre é seguida do surgimento de sinais clínicos, podendo ser inaparente (KAPLAN, 1985). Desta forma, a exposição viral pode levar ou não a uma infecção produtiva, ou seja, com o desenvolvimento de sinais clínicos, que pode ou não produzir resposta imune detectável (NIEZGODA; HANLON; RUPPRECHT, 1993). A imunidade natural ao vírus rábico depende de diversos fatores como a espécie acometida e a variante viral envolvida, sendo que alguns animais permanecem clinicamente normais e mesmo assim conseguem eliminar o vírus, podendo infectar e matar outros indivíduos, como já foi observado em morcegos e cães (FEKADU et al., 1982; CAREY; MCLEAN, 1983; FEKADU, 1993). Seguindo este raciocínio, East et al. (2001) propuseram que algumas espécies poderiam agir como "portadores-sãos" da raiva, agindo como perpetuadores do agente no ambiente sem, no entanto, desenvolver os sintomas da doença. No estudo citado foi realizado um levantamento sorológico em hienas (*Crocuta crocuta*) de vida livre na África e vários indivíduos foram positivos à sorologia. Dentre os soropositivos, apesar de não se ter isolado o vírus da saliva, demonstrou-se a presença de RNA viral pela PCR em 45,5% dos indivíduos. Vale observar que a prova de PCR tem alta sensibilidade, possibilitando a detecção até mesmo de fragmentos do vírus que circulam

dentro de um organismo. Os animais amostrados foram monitorados durante vários anos através de rádio-telemetria e avistamento direto, mas nenhum desenvolveu sintomas ou morreu em decorrência da raiva. No entanto, a teoria de que indivíduos da espécie poderiam se comportar como portadores-sãos do agente ainda necessita de comprovação científica.

A via de transmissão mais comum do vírus rábico é por meio da saliva contaminada, inoculada através de mordedura de animal infectado em fase de eliminação do agente. Apesar de menos freqüente, a passagem através de membranas mucosas íntegras permite que o animal entre em contato com o vírus através de vias diferentes daquela mais tradicional, como, por exemplo, pela via oral (RUPPRECHT; STÖHR; MEREDITH, 2001). Alguns estudos comprovaram a possibilidade de transmissão do vírus através da ingestão de carcaças contaminadas (BELL; MOORE, 1971; RAMSDEN; JOHNSTON, 1975). Este é inclusive o princípio que embasou o desenvolvimento da vacina oral, que vêm sendo utilizada com sucesso no controle da raiva em carnívoros silvestres em países da Europa, no Canadá e nos EUA (CROSS; BUDDLE; ALDWELL, 2007). O potencial dessa forma de infecção na epidemiologia da doença tem sido relativamente pouco explorado. Embora possa ocorrer infecção com desenvolvimento de doença letal após ingestão de carcaças contaminadas, é possível que os animais respondam apenas com a produção de anticorpos, capazes de protegê-los contra uma posterior inoculação. Tal variação pode ser atribuída a diferenças na idade, resposta imune individual, carga e variante viral ingerida, apesar de não estabelecida a real importância de cada fator (RAMSDEN; JOHNSTON, 1975). Diante do exposto, a possibilidade de os títulos encontrados nos carnívoros neste estudo estarem relacionados com uma baixa exposição viral ou à ingestão de material contaminado com baixa carga viral ou mesmo com fragmentos do vírus é bastante considerável. De forma semelhante, os animais soropositivos no estudo das hienas também podem ter sido expostos ao vírus rábico desta mesma maneira.

Rosatte e Gunson (1984) encontraram 18 de 198 cangambás amostrados com títulos detectáveis de anticorpos anti-rábicos em regiões consideradas livres de ocorrência de raiva nesta espécie. No entanto, nestas mesmas áreas havia registros de raiva em quirópteros. Por outro lado, em uma área de epizootia de raiva em cangambá no Arkansas (EUA), Ferguson e Heidt (1981) encontraram apenas de 1 de 53 cangambás amostrados, positivo à sorologia. Em alguns casos, uma variante do vírus da raiva adaptada a uma determinada espécie pode se mostrar menos patogênica e mais imunogênica para espécies filogeneticamente mais distantes, o que pode resultar em uma maior proporção de indivíduos destas espécies com título de anticorpos anti-rábicos detectáveis nestas regiões (ROSATTE; GUNSON, 1984). No

Brasil, a variante do vírus da raiva de morcegos hematófagos ocorre com uma freqüência relativamente alta nas diferentes regiões do país. É possível que os carnívoros selvagens da região da RPPN SESC Pantanal estejam se infectando com esta variante.

Um dos carnívoros selvagens positivos, por sinal aquele que apresentou o mais alto título de anticorpos, era um cachorro-vinagre. Este animal foi capturado na região da comunidade de São Pedro de Joselândia, portanto, com uma chance significativa de contato com animais domésticos. A participação de canídeos silvestres na epidemiologia da raiva no Brasil vem recebendo uma atenção cada vez maior nos últimos anos (CARNIELI et al., 2004, 2006, 2008). No entanto, o vírus da raiva ou indícios de exposição a ele, como a presença de seus anticorpos neutralizantes, nunca tinham sido registrados anteriormente nesta espécie, que é considerada como "vulnerável" pelas autoridades brasileiras (BRASIL, 2003) e pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2004).

Outro carnívoro selvagem considerado positivo, um cachorro-do-mato, também foi capturado em um local onde a chance de contato com animais domésticos é bastante elevada, a divisa da RPPN.

A média das distâncias dos carnívoros selvagens capturados considerados negativos para a exposição ao vírus da raiva foi superior à média dos positivos. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. Este resultado deve ter sido influenciado pelo número de animais silvestres amostrados, especialmente os positivos, que foram apenas 4.

Os resultados positivos na sorologia contra a raiva dos cães domésticos também são bastante importantes. Dezenove dos 27 cães soropositivos já haviam sido vacinados contra a raiva no momento da, segundo informações fornecidas por seus proprietários. A presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva era esperada para estes indivíduos. No entanto, no caso daqueles que não foram vacinados, devemos considerar basicamente as mesmas possibilidades já levantadas para os carnívoros selvagens considerados positivos, restando ainda a possibilidade dos proprietários terem fornecido informações imprecisas com relação à vacinação.

O conjunto destes resultados demonstra a presença do vírus da raiva na região. Esta informação é de grande importância para o planejamento de ações voltadas à Saúde Pública e à saúde dos animais de criação na região, como também daquelas voltadas à conservação dos carnívoros selvagens de vida livre.

5.4 *LEISHMANIA* SPP

O encontro de fragmentos de ácido nucléico de protozoários do gênero *Leishmania* em 4 espécies de carnívoros selvagens e em uma quantidade significativa de cães domésticos é um resultado bastante importante. O cachorro-do-mato já foi citado em alguns estudos como potencialmente importante na epidemiologia da *Leishmania chagasi*, devido a resultados positivos para a espécie através de diferentes métodos diagnósticos (DEANE; DEANE, 1954; ALENCAR, 1961; LAINSON et al., 1969; COURTENAY et al., 1996; COURTENAY et al., 2002a). Em relação aos lobos-guarás, Curi, Miranda e Talamoni (2006) encontraram dois indivíduos soropositivos para *Leishmania* spp. Neste mesmo estudo, cachorros-do-mato também foram positivos ao soro-diagnóstico. No entanto, para guaxinins e jaguatiricas, acreditamos que este seja o primeiro relato de exposição à *Leishmania* spp. Considerando a detecção do sub-gênero *Viannia*, e especialmente a espécie *Leishmania braziliensis*, nenhuma das espécies de carnívoros detectadas como positivas é citada na literatura como possível reservatório para o agente (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON; SHAW, 2005).

A média das distâncias dos carnívoros selvagens capturados considerados negativos à exposição a *Leishmania* spp. foi superior à média dos positivos. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. Considerando que tanto *Leishmania braziliensis* como as demais espécies pertencentes ao sub-gênero são mantidas por reservatórios silvestres, a ausência de diferença significativa era esperada. Entretanto, o resultado pode ter sido influenciado pelo número de animais silvestres amostrados.

Os animais considerados como hospedeiros de *Leishmania braziliensis* são algumas espécies de roedores silvestres, o gambá (*Didelphis marsupialis*) e, no ambiente peri-domiciliar, os animais domésticos, como cães, cavalos, jumentos e gatos (BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON; SHAW, 2005). Com base nos resultados aqui obtidos, são necessários estudos posteriores que se aprofundem na elucidação da importância dos hospedeiros silvestres aqui identificados na epidemiologia da LTA. É preciso determinar se estas espécies se comportam realmente como reservatórios importantes, agindo como fontes de infecção para os vetores, ou se são hospedeiros terminais, sem maior importância epidemiológica. Um exemplo neste sentido é o estudo realizado por Courtenay et al. (2002a). Ao expor cachorros-do-mato capturados no Maranhão (alguns deles diagnosticados

posteriormente como expostos à *Leishmania chagasi*) e cães domésticos da mesma região a espécimes do vetor criados em cativeiro, os autores observaram que os canídeos selvagens não haviam infectado os vetores, diferentemente dos domésticos. Desta forma, eles inferem que a espécie, a mais estudada dentre os canídeos selvagens com relação à exposição à *Leishmania chagasi*, não teria grande importância na transmissão do agente por sua baixa infectividade para o vetor, diferentemente do observado para os cães domésticos. Também devem ser considerados os estudos experimentais em ambiente de biotério. No entanto, o fato de algumas das espécies de carnívoros serem classificadas como ameaçadas de extinção é um entrave importante para este tipo de estudo.

A presença de *Leishmania braziliensis* na região é condizente com a distribuição geográfica considerada para o agente. Atualmente, considera-se que ele ocorre em todo o território nacional, abrangendo ainda outros países da América Latina, sendo sua fronteira ao sul a Argentina e ao norte Belize (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; LAINSON; SHAW, 2005). Também está de acordo com os resultados obtidos pelos funcionários da secretaria de Saúde do Estado do Mato Grosso em levantamento entomológico realizado na comunidade de São Pedro de Joselândia em 2007, que encontraram *Lutzomyia whitmani* (informação verbal)[1], vetor do agente em questão, como também de *Leishmania (V.) guyanensis e Leishmania (V.) shawi* (LAINSON; SHAW, 2005). Também foi encontrada uma outra espécie de flebótomo, *Lutzomyia flaviscutellata*. Este, no entanto, é vetor da *Leishmania amazonensis* (LAINSON; SHAW, 2005), que apesar de ser causadora de LTA, faz parte do sub-gênero *Leishmania*, o qual não encontramos em nosso estudo.

As principais medidas de controle da LTA são voltadas ao diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, orientações voltadas ao controle de vetores e atividades de educação em saúde (BRASIL, 2007b). Medidas voltadas ao controle de reservatórios não são indicadas. É notório que o planejamento de ações voltadas ao controle da LTA depende fortemente das características da região em questão. No caso da comunidade de São Pedro de Joselândia e adjacências, os principais aspectos a serem explorados seriam aqueles relacionados ao aperfeiçoamento da vigilância. Seria importante implementar uma busca ativa de casos, com o intuito de estimar a prevalência da doença na população humana da região. O sistema de vigilância passivo na região é bastante precário. A comunidade passou a dispor apenas recentemente de uma estrutura física que deverá ser utilizada como

[1] Informação fornecida por Rocha em Cuiabá, em 2007.

Posto de Saúde. No entanto, não há previsão para a presença de um médico para a região. O posto serviria principalmente como um ponto para atendimento inicial por meio de um assistente de enfermagem e encaminhamento, quando necessário, para as sedes de município mais próximas, Poconé ou Barão de Melgaço.

Uma característica da doença que se soma ao problema da dificuldade geográfica que a população da região enfrenta para buscar atendimento médico adequado é o fato de as lesões não causarem dor. Este fato leva as pessoas acometidas a apenas procurarem auxílio médico quando as lesões já se encontram em estado bastante avançado, o que acaba levando à diminuição do sucesso do tratamento. Desta forma, é importante que atividades de educação em saúde sejam implementadas na região, demonstrando à população as principais características das lesões decorrentes da LTA, sua evolução e seu caráter potencialmente mutilante. Também é importante evidenciar a importância de se buscar tratamento precoce para que seu sucesso seja potencializado.

Dentre as medidas voltadas aos vetores, aquelas que objetivam a proteção das pessoas, como a utilização de mosquiteiros, telagem de portas e janelas, são aquelas que provavelmente terão alguma efetividade. O controle químico e o manejo ambiental dificilmente surtiriam algum efeito, devido ao fato de a comunidade ser absolutamente rural, entremeada a áreas de mata e com matéria orgânica em abundância.

Como podemos perceber, apesar de alguns estudos já realizados com cachorros-do-mato, muito ainda necessita ser elucidado sobre o papel das diversas espécies de carnívoros selvagens na epidemiologia das leishmanioses. Por outro lado, o possível impacto das leishmanioses sobre a conservação destes animais também deve ser melhor explorado.

5.5 *LEPTOSPIRA* SPP

Este é o primeiro relato de exposição de guaxinins, lobos-guarás e jaguatiricas de vida livre a *Leptospira* spp.

A detecção de indivíduos positivos em todas as espécies de carnívoros selvagens, como também nos cães domésticos e cavalos, mostra que a cadeia epidemiológica da leptospirose é bastante complexa na região. Outros estudos envolvendo levantamentos sorológicos em animais silvestres no Pantanal também encontraram freqüências significativas de animais positivos (MATHIAS; GIRIO; DUARTE, 1999; GIRIO et al., 2004). As

características peculiares deste importante bioma brasileiro, como o fato de permanecer alagado em grande parte de sua extensão na maior parte do ano e os níveis normalmente elevados de temperatura, parecem ser bastante propícias à persistência e transmissão da *Leptospira* spp.

Os carnívoros selvagens apresentaram uma freqüência elevada de animais positivos de uma forma geral. As diferentes espécies testadas tiveram em média 42,67% de indivíduos positivos. Os eqüinos tiveram uma freqüência de positivos ainda mais alta: 74,07%. Tanto os carnívoros selvagens como os eqüinos estão de fato bastante expostos ao potencial contato com o agente. Os carnívoros precisam geralmente cobrir áreas extensas, passando freqüentemente pelas regiões alagadas para poder suprir suas necessidades nutricionais, especialmente no período de cheia. Da mesma forma, os eqüinos são utilizados para transporte de pessoas, mantimentos e equipamentos na RPPN, principalmente na época de maior alagamento. Também deve ser considerada para os carnívoros a possibilidade de se infectarem ao se alimentarem de presas infectadas (REILLY; HANSON; FERRIS, 1970), principalmente considerando que roedores são considerados importantes reservatório de *Leptospira* spp. e que são freqüentemente consumidos pelos carnívoros selvagens.

Por outro lado, os cães domésticos das comunidades dos arredores da RPPN apresentaram uma freqüência relativamente baixa (17,48%) se comparada àquelas dos grupos anteriormente citados. Uma possível explicação para tal fato é que uma parcela considerável destes cães é tratada por seus proprietários como sendo de estimação. Estes animais não têm, portanto, função de trabalho e, desta forma, ao permanecer mais próximos das casas e regiões menos alagadas durante o período de cheia, estariam menos expostos ao agente. Outra explicação seria que a *Leptospira* spp. estaria presente em menor abundância fora da RPPN que dentro dela.

A média das distâncias dos carnívoros selvagens capturados considerados positivos à exposição a *Leptospira* spp. foi superior à média dos negativos. A diferença foi estatisticamente significativa. De acordo com este resultado, os indivíduos capturados em pontos mais centrais da RPPN, mais distantes da divisa, foram mais freqüentemente expostos ao agente do que os animais capturados em locais mais próximos às comunidades humanas localizadas ao norte da reserva. Isto indica que um ciclo de transmissão de *Leptospira* spp. vem sendo mantido no interior da RPPN SESC Pantanal de forma independente dos animais domésticos mantidos no seu entorno, reforçando a idéia de que a intensa movimentação dos animais selvagens propicia uma maior possibilidade de transmissão do agente.

Os guardas-parques da RPPN e os pesquisadores que freqüentam a reserva também estão expostos à infecção por *Leptospira* spp. durante seus deslocamentos na região, principalmente aqueles ocorridos a cavalo durante a estação chuvosa, quando ficam com os pés e pernas em contato com a água por longos períodos. O mesmo ocorre com os moradores das comunidades da região. Como a leptospirose é uma zoonose, seria importante estender o levantamento da exposição ao agente a essas pessoas.

As variantes sorológicas mais freqüentes entre os carnívoros selvagens foram *canícola* (9), *pyrogenes* (8) e *autumnalis* (8). Entre os domésticos, *pyrogenes* (8) e *autumnalis* (3) para os cães, e *icterohaemorrhagiae* (5), *autumnalis* (4) para os eqüinos. Não houve coincidência com os sorovares mais encontrados em outras regiões do Pantanal. A variante mais freqüente na região de Nhecolândia, Corumbá (MS) foi *wolffi* (GIRIO et al., 2004) e *hardjo, mini* e *wolffi* também no Mato Grosso do Sul (MATHIAS; GIRIO; DUARTE, 1999).

Estes resultados indicam que, possivelmente, as variantes encontradas estão presentes na região. No entanto, a ocorrência de reações cruzadas entre os diferentes sorovares não pode ser descartada. Kingscote (1986) encontrou evidências de reação cruzada entre os sorovares *pomona* e *autumnalis*. Apesar de ter encontrado uma freqüência maior de soros positivos para *autumnalis*, o autor conseguiu isolamento apenas do sorovar *pomona*, inclusive em indivíduos que haviam sido positivos apenas para *autumnalis*. A identificação segura dos sorovares presentes na região da RPPN SESC Pantanal deve ser realizada através de isolamento do agente ou de técnicas de biologia molecular.

Podem ser considerados reservatórios da *Leptospira* spp. em uma determinada região espécies de mamíferos com alta suscetibilidade para infecção, mas que não apresentam sintomatologia clínica ou a apresentam de forma branda (LEIGHTON; KUIKEN, 2001). Os carnívoros selvagens capturados na região da RPPN tiveram proporção considerável de indivíduos positivos ao sorodiagnóstico. Nenhum deles apresentou sinais clínicos da leptospirose no momento da captura. O cachorro-do-mato foi a espécie mais intensamente amostrada, tendo atingido quase 40% de positividade (17/43). É, portanto, a espécie para a qual temos um resultado mais próximo da prevalência real. O resultado encontrado para os guaxinins também é bastante importante, uma vez que o guaxinim norte-americano, espécie filogeneticamente próxima, é considerada como reservatório para o agente no Illinois, EUA (MITCHELL et al., 1999). A espécie teve uma alta proporção de positivos (6/12) e o seu papel na manutenção da *Leptospira* spp. não pode ser subestimado. No entanto, estudos controlados de infecção experimental de indivíduos destas espécies ao agente seriam importantes no sentido de elucidar o seu real papel na epidemiologia da leptospirose. As

demais espécies tiveram uma amostragem baixa para que possam ser levantadas hipóteses sobre o seu papel na transmissão e manutenção do agente na região.

Os eqüinos tiveram proporção ainda mais alta de animais positivos (74,07%) e o seu papel na manutenção do agente no interior não deve ser desprezado. No entanto, o número de indivíduos mantidos no interior da RPPN varia em torno de 30 animais, significativamente inferior às diferentes espécies de mamíferos silvestres presentes na região. Por outro lado no entorno da reserva há uma quantidade significativa de animais domésticos de criação (eqüinos, bovinos, suínos) e seria importante avaliar a importância destes na epidemiologia da *Leptospira* spp. na região**.**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pudemos constatar neste estudo e em outros realizados recentemente no Brasil e nos países vizinhos, carnívoros selvagens são expostos a agentes infecciosos que comumente causam morbidade e mortalidade em animais domésticos e que, historicamente, já causaram mortalidade em carnívoros de vida livre em outros continentes. Isto demonstra a importância de se levar em consideração o diagnóstico da exposição da fauna selvagem a patógenos para a elaboração dos planos de manejo das Unidades de Conservação (UCs), como também reforça a necessidade da implementação das áreas de amortecimento (faixa no entorno das reservas que visa diminuir o impacto das atividades antrópicas sobre a biota por ela protegida, BRASIL, 2000) para áreas destinadas à proteção da fauna, inclusive com a elaboração de medidas voltadas para o controle de agentes patogênicos em animais domésticos. No entanto, são necessários estudos posteriores que busquem elucidar se de fato esta exposição está ameaçando a viabilidade das populações de carnívoros selvagens brasileiros ou mesmo interferindo de alguma forma na sua estrutura. Também é importante que busquemos formas mais seguras de determinar quais agentes estão de fato sendo transmitidos dos animais domésticos para os selvagens e quais estão circulando e sendo mantidos pelos animais selvagens, podendo, eventualmente ser transmitidos aos domésticos e aos seres humanos.

Neste sentido, as técnicas moleculares vêm tendo papel fundamental e devem ser cada mais utilizadas nos levantamentos futuros e mesmo naqueles já realizados, mas que colheram e armazenaram material para análises posteriores. Um exemplo interessante é o estudo de Carnieli et al. (2008), que demonstrou que o vírus da raiva tem circulado entre os canídeos silvestres há algum tempo, e que estes animais vêm mantendo um ciclo do agente independente dos animais domésticos.

Por outro lado, as técnicas de diagnóstico sorológico têm uma grande importância por detectarem anticorpos produzidos para o combate aos patógenos, possibilitando que, mesmo que o agente já não circule no organismo do animal nem esteja sendo eliminado, seja possível encontrar indícios indiretos da circulação dos agentes patogênicos. Ainda assim, é importante destacar que estas técnicas apresentam o inconveniente de não diagnosticarem animais positivos no início da infecção, quando apesar de estar infectado, o organismo ainda não produziu uma quantidade de anticorpos passível de ser detectada. Adicionalmente, estas técnicas também têm a limitação de sofrer a influência de reações inespecíficas e, como são

desenvolvidas para animais domésticos, é necessário cautela para se decidir os pontos de corte utilizados para as espécies silvestres. Um ponto de corte muito baixo pode gerar resultados enganosos, considerando como expostos indivíduos que na realidade não foram, enquanto um ponto de corte muito alto pode desconsiderar a exposição dos animais a um patógeno que de fato circula entre eles. Na realidade, o ideal para estudos que procuram pesquisar a exposição de animais selvagens a agentes patogênicos é a realização, sempre que possível, tanto de métodos moleculares, como dos sorológicos, aliados ao exame clínico e exames complementares, como hemograma e bioquímica sérica.

Os carnívoros selvagens foram expostos também a agentes que causam agravos no homem e em animais de criação. Apesar destes resultados apontarem para a possibilidade destes animais agirem como reservatórios para enfermidades como a LTA, a raiva e a leptospirose, é necessário que se avalie de forma mais aprofundada o real papel dos carnívoros selvagens no ciclo epidemiológico destas doenças, realizando estudos que determinem se eles são importantes na transmissão destes agentes.

O controle de doenças infecciosas freqüentemente presentes em cães domésticos que podem infectar e ameaçar populações de animais selvagens pode ser focado na implementação de medidas voltadas à redução da incidência da doença nos cães de uma determinada região ou diretamente sobre os animais selvagens, como também pode estar voltada para a limitação do contato entre estes dois grupos (LAURENSON et al., 2005). Para reduzir as interações entre cães domésticos e carnívoros selvagens seria necessário limitar fisicamente o contato entre estes grupos. Isto poderia hipoteticamente ser realizado através da implementação de uma zona tampão ao redor da RPPN, onde fosse proibida a presença de animais domésticos. No entanto, certamente haveria uma enorme resistência dos moradores da região que tradicionalmente costuma possuir cães para companhia e trabalho. Outra possibilidade seria a colocação de uma cerca ao redor da RPPN, limitando a passagem dos animais, mas esta traria enormes desvantagens em relação ao fluxo gênico necessário para manter populações saudáveis, além de outras desvantagens ecológicas e o enorme custo envolvido.

A alternativa aparentemente mais prática para diminuir o impacto de doenças infecciosas na população de carnívoros selvagens de vida livre seria controlar o agente nos cães domésticos. Para isto, seria necessário realizar campanhas anuais de vacinação para as doenças de interesse nos cães domésticos das comunidades do entorno da RPPN por diversos anos consecutivos. Também seria de grande importância implementar de forma concomitante técnicas para o controle da população de cães nestas comunidades, como, por exemplo,

campanhas de castração. A utilização da vacinação sem o controle populacional poderia acarretar em um aumento da população de cães domésticos da região, devido à retirada de um fator que provavelmente tem um papel importante no controle demográfico dos cães. Caso a vacinação fosse suspensa após algum tempo, a quantidade de animais suscetíveis seria ainda maior do que aquela presente no momento anterior à sua implementação. Desta forma, caso um agente patogênico fosse introduzido nesta nova população hipotética, causaria uma epizootia ainda mais intensa do que as ocorridas anteriormente (WOODROFFE et al., 2004). A vacinação de cães domésticos tem ainda a vantagem de poder abranger tanto agentes infecciosos de interesse para a conservação de animais selvagens como aqueles de importância em Saúde Pública e animais de criação. Desta forma, a vacinação pode envolver uma cooperação entre instituições com interesses diversos, como governo, associações de criadores, conservacionistas, entre outros, possibilitando a divisão de custos e de tarefas.

Outra possibilidade de intervenção é a vacinação direta dos carnívoros selvagens. Um exemplo é a realização de vacinação anti-rábica oral de canídeos silvestres na Europa e América do Norte que vem sendo realizada há vários anos, permitindo um sucesso significativo no controle da doença nestas regiões (CROSS; BUDDLE; ALDWELL, 2007). Esta iniciativa foi implementada com o intuito de diminuir o número de animais suscetíveis, interrompendo a transmissão do vírus entre os indivíduos das espécies consideradas como reservatórios regionais do agente (principalmente a raposa vermelha, *Vulpes vulpes*), com o objetivo de atingir um problema de Saúde Pública que ocorria nestas regiões. É provável que no Brasil intervenção semelhante seja necessária na região Nordeste do país, uma vez que o *Cerdocyon thous* já foi identificado como reservatório regional da raiva (CARNIELI et al., 2008). Por outro lado, este tipo abordagem, quando realizado com vistas à conservação de carnívoros selvagens, ocorreu apenas em ocasiões isoladas, em situações de crise, sem utilizar uma metodologia que permitisse avaliar sua efetividade, e, portanto, ainda necessita de muita discussão e experimentação para poder provar sua efetividade (LAURENSON et al., 2005). Muitas vacinas utilizam na sua composição agentes vivos atenuados para uma espécie doméstica, como o cão, e por ocasião de sua aplicação em uma espécie selvagem filogeneticamente próxima, podem causar a doença e mesmo o óbito do animal vacinado. Por outro lado, não é certo que a aplicação de uma vacina desenvolvida para outra espécie resulte na imunidade desejada, especialmente caso seja aplicada em dose única, como deve ocorrer com freqüência em programas de vacinação parenteral em animais selvagens. De qualquer forma, seria importante que ocorresse uma ampla discussão entre pesquisadores e órgãos do governo voltados à conservação da biodiversidade, como o recém criado Instituto Chico

Mendes para a Conservação da Biodiversidade, ligado ao Ministério do Meio Ambiente (ICMBio/MMA), para que fossem elaborados protocolos seguros para a vacinação de carnívoros selvagens capturados em projetos a campo. Para isto seria importante testar vacinas para as doenças de interesse nas diversas espécies em cativeiro e, então, realizar experimentos a campo, comparando grupos de animais vacinados e não-vacinados, observando as vantagens e desvantagens da vacinação.

A partir dos dados aqui apresentados, mostrou-se ser necessário iniciar o planejamento de medidas que tenham como objetivo o controle de agentes patogênicos na população de carnívoros domésticos que vivem no entorno da RPPN SESC Pantanal. Ações semelhantes devem ser discutidas para outras unidades de conservação. Ainda que não saibamos ainda o real impacto da presença destes agentes entre os carnívoros selvagens, ou mesmo a importância epidemiológica destes para algumas doenças de interesse humano, diversas ações podem ser implementadas de imediato sem prejuízo algum para os animais selvagens, para os domésticos ou para o ser humano. Algumas destas são: 1) garantir a vacinação anti-rábica nos cães e gatos domésticos das comunidades localizadas próximas à unidades de conservação, serviço rotineiramente oferecido pelas prefeituras municipais com o auxílio do Ministério da Saúde, mas que em comunidades rurais é freqüentemente negligenciado, como vinha sendo o caso em São Pedro de Joselândia; 2) realizar a vacinação destes cães para enfermidades que freqüentemente os acometem e podem acometer os animais selvagens como cinomose, parvovirose, leptospirose, entre outras, o mesmo se aplicando aos gatos com relação a imunodeficiência viral felina (FIV), leucemia viral felina (FeLV), calicivirose felina e outras; 3) realizar o controle da população de carnívoros domésticos nestes locais, especialmente dos cães, espécie que costuma ser a mais numerosa, através da realização da castração dos animais, com a autorização dos proprietários; 4) implementar programa de educação em saúde; 5) implementar programa de educação ambiental; 6) incrementar a vigilância para agentes causadores de zoonoses que tenham sido diagnosticados na região, como é o caso da LTA, raiva e leptospirose na RPPN SESC Pantanal e entorno.

É importante salientar que, a partir dos resultados deste estudo, o SESC, instituição nacionalmente reconhecida por sua preocupação social e ambiental, marcou reuniões com diversas instituições interessadas para iniciar o planejamento de algumas medidas para a região. Desta forma foi iniciada uma parceria entre o próprio SESC, a Secretaria de Saúde do estado do Mato Grosso, a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), o IBAMA/MT visando planejar e implementar medidas para o controle da ocorrência de alguns dos agentes

patogênicos diagnosticados nos animais da região. As sugestões de ações aqui citadas foram levadas em consideração. A Secretaria de Saúde, com o apoio do SESC, reiniciou a vacinação anti-rábica de cães e gatos em São Pedro de Joselândia, ação que deverá ser assumida nos próximos anos pela prefeitura de Barão de Melgaço. Também foi iniciado um levantamento das espécies de flebótomos que ocorrem na região. O SESC também demonstrou preocupação com o diagnóstico da presença do parvovírus e do CDV, que podem afetar a população de carnívoros selvagens, e medidas visando o controle destes vírus devem ser implementadas em um futuro próximo.

7 CONCLUSÕES

- Os carnívoros selvagens da região da RPPN SESC Pantanal foram expostos ao CDV, CPV, vírus da raiva, *Leptospira* spp. e *Leishmania (Viannia) braziliensis,* além da possibilidade de terem sido expostos a outras espécies de *Leishmania* do sub-gênero *Viannia.*

- Os cães da região foram expostos aos mesmos agentes e, portanto, são potenciais fontes de infecção de CDV, CPV e do vírus da raiva para os carnívoros selvagens, bem como de *Leishmania* spp. para o homem e do vírus da raiva e de *Leptospira* spp. para os humanos e animais de criação.

- Uma alta proporção de eqüinos utilizados no interior da RPPN SESC Pantanal foi exposta a *Leptospira* spp.

- Este é o primeiro relato de exposição de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous)*, guaxinins (*Procyon cancrivorous)*, onças-pardas (*Puma concolor)* e jaguatiricas (*Leopardus pardalis)* de vida livre ao CDV.

- Este é o primeiro relato de exposição de guaxinins, onças-pardas, jaguatiricas e de um cachorro-vinagre (*Speothos venaticus)* de vida livre ao CPV.

- Este é o primeiro relato de exposição de um guaxinim, uma onça-parda e um cachorro-vinagre de vida livre ao vírus da raiva.

- Este é o primeiro relato de exposição de cachorros-do-mato, de um lobo-guará, um guaxinim e uma jaguatirica de vida livre a *Leishmania (Viannia)* spp.

- Este é o primeiro relato de exposição de guaxinins, lobos-guarás, jaguatiricas e de um cachorro-vinagre de vida livre a *Leptospira* spp.

- Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar a real importância da circulação do CDV, parvovírus e vírus da raiva, agentes com potencial impacto para a conservação dos

carnívoros selvagens, através do monitoramento de longo prazo da população da região da RPPN SESC Pantanal e de outras regiões.

- Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar a importância dos carnívoros selvagens na epidemiologia do vírus da raiva, *Leishmania* spp. e *Leptospira* spp.

- Medidas de controle de doenças infecciosas, como vacinação e controle populacional, devem ser direcionadas aos cães domésticos da região para diminuir o potencial impacto destas sobre os carnívoros selvagens, como também sobre os seres humanos e animais de criação.

- A vigilância da raiva, leishmanioses e leptospirose deve ser intensificada na região, aliada a implementação de um programa de educação em saúde com a comunidade.

- Há necessidade de iniciar uma discussão entre órgãos governamentais e pesquisadores sobre a possibilidade de realização de vacinação de animais selvagens para agentes de potencial impacto para sua conservação, assim como para aqueles que afetam o homem e os animais de criação.

- O Ministério do Meio Ambiente deve levar em consideração a exposição da fauna silvestre a agentes patogênicos para o planejamento e gerenciamento de UCs.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. E. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 3, p. 175-180, 1961.

ALEXANDER, K. A.; APPEL, M. J. G. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 30, p. 481–485, 1994.

ALEXANDER, K. A.; KAT, P. W.; MUNSON, L. A.; KALAKE, A.; APPEL, M. J. G. Canine distemper related mortality among wild dog (*Lycaon pictus*) in Chobe National Park Botswana. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine,** v. 27, p. 426-427, 1996.

ALEXANDER, K. A.; KAT, P. W.; WAYNE, R. K.; FULLER, T. K. Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 30, n. 4, p. 486–491, 1994.

ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal mato-grossense.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1987. 339 p.

ALMEIDA, M. F.; MASSAD, E.; AGUIAR, E. A. C.; MARTORELLI, L. F. A.; JOPPERT, A. M. S. Neutralizing antirabies antibodies in urban terrestrial wildlife in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 2, p. 394-398, 2001.

APPEL, M.; ROBSON; D. S. A microneutralization test for canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 11, p. 1459-1463, 1973.

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: APPEL, M. J. G. (Ed.). **Virus infections of carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 133–159.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology,** v. 44, p. 187–191, 1995.

APPEL, M. J. G.; YATES, R. A.; FOLEY, G. L.; BERNSTEIN, J. J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L. H.; MILER, L. D.; ARP, L. H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B. A. Canine distemper enzootic in lions, tigers, and leopards in North America. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 277-288, 1994.

ARAÚJO, F. A. A. **Raiva humana no Brasil:** 1992-2001. 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2002.

BARKER, I. K.; PARRISH, C. R. Parvovirus Infections. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infectious diseases of wild mammals.** 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 3-36.

BARROS, J. S.; FREITAS, C. E. A. A.; SOUZA, F. S. Raiva em animais domésticos silvestres no Estado do Ceará particularmente na raposa (*Dusicyon vetulus*). **Zoonoses Revista Internacional**, n.1, p. 9-43, 1989.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia,** v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BELL, J. F.; MOORE, G. J. Susceptibility of carnivora to rabies vírus administered orally. **American Journal of Epidemiology,** v. 93, p. 176-182, 1971.

BENGIS, R. G.; KOCK, R. A.; FISCHER, J. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties**, v. 21, n. 1, p. 53-65, 2002.

BERAN, G. W. Rabies and infection by rabies related viruses. In: BERAN, G. W. **C. R. C. Handbook series in zoonoses:** viral zoonoses. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 307-357.

BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S. A.; WANDELER, A. I.; ARMASTRONG, J.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S.; NOGUEIRA, F. R. B.; ITO, F. H. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology,** v. 86, p. 3153–3162, 2005.

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences,** v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.

BISCHOF, R.; ROGERS, D. G. Serologic survey of selected infectious diseases in coyotes and raccoons in Nebraska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 787–791, 2005.

BLACK, J. G.; LAWSON, K. F. Sylvatic rabies studies in the silver fox *(Vulpes swipes).* Susceptibility and immune response. **Canadian Journal of Comparative Medicine,** v. 34, p. 309-311, 1970.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de raiva humana (óbitos) Brasil, grandes regiões e unidades federadas de 1990 a 2006.** 2007a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_casos_raiva.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmissíveis**: raiva humana, 2006a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21906>. Acesso em: 07 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007b. 182 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2006b. 120 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 maio 2003. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>. Acesso em: 01 fev. 2008.

BRASIL. Poder Executivo. Lei nº 9.985 de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1°, incisos I, II, III, e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 jul. 2000. Disponível em: <http://www6.senado.gov.br/legislacao/ListaNormas.action?numero=009985&tipo_norma=LEI&data=20000718&link=s>. Acesso em: 19 fev. 2008.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instuto de Medicina tropical de São Paulo,** v. 45, p. 79-83, 2003.

CAREY, A. B.; MCLEAN, R. G. The ecology of rabies: evidence of co-adaptation. **Journal of Applied Ecology**, v. 20, p. 777-800, 1983.

CARMICHAEL, L. E.; JOUBERT, J. C.; POLLOCK, R. V. H. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 784-791, 1980.

CARNIELI JR., P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACEDO, C. I. M.; MACHADO, L. M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R. C.; CARVALHO, V. A.; MONTEBELLO, L.; WADA, M.; KOTAIT, I. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v. 120, p. 113-120, 2006.

CARNIELI JR., P.; BRANDÃO, P. E.; CARRIERI, M. L.; CASTILHO, J. G.; MACHADO, J. L. M.; RANGEL, N.; SANTOS, H. P.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Ecological association among rabies isolated from humans and foxes in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE RABIES IN THE AMERICAS, 15., 2004, Santo Domingo, República Dominicana. **Abstract…** Santo Domingo, República Dominicana, 2004. p. 40-41.

CARNIELI JR., P. ; FAHL, W. O.; CASTILHO, J. G.; OLIVEIRA, R. N. O.; MACEDO, C. I. M.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R. S. P.; MORATO, R. G.; SPINDOLA, R. O; MACHADO, L. M.; SA, J. E. U.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Characterization of *Rabies virus* isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research,** v. 131, p. 33-46, 2008.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of Leishmania Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of rabies. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. **Rabies**. Norwell: Kluwer Academic, 1988. p. 101-150.

CHAVES, L. B.; MAZUTTI, A. L. C.; CAPORALE, G. M. M.; SCHEFFER, K. C.; SILVA, A. C. R. Rabies virus neutralizing antibodies: comparison of two evaluation test in cell culture. In: INTERNATIONAL CONFERENCE RABIES IN THE AMERICAS, 17., 2006, Brasília, Brasil. **Abstract…** Brasília, Brasil, 2006. p. 160.

CHEIDA, C. C.; NAKANO-OLIVEIRA, E.; FUSCO-COSTA, R.; ROCHA-MENDES, F.; QUADROS, J. Ordem Carnivora. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, P. I. **Mamíferos do Brasil.** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. p. 231-275.

CHILDS, J. Epidemiology. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. (Ed.). **Rabies.** San Diego: Academic Press, 2002. p. 113–161.

CIRONE, S. M.; REIMANN, H. P.; RUPPANER, R.; BEHYMER, D. E.; FRANTI, C. E. Evaluation of the hemagglutination test for epidemiological studies of leptospiral antibodies in wild mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, p. 193-202, 1978.

CLEAVELAND, S. Dog vaccination around the Serengeti – Reply. **Oryx**, v. 31, p. 13-14, 1997.

CLEAVELAND, S.; APPEL, M. G. J.; CHALMERS, W. S. K.; CHILLINGWORTH, C.; KAARE, M.; DYE, C. Serological and Demographic evidence for domestic dog as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 217-227, 2000.

CLEAVELAND, S.; LAURENSON, K. ; FUNK, S.; PACKER, C. Impact of viral infections in wild carnivore populations. In: MORATO, R. G.; RODRIGUES, F. H. G.; EIZIRIK, E.; MANGINI, P. R.; AZEVEDO, F. C. C.; MARINHO-FILHO, J. (Org.). **Manejo e conservação de carnívoros neotropicais.** São Paulo: IBAMA, 2006. p. 326-349.

CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, F; FERREIRA-NETO, J. S. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences,** v. 41, p. 189-193, 2004.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; CHALMERS, W. S. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating-foxes. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 9-19, 2001.

COURTENAY, O.; QUINNEL, R. J.; GARCEZ, L. M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**, v. 125, p. 407-414, 2002a.

COURTENAY, O.; QUINNEL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1314–1320, 2002b.

COURTENAY, O.; SANTANA, E. W.; JOHNSON, P. J.; VASCONCELOS, I. A. B. , VASCONCELOS, A. W. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 498-502, 1996.

CREEL, S.; CREEL N. M. Six ecological factors that may limit African wild dogs, *Lycaon pictus.* **Animal Conservation**, v. 1, p. 1-9, 1998.

CREEL, S.; CREEL, N. M.; MUNSON, L.; SANDERLIN, D.; APPEL, M. J. Serosurvey for selected viral diseases and demography of African wild dogs in Tanzania**. Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, p. 823-832, 1997.

CROSS, M. L.; BUDDLE, B. M.; ALDWELL, F. E. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 472-480, 2007.

CURI, N. **Avaliação do estado de saúde e do risco de transmissão de doenças entre canídeos (Mammalia, Carnívora) silvestres e domésticos na região da Serra do Cipó, Minas Gerais: implicações para a conservação.** 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CURI, N.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging Infectious Diseases – Threats to Biodiversity and Human Health. **Science**, v. 287, p. 443-449, 2000.

DAVIDSON, W. R.; APPEL, M. J. G.; DOSTER, G. L.; BAKER, O. E.; BROWN, J. F. Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 28, p. 581–589, 1992a.

DAVIDSON, W. R.; NETTLES, V. F.; HAYES, L. E.; HOWERTH, E. W.; COUVILLION, C. E. Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargentateus)* from the southeastern United States**. Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, p. 28-33, 1992b.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital,** v. 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, v. 48, p. 61-76, 1955.

DEEM, S. L.; DAVIS, R.; PACHECO, L. F. Serologic evidence of nonfatal rabies exposure in a free-ranging oncilla (*Leopardus tigrinus*) in Cotapata National Park, Bolivia. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 40, n. 4, p. 811–815, 2004.

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

EAST, M. L.; HOFER, H.; COX, J. H.; WULLE, U.; WIIK, H.; PITRA, C. Regular exposure to rabies virus and lack of symptomatic disease in Serengeti spotted hyenas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 98, p. 15026–15031, 2001.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics.** The central neotropics: Equador, Peru, Bolívia, Brasil. Chicago: The University of Chicago Press, 1999. 609 p.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals**. A field guide. 2. ed. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 307 p.

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

FARIAS, T. M.; SILVA, L. H. R.; PIMENTEL, T. L. Occurence of leptospirosis in giant otters at Brasília Pole Ecological Foundation (FunPEB). In: CONGRESSO BRASILIERO DE ZOOLÓGICOS, 23., 1999, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 1999. p. 10.

FAVORETTO, S. R.; CARRIERI, M. L.; TINO, M. S.; ZANETTI, C. R.; PEREIRA, O. A. C. Simplified fluorescent inhibition microtest for the titration of rabies neutralizing antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 35, p. 171-175, 1993.

FERGUSON, D. V.; HEIDT, G. A. Survey for rabies, leptospirosis, toxoplasmosis, and tularemia in striped skunks *(Mephitis mephitis)* from three public use areas in northwestern Arkansas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, p. 515-519, 1981.

FEKADU, M. Canine rabies. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 421-427, 1993.

FEKADU, M. Latency and aborted rabies. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies.** 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 191-198.

FEKADU, M.; SHADDOCK, J. H.; BAER, G. M. Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 145, p. 715-719, 1982.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S. P.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and Ehrlichia Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470-477, 2006.

FIORELLO, C. V.; DEEM, S. L.; GOMPPER, M. E.; DUBOVI, E. J. Seroprevalence of pathogens in domestic carnivores on the border of Madidi National Park, Bolivia. **Animal Conservation**, v. 7, p. 45-54, 2004.

FIORELLO, C. V.; NOSS, A. J.; DEEM, S. L.; MAFFEI, L.; DUBOVI, E. J. Serorurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 551-557, 2007.

FLETCHER, K. C.; EUGSTER, A. K.; SCHMIDT, R. E.; HUBBARD, G. B. Parvovirus infection in maned wolves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, p. 897–900, 1979.

FUNK, S. M.; FIORELLO, C. V.; CLEAVELAND, S.; GOMPPER, M. E. The role of disease in carnivore ecology and conservation. In: GITTLEMAN, J. L.; FUNK, S. M.; WAYNE, B. W.; MACDONALD, D. W. **Carnivore conservation.** Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 443-466.

GASCOYNE, S. C.; LAURENSON, M. K.; LELO, S.; BORNER, M. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Serengeti region, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 29, n. 3, p. 396-402, 1993.

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 imuno-histoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural,** v. 34, n. 1, p. 165-169, 2004.

GOMES, A. A. B. **Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil.**

2004. 107 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GOMES, R. B.; MENDONÇA, I. L.; SILVA, V. C.; RUAS, J.; SILVA, M. B.; CRUZ, M. S. P.; BARRAL, A.; COSTA, C. H. N. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of Leishmania chagasi. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 101, p. 127-133, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GORDON, J. C.; ANGRICK, E. J. Canine parvovirus: Environmental effects on infectivity. **American Journal of Veterinary Research,** v. 47, p. 1464–1467, 1986.

GOSS, L. J. Species susceptibility to the viruses of Carré and feline enteritis. **American Journal of Veterinary Research,** v. 9, p. 65–68, 1948.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat.** 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 9–22.

HATTWICK, M. A. W.; GREGG, M. B. The disease in man. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies.** Boca Raton: CRC Press, 1975. p. 281-305.

HELMBOLT, C. F.; JUNGHERR, E. L. Distemper complex in wild carnivores simulating rabies. **American Journal of Veterinary Research,** v. 16, p. 463–469, 1955.

HILL, R. E.; BERAN, G. W. Experimental inoculation of raccoons (*Procyon lotor*) with rabies vírus of skunk origin. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 1, p. 51-56, 1992.

HILL, R. E.; BERAN, G. W; CLARK, W. R. Demonstration of rabies virus-specific antibody in the sera of free-ranging Iowa raccoons (Procyon lotor). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 3, p. 377-385, 1992.

HOFMEYR, M.; BINGHAM, J.; LANE, E. P.; IDE, A.; NEL, L. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pitus*) in the Madikwe Game Reserve, South Africa. **Veterinary Record**, v. 146, n. 2, p. 50-52, 2000.

HOOVER, J. P.; BALDWIN, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Serologic response of domestic ferrets (*Mustela putorius furo*) to canine distemper and rabies virus vaccines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 194, v. 2, p. 234-238, 1989.

HORSH, F. Leptospirose. In: BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Rocca, 1999. p. 305-326.

HYSLOP, N. S. G. Feline enteritis in the lynx, the cheetah and other wild felidae. **British Veterinary Journal,** v. 111, p. 373–377, 1955.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE. **IUCN Red List of Threatened Species**. *Speothos venaticus,* 2004. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 01 fev. 2008.

JANSSEN, D. L.; BARTZ, C. R.; BUSH, M.; MARCHWICKI, R. H.; GRATE, S. J.; MONTALI, R. J. Parvovirus enteritis in vaccinated juvenile bush dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 1225–1227, 1982.

JOHNSON, M. R.; BOYD, D. K.; PLETSCHER, D. H. Serologic investigations of canine parvovirus and canine-distemper in relation to wolf (*Canis lupus*) puppy mortalities. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 270-273, 1994.

KAPLAN, C. Rabies: a worldwide disease. In: BACON, P. J. **Population dynamics of rabies in wildlife**, London: Academy Press, 1985. p. 1-21.

KAT, P. W.; ALEXANDER, K. A.; SMITH, J. S.; RICHARDSON, J. D.; MUNSON, L. Rabies among African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Masai Mara, Kenya. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 420-426, 1996.

KHAN, M. A.; GOYAL, S. M.; DIESCH, S. L.; MECH, L. D.; FRITTS, S. H. Seroepidemiology of leptospirosis in Minnesota wolves, **Journal of Wildlife Diseases**, v. 27, p. 248- 253, 1991.

KINGSCOTE, B. F. Leptospirosis in red foxes in Ontario. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, p. 475-478, 1986.

KOCK, R.; CHALMERS, W. S. K.; MWANZIA, J.; CHILLINGWORTH, C.; WAMBUA, J.; COLEMAN, P. G.; BAXENDALE, W. Canine distemper antibodies in lions of the Masai Mara. **Veterinary Record**, v. 142, p. 662-665, 1998.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Age related susceptibility to canine distemper, virus infection in gnotobiotic dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 134, p. 629–632, 1976.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New world leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN D.; GILLESPIE, S. H.; DESPOMMIER, D. D. (Org.). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**. 10. ed. London: Hodder Arnold, 2005. v. 2, p. 313-349.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; LINS, C. Z. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L.) as a reservoir of *Leishmania dovovani* in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 741-745, 1969

LAURENSON, K.; SHIFERAW, F.; SILLERO-ZUBIRI, C. Disease, domestic dogs and the Ethiopian wolf: current situation. In: SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D. (Ed.) **The ethiopian wolf. Status and conservation action plan.** Gland, Switzerland: IUCN/SSC Canid Specialist Group, 1997. p. 32-40

LAURENSON, M. K.; MLENGEYA, T.; SHIFERAW, F.; CLEAVELAND, S. Approaches to disease control in domestic canids for the conservation of endangered wild carnivores. In: OSOFSKY, S. A.; CLEAVELAND, S.; KARESH, W. B.; KOCK, M. D.; NYHUS, P. J., STARR, L.; YANG, A. (Eds.). **Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface:** Implications for Wildlife, Livestock, and Human Health. Gland and Cambridge: IUCN Publications Sevices Unit, 2005. Disponível em: http://www.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/SSC-OP-030lr.pdf. Acessado em 15 jan. 2008.

LEIGHTON, T.; FERGUSON, M.; GUNN, A.; HENDERSON, E.; STENHOUSE, G. Canine distemper in sled dogs. **Canadian Veterinary Journal,** v. 29, p. 299, 1988.

LEIGHTON, F.; KUIKEN, T. Leptospirosis. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infectious diseases of wild mammals.** 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 498-502.

MAIA, O. B.; GOUVEIA, A. M. G. Birth and mortality of maned wolves Chrysocyon brachyurus (Illiger, 1811) in captivity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 1, p. 25-32, 2002.

MANN, P. C.; BUSH, M.; APPEL, M. J. G.; BEEHLER, B. A.; MONTALI, R. J. Canine parvovirus infection in South American canids. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 177, p. 779–783, 1980.

MATHIAS, L. A.; GIRIO, R. J. S.; DUARTE, J. M. B. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in pampas deer from Brazil. **Journal Wildlife Diseases**, v. 35, n. 1, p. 112-114, 1999.

MACDONALD, D. W.; KAYS, R. W. Carnivores of the world: an introduction. In: NOWAK, R. M. **Walker's carnivores of the world.** Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 1-67.

MECH, L. D.; GOYAL, S. M. Canine parvovirus effect on wolf population change and pup survival. **Journal Wildlife Diseases**, v. 29, n. 2, p. 330-333, 1993.

MILES, M. A.; VEXENAT, J. A.; FURTADO CAMPOS, J. H.; FONSECA DE CASTRO, J. A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999, Barcelona. **Proceedings...** Wiesbaden: Intervet International, 1999. p. 46-53.

MITCHELL, M. A.; HUNGERFORD, L. L.; NIXON, C.; ESKER, T.; SULLIVAN, J. KOERKENMEIER, R.; DUBEY, J. P. Serologic survey for select infectious disease agents in raccoons from Illinois. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 35, p. 347–355, 1999.

MÖRNER, T.; OBENDORF, D. L.; ARTOIS, M. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v. 21, n. 1, p. 67-76, 2002.

MURPHY, F. A. Rabies Pathogenesis. **Archives of Virology,** v. 54, n. 4, p. 279-297, 1977.

NIELSEN, J. N.; ARMSTRONG, C. H.; NIELSEN, N. C. Relationship among selected *Leptospira interrogans* serogroups as determined by nucleic acid hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2724-2729, 1989.

NIEZGODA, M.; BRIGGS, D. J.; SHADDOCK, J.; DRESSEN, D. W.; RUPPRECHT, C. E. Pathogenesis of experimentally induced rabies in domestic ferrets. **American Journal of Veterinary Research,** v. 58, p. 1327–1331, 1997.

NIEZGODA, M.; HANLON, C. A.; RUPPRECHT, C. E. Pathogenesis of experimental rabies virus in raccoons (*Procyon lotor*). In: WILDLIFE DISEASE ASSOCIATION CONFERENCE, 42., 1993, Guelph, Ontário. **Proceedings...** Guelph, Ontario: Wildlife Disease Association , 1993. p. 71.

NIMER, E. **Climatologia do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1989. 422 p.

PARRISH, C. R. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. **Advances in Virus Research,** v. 38, p. 403–450, 1990.

PARRISH, C. R.; CARMICHAEL, L. E. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. **Virology,** v. 129, p. 401–414, 1983.

PARRISH, C. R.; OLIVER, R. E.; MCNIVEN, R. Canine parvovirus infections in a colony of dogs.**Veterinary Microbiology,** v. 7, n. 4, p. 317-324, 1982.

POLLOCK, R. H. V.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p. 268–287.

RAMSDEN, R. O.; JOHNSTON, D. H. Studies on the oral infectivity of rabies virus in carnivora. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 11, p. 318-324, 1975.

RANDALL, D. A.; MARINO, J.; HAYDON, D. T.; SILLERO-ZUBIRI, C.; KNOBEL, D. L.; TALLENTS L. A.; MACDONALD, D. W.; LAURENSON, M. K. An integrated disease management strategy for the control of rabies in Ethiopian wolves. **Biological Conservation** 131, p. 151-162, 2006.

REILLY, J. R.; HANSON, L. E.; FERRIS, D. H. Experimental induced predator-food chain transmission of *Leptospira grippotyphosa* from rodents to wild marsupialia and carnivora. **American Journal of Veterinary Research,** v. 31, p. 1443-1448, 1970.

ROBINSON, W. F.; WILCOX, G. E.; FLOWER, R. L. P. Canine parvoviral disease: Experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. **Veterinary Pathology,** v. 17, p. 589–599, 1980.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology,** v. 71, p. 267-275, 1990.

ROELKE-PARKER, M. E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEAVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, S. J.; POSPISCHIL, A.; HOFFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H.; MWAMENGELE, G. L. M.; MGASA, M. N.; MACHANGE, G. A.; SUMMERS, B. A.; APPEL M. J. G. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo).* **Nature**, v. 379, p. 441-445, 1996.

ROSATTE, R. C.; GUNSON, J. R. Presence of neutralizing antibodies to rabies virus in striped skunks from areas free of skunk rabies in Alberta. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, p. 171–176, 1984.

RUPPRECHT, C. E.; STÖRH, K.; MEREDITH, C. Rabies. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infectious diseases of wild mammals.** 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 3-36.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T**. Molecular cloning:** a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SENDA, M.; HIRAYAMA, N.; ITOH, O.; YAMAMOTO, H. Canine parvovirus: Strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 349–354, 1988.

SILLERO-ZUBIRI, C.; KING, A. A.; MACDONALD, D. W. Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 80-86, 1996.

SILVA, J. C. R.; MARVULLO, M. F. O impacto potencial de doenças bacterianas e protozoários patogênicos sobre populações selvagens de carnívoros brasileiros. In: MORATO, R. G.; RODRIGUES, F. H. G.; EIZIRIK, E.; MANGINI, P. R.; AZEVEDO, F. C. C.; MARINHO-FILHO, J. **Manejo e conservação de carnívoros neotropicais.** São Paulo: IBAMA, 2006. p. 351-366.

SMITH, J. S. Rabies serology. In: BAER, G. M. **The natural history of rabies.** 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 235-252.

SMITH, J. S.; BAER, G. M. Epizootiology of rabies: the Americas. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. **Rabies**. Norwell: Kluwer Academic, 1988. p. 365-380.

SMITH J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies.** 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 181-192.

SOUZA JUNIOR, M. F.; LOBATO, Z. I. P.; LOBATO, F. C. F.; MOREIRA, E. C.; OLIVEIRA, R. R.; LEITE, G. G.; FREITAS, T. D.; ASSIS, R. A. Presença de anticorpos da classe IgM de Leptospira interrogans em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 292-294, 2006.

STEINEL, A.; PARRISH, C. R.; BLOOM, M. E.; TRUYEN, U. Parvovirus infections in wild carnivores. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 37, p. 594-607, 2001.

TABOR, G. M. Defining Conservation Medicine. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. **Conservation medicine:** ecological health in practice. New York: Oxford University Press, 2002. p. 8-16.

THIERMANN, A B. Leptospirosis: Current development and trends. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 184, p. 722- 725, 1984.

THOMAS, N. J.; FOREYT, W. J.; EVERMANN, J. F.; WINDBERG L. A.; KNOWTON, F. F. Seroprevalence of canine parvovirus in wild coyotes from Texas, Utah, and Idaho (1972 to 1983). **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 185, p. 1283–1287, 1984.

TOMA, B.; ANDRAL, L. Epidemiology of fox rabies. In: LAUFFER, B. A.; BANG, F. B.; MARAMOROSCH, K.; SMITH, K.M. **Advances in virus research.** New York: Academic, 1977. p. 1–36.

TORRES, S. Infectious feline gastroenteritis in wild cats. **North American Veterinarian,** v. 22, p. 297–299, 1941.

TROLLE, M.; KÉRY, M. Camera-trap study of ocelot and other secretive mammals in the northern Pantanal. **Mammalia,** v. 69, p. 405-412, 2005.

TRUYEN, U.; EVERMANN, J. F.; VIELER, E.; PARRISH, C. R. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. **Virology,** v. 215, p. 186–189, 1996.

TRUYEN, U.; MULLER T.; HEIDRICH, R.; TACKMANN, K.; CARMICHAEL, L. E. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. **Epidemiology and Infection**, v. 121, p. 433–440, 1998.

ULIANA, S. R.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Discrimination amongst Leishmania by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal of Eukaryotic Microbiology,** v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.

VAN DE BILDT, M. W. G.; KUIKEN, T.; VISEE, A. M.; LEMA, S.; FITZJOHN, T. R.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 211-213, 2002.

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 17-24, 1987.

WANDELER, A. I. Control of wildlife rabies: Europe. In: CAMPBELL, J. B.; CHARLTON, K. M. **Rabies**. Norwell: Kluwer Academic, 1988. p. 365-380.

WEBSTER, J. P.; ELLIS, W. A.; MACDONALD, D. W. Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. **Epidemiology and Infection**, v. 114, n. 1, p. 195-201, 1995.

WEILER, G. J.; GARNER, G. W.; RITTER, D. G. Occurrence of rabies in a wolf population in northeastern Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 1, p. 79-82, 1995.

WILLIAMS, E. S. Canine distemper. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infectious diseases of wild mammals.** 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 50-59.

WILLIAMS, E. S.; THORNE, E. T.; APPEL M. J. G.; BRLITSKY D. W. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. **Journal of Wildlife Diseases** v. 24, n. 3, p. 385–398, 1988.

WINDBERG, L. A. Demography of a high density coyote population. **Canadian Journal of Zoology,** v. 73, p. 942-954, 1995.

WOODROFFE, R.; CLEAVELAND, S.; COURTENAY, O.; LAURENSON, M. K.; ARTOIS, A. Infectious diseases. In: MACDONALD, D. W.; SILLERO-ZUBIRI, C. (Ed.). **The biology and conservation of wild canids**. Oxford: Oxford University Press, 2004. p. 123–142.

WOODROFFE, R.; GINSBERG, J. R.; MACDONALD, D. **The African wild dog. Status and conservation action plan.** Gland, Switzerland: IUCN/SSC Canid Specialist Group, 1997. Disponível em: <http://www.canids.org/PUBLICAT/AWDACTPL/wldogtoc.htm>. Acesso em: 30 set. 2002.

Appendice A: Resultados dos testes realizados para os carnívoros selvagens em função dos métodos e patógenos pesquisados.

(continua)

Espécies/ Identificação das amostras	SN	HI	SFIMT	MAT	PCR
	CDV	CPV	Raiva (UI/mL)	*Leptospira* spp.	*Leishmania* spp.
Cerdocyon thous n=43					
0610D485	-[1]	P[2] (160)	-	P (*canícola*=200)	…[3]
061BE123	-	-	-	-	…
0610AAA8	P (32)	P (160)	-	P (*autumnalis*=1600)	…
061C5B34	-	P (160)	-	-	…
061C5E7C	-	P (160)	-	P (*pomona*=100)	…
061C2679	P (8)	P (160)	-	-	-
061BCC76	P (64)	P (160)	-	-	P
061BD536	P (8)	P (320)	-	-	-
061BEAFF	-	P (80)	-	-	…
0610A6A3	P (16)	P (80)	-	P (*pyrogenes*=1600)	…
061BE1F9	-	P (160)	-	-	…
CT101	P (8)	P (160)	-	-	…
CT102	-	P (320)	-	-	…
CT103	P (16)	P (160)	-	-	…
CT104	-	P (160)	-	-	…
061C0B12	-	P (160)	-	-	…
06109F01	-	P (320)	-	-	…
061C664E	P (16)	P (320)	-	P (*australis*=100)	…
0610D556	P (64)	P (320)	-	-	…
061C5170	P (32)	P (320)	-	P (*autumnalis*=100)	…
0610B1D4	P (8)	P (160)	-	-	…
061BDD5C	-	P (320)	-	-	…
061C025C	-	P (160)	-	-	…
061C3B6B	-	P (160)	-	-	…
061C5644	-	P (160)	-	P (*autumnalis*=1600)	…
061B0833	P (32)	P (160)	-	P (*canicola*=100)	…
0610BE2F	-	P (160)	-	P (*canicola*=400)	…
CT111	-	P (160)	-	P (*canicola*=400)	…
0676E387	-	P (160)	-	P (*autumnalis*=800)	…
061C3DC5	-	P (160)	-	P (*pyrogenes*=200)	…
0676E95D	-	P (320)	-	-	…
O61BE08F	-	P (160)	-	-	…
0676E7E7	-	P (160)	-	-	…
0676E3AD	-	P (160)	-	P (*autumnalis*=100)	…
0670704B	P (16)	P (160)	P (0,20)	-	…
0676BD12	-	P (160)	-	P (*canicola/pyrogenes*=800)	…
06707BC5	-	P (80)	-	P (*pyrogenes*=3200)	P
0676E0E2	-	P (160)	-	-	P
06708394	-	P (160)	-	-	-
06706B03	-	P (320)	-	-	P
0670556C	-	P (160)	-	P (*pyrogenes*=1600)	-
067144BA	-	P (80)	-	-	-
067124BB	-	P (160)	-	P (*autumnalis*=200)	…

(conclusão)

Espécies/ Identificação das amostras	SN	HI	SFIMT	MAT	PCR
	CDV	CPV	Raiva (UI/mL)	*Leptospira* spp.	*Leishmania* spp.
Chrysocyon brachyurus n=8					
061BCC4F	-	P (160)	-	-	…
0610C879	P (16)	S[4] (40)	-	-	…
061BD695	P (16)	P (160)	-	P (*canícola*=100)	…
0610B7AE	-	P (160)	-	-	…
0610CCE9	P (8)	P (80)	-	P (*pyrogenes*=200)	…
0610B3C1	-	P (80)	-	-	P
061C0D11	-	P (80)	-	P (*autumnalis*=800)	-
067060DB	-	P (160)	-	-	…
Speothos venaticus n=1					
067086BE	…	P (160)	P (1,60)	P (*autumnalis/pomona/hardjo*=800)	…
Puma concolor n=7					
061BDBBC	-	P (80)	-	-	…
0610AF3B	-	P (160)	-	-	…
0610D9A3	-	P (80)	-	-	…
061C6683	-	P (80)	-	-	…
061C16D9	-	P (80)	-	P (*bratislava*=1600)	…
061C6047	-	P (160)	-	P (*autumnalis*=1600)	…
061C5554	P (8)	P (160)	P (0,10)	-	…
Leopardus pardalis n=4					
061C6D4A	P (8)	P (160)	-	P (*canícola*=400)	…
0610B724	P (8)	S (40)	-	P (*pomona*=800)	…
061BEF4F	-	P (160)	-	-	…
0676BD15	P (64)	P (160)	-	P (*pyrogenes*=200)	P
Procyon cancrivorous n=12					
0610BBEF	-	S (40)	-	-	…
061C367D	-	S (40)	-	-	…
061BDC78	-	P (160)	-	P (*canícola*=1600)	…
061BD695	-	P (160)	-	P (*pomona*=800)	…
0610BZA7	-	S (40)	-	-	P
061C6E1C	P (16)	P (80)	-	P (*pomona*=400)	…
PC201	-	P (160)	-	-	…
PC211	-	P (320)	-	P (*canicola*=100)	…
0676E3F5	P (64)	P (160)	-	-	…
0676E1AB	-	P (80)	-	P (*pyrogenes*=400)	-
066BF5AF	-	P (80)	P (0,27)	P (*pyrogenes*=800)	-
06713ADC	-	P (160)	-	-	…

[1] - = Resultado negativo

[2] P = Resultado positivo. O número entre parênteses representa o título de anticorpos obtido para a amostra.

[3] ... = Teste não realizado para o indivíduo em questão.

[4] S = Resultado suspeito para exposição ao parvovírus (10≥título de anticorpos≥40).

Appendice B: Resultados dos testes realizados para os cães domésticos em função dos métodos e patógenos pesquisados.

(continua)

Identificação dos cães amostrados	SN	HI	SFIMT	MAT	PCR
	CDV	CPV	Raiva (UI/mL)	*Leptospira* spp.	*Leishmania* spp.
1	…[1]	S[2] (40)	-[3]	P (*pyrogenes*=200)	-
2	…	P[4] (80)	P (0,20)	-	-
3	…	P (320)	P (1,60)	-	P
4	…	P (80)	-	-	-
5	…	P (80)	P (0,40)	-	-
6	…	P (80)	P (0,53)	-	-
7	…	S (40)	P (4,27)	-	-
8	…	S (20)	-	-	P
9	…	P (80)	P (0,15)	-	P
10	…	P (80)	P (25,60)	-	-
11	…	P (80)	-	P (*wolffi*=400)	P
12	…	P (80)	P (0,20)	-	P
13	…	...	…	-	-
15	…	P (160)	-	-	P
16	…	P (80)	-	-	P
17	…	P (160)	P (2,13)	-	-
19	…	P (160)	-	-	-
20	…	P (160)	-	-	-
21	…	P (80)	-	-	P
22	…	P (80)	-	-	-
23	…	P (160)	-	P (*pyrogenes/canicola/ icterohaemorrhagiae*=200)	-
24	…	P (160)	-	P (*hardjo*/*wolffi*=200)	-
25	…	P (160)	-	-	-
26	…	P (160)	P (0,80)	-	-
27	…	P (80)	P (12,80)	-	-
28	…	P (80)	P (0,40)	-	-
29	…	P (80)	P (51,20)	-	-
30	…	P (160)	P (0,10)	-	-
31	…	P (160)	P (4,27)	-	-
32	…	P (160)	P (0,10)	P (*hebdomadis*=200)	-
33	…	P (160)	-	P (*hebdomadis*=200)	-
34	…	P (80)	-	-	-
35	…	P (80)	-	-	-
36	…	P (80)	P (0,20)	-	-
37	P(256)	P (80)	-	-	…
38	P(256)	P (80)	P (3,20)	-	…
39	-	P (160)	-	-	…
40	P(64)	P (160)	-	-	…
41	P(256)	P (320)	-	-	…
42	P(64)	P (320)	-	P (*pyrogenes*=400)	…
43	P(512)	P (160)	-	-	…
44	P(256)	P (160)	-	P (*autumnalis*=200)	…
45	P(512)	P (80)	-	-	…
46	P(64)	P (160)	-	-	…
47	P(128)	P (160)	-	-	…
48	P(128)	P (320)	-	-	…

continuação

Identificação dos cães amostrados	SN	HI	SFIMT	MAT	PCR
	CDV	CPV	Raiva (UI/mL)	*Leptospira* spp.	*Leishmania* spp.
49	P(64)	P (320)	-	-	…
50	P(64)	P (320)	-	-	…
51	P(256)	P (320)	-	-	…
52	P(512)	P (160)	-	-	…
53	P(512)	P (160)	-	-	…
54	P(16)	P (320)	-	-	…
55	P(512)	P (160)	P (1,07)	-	…
56	P(16)	P (160)	-	-	…
57	P(16)	P (80)	-	-	…
58	P(16)	P (160)	-	-	…
59	-	P (160)	P (0,80)	-	…
60	-	P (160)	P (0,53)	-	…
61	-	P (160)	-	-	…
62	P(32)	P (160)	-	-	…
63	P(32)	P (160)	-	-	…
64	-	P (160)	-	-	…
65	P(32)	P (160)	-	-	…
66	P(32)	P (80)	-	-	…
67	P(64)	P (320)	P (0,15)	-	…
68	P(16)	P (160)	P (2,13)	-	…
69	-	P (80)	-	-	…
70	-	P (160)	-	P (*djasiman/sentot*=200)	P
71	P(32)	P (160)	P (0,10)	-	-
72	P(64)	P (80)	P (0,15)	-	-
73	P(128)	P (160)	-	-	-
74	P(128)	P (80)	-	-	-
75	P(512)	P (160)	-	-	P
76	P(512)	P (80)	-	-	-
77	P(32)	P (80)	-	P (*autumnalis*=200)	P
78	P(64)	P (80)	-	-	-
79	P(128)	P (160)	-	-	-
80	-	P (160)	-	-	-
81	P(256)	P (160)	P (0,20)	-	-
82	P(64)	P (80)	-	P (*canicola*=200)	P
83	-	P (160)	-	-	-
84	P(512)	P (160)	P (0,10)	-	P
85	P(256)	P (160)	-	-	P
86	P(32)	P (80)	-	-	P
87	P(256)	P (160)	-	-	P
88	P(512)	P (160)	-	-	-
89	P(256)	S (20)	-	-	-
90	P(64)	P (80)	-	P (*autumnalis*=200)	-
91	P(128)	P (160)	-	-	-
92	-	P (80)	-	-	-
93	-	P (160)	-	-	-
94	P(128)	P (320)	-	-	-
95	P(512)	P (160)	-	P (*canicola*=200)	-
96	-	P (160)	-	P (*pyrogenes*=400)	-
97	P(256)	P (320)	-	P (*pyrogenes*=400)	-
98	P(64)	P (80)	-	-	P

(conclusão)

Identificação dos cães amostrados	SN	HI	SFIMT	MAT	PCR
	CDV	CPV	Raiva (UI/mL)	*Leptospira* spp.	*Leishmania* spp.
99	P(32)	P (320)	-	-	-
100	-	P (160)	-	-	-
101	P(32)	P (320)	-	-	-
102	P(16)	P (320)	-	-	P
103	P(128)	P (160)	-	P (*pyrogenes*=200)	P
104	P(64)	P (160)	-	P (*pyrogenes*=200)	-
105	P(64)	P (160)	-	P (*pyrogenes*=800)	…

[1] ... = Teste não realizado para o indivíduo em questão.
[2] S = Resultado suspeito para exposição ao parvovírus (10≥título de anticorpos≥40)
[3] - = Resultado negativo
[4] P = Resultado positivo. O número entre parênteses representa o título de anticorpos obtido para a amostra.

Apêndice C: JORGE, R. S. P.; FERREIRA, F. Evidências de exposição de carnívoros selvagens capturados na RPPN SESC Pantanal, Barão de Melgaço – MT, ao Vírus da Cinomose. In: Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil, Congresso da Associação Latinoamericana de Parques Zoológicos e Aquários, Encontro da Associação Brasiliera de Vaterinários de Animais Selvagens, 31., 14., 16., 2007, São Paulo, Brasil. **Anais...** São Paulo: Sociedade de Zoológicos do Brasil, Associação Latinoamericana de Parques Zoológicos e Aquários, Associação Brasiliera de Vaterinários de Animais Selvagens, 2007. p.1.

XXXI CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE DE ZOOLÓGICOS DO BRASIL - SZB
XIV CONGRESSO ANUAL DA "ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PARQUES ZOOLÓGICOS E ACUARIOS" - ALPZA
XVI ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS - ABRAVAS

EVIDÊNCIAS DE EXPOSIÇÃO DE CARNÍVOROS SELVAGENS CAPTURADOS NA RPPN SESC PANTANAL, BARÃO DE MELGAÇO – MT, AO VÍRUS DA CINOMOSE

Rodrigo Silva Pinto Jorge[1,2,3]; Fernando Ferreira[1].

[1]VPS / FMVZ / USP; [2]CENAP / IBAMA; [3]Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação – Triade. Endereço para correspondência: Av. dos Bandeirantes, s/n°, Atibaia, SP, 12641-680; email: mozlizo@yahoo.com.

Nas últimas décadas, pesquisadores vem atribuindo crescente importância a ocorrência de agentes patogênicos para a conservação de animais selvagens. Epidemias causadas por doenças infecciosas em carnívoros selvagens na África e na América do Norte nas últimas décadas levaram a declínios populacionais significativos em determinadas regiões destes continentes. Devido ao significativo aumento de mortalidade causado pelo vírus da cinomose em populações de diversas espécies de carnívoros selvagens de vida livre, este agente é considerado como um dos que mais ameaça a conservação destes animais. Foram capturados entre 2002 e 2006 na RPPN SESC Pantanal, 75 carnívoros selvagens. Os animais foram anestesiados com tiletamina e zolazepam (Zoletil 50□), na dosagem de 5 a 10 mg/kg, para coleta de sangue. Também foram amostrados 79 cães domésticos em comunidades humanas localizadas ao norte da RPPN. Para a detecção de anticorpos para o vírus da cinomose no soro dos animais capturados, foi realizada a técnica de soroneutralização microscópica. Dentre os carnívoros selvagens, 21 dos 75 animais testados apresentaram título ≥ 8 na sorologia e foram considerados positivos, sendo 12 lobetes *Cerdocyon thous* (12/43), 2 guaxinins *Procyon cancrivorous* (2/13), três lobos-guarás *Chrysocyon brachyurus* (3/8), 3 jaguatiricas *Leopardus pardalis* (3/4) e 1 suçuarana *Puma concolor* (1/7), resultando em uma frequência de 28% [0,182405 < IC 95%< 0,395630]. Dentre os 79 cães domésticos amostrados, 65 (82,28%) foram soropositivos para cinomose [0,720575 < IC 95%< 0,899587]. Os resultados obtidos indicam que os carnívoros selvagens foram expostos ao vírus da cinomose em algum momento de suas vidas. A freqüência de cães domésticos positivos na sorologia foi bastante elevada. A presença do vírus da cinomose nos carnívoros selvagens na região pode causar um declínio na população de carnívoros selvagens da RPPN através da mortalidade de indivíduos adultos em idade reprodutiva ou da mortalidade de filhotes com idade de três a seis meses, período de queda dos anticorpos maternos, ou de ambos os fatores associados. A maior frequência de positivos entre os cães domésticos indica que a maior probabilidade é que a transmissão deva ter ocorrido destes para os carnívoros selvagens. A alternativa para diminuir o impacto de doenças infecciosas na população de carnívoros selvagens seria controlar o agente nos cães domésticos. Para isto, seria necessário realizar campanhas anuais de vacinação para a cinomose, e outros agentes patogênicos importantes, nos cães domésticos das comunidades do entorno da RPPN por diversos anos consecutivos, além de aplicar técnicas para o controle da população de cães nestas comunidades.

Apoio: SESC, CNPq, BIOVET, CENAP / IBAMA.

Apêndice D: JORGE, R. S. P.; NUNES, C. M.; TRINCONI, C. M.; PAULA, H. B.; DIAS, A. K. K.; FERREIRA, F. *Leishmânia* spp. in wild carnivores in the Pantanal, Brazil. In: Annual Wildlife Disease Association Conference, 56., Estes Park, Colorado, EUA. **Proceedings…** Estes Park: Wildlife Disease Association, 2007. p. 42.

56th Annual Wildlife Disease Association Conference
Estes Park, Colorado, USA 2007

[54] *LEISHMANIA* SPP. IN WILD CARNIVORES CAPTURED IN THE PANTANAL, BRAZIL

Rodrigo Silva Pinto Jorge[1,2,3], Cáris Maroni Nunes[4], Cristiana de Melo Trinconi[4], Henrique Borges de Paula[4], Ana Karina Kerche Dias[5], Fernando Ferreira[1].
1- Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health of the University of São Paulo, Brazil; 2 – Predator National Center (CENAP), IBAMA, Atibaia, Brazil; 3 – Brazilian Institute of Conservation Medicine – Triade, São Paulo, Brazil; 4 – Veterinary Medicine Course, UNESP, Araçatuba, Brazil; 5 - Institute of Biosciences/UNESP, Botucatu, Brazil.

Visceral Leishmanisis (VL) is a Public Health problem of major concern. In Latin America, 90% of the cases occur in Brazil, where approximately 4000 new human cases happen every year and 5 to 10% of these people die. VL in Brazil is caused by the protozoan *Leishmania chagasi*. The main vector involved in its transmission is *Lutzomyia longipalpis* and the domestic dog is considered the main reservoir. Wild canids have also been found naturally infected. Thus, they are considered important potential reservoirs, although their role in the cycle of the disease is not well understood. From 2002 to 2006, 16 free-ranging wild carnivores were captured (including 9 crab-eating foxes *Cerdocyon thous*, 4 racoons *Procyon cancrivorous*, 2 maned wolves *Chrysocyon brachyurus* and 1 ocelot *Leopardus pardalis*) in the Pantanal and blood samples were collected and preserved. Additionally, 70 domestic dogs from the surrounding settlements were also sampled. Search for *Leishmania* spp. kDNA was performed by Polimerase Chain Reaction (PCR). Six wild carnivores (3/9 crab-eating foxes, 1/4 raccons, 1/2 maned wolves, 1/1 ocelot) and 20 domestic dogs were positive. These results suggest the presence and natural transmission of the agent in the region, including the sylvatic environment. The differentiation between the *Leishmania* species will be done in the near future, allowing the elaboration of specific measures aiming to control this zoonotic disease in the region. Additionally, the potential impact of leishmaniasis on the conservation of wild carnivores should be further discussed.

Support: SESC, CNPq.

Apêndice E: JORGE, R. S. P.; MORATO, R. G.; PEREIRA, M.; LIMA, E. S.; SCHEFFER, K.; CARNIELI Jr., P.; KOTAIT, I.; FERREIRA, F. Rabies antibodies in a bush dog in the Pantanal, Brazil. In: Annual Wildlife Disease Association Conference, 56., Estes Park, Colorado, EUA. **Proceedings…** Estes Park: Wildlife Disease Association, 2007. p. 94.

[144] RABIES ANTIBODIES IN A BUSH DOG CAPTURED IN THE PANTANAL, BRAZIL

Rodrigo S. P. Jorge[1,2,3], Ronaldo G. Morato[2], Monicque Pereira[2], Edson S. Lima[3], Karin Scheffer[4], Pedro Carnieli Jr. [4], Ivanete Kotait[4], Fernando Ferreira[1].
1- Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health of the University of São Paulo, Brazil; 2 – Predator National Center (CENAP), IBAMA, Atibaia, Brazil; 3 – Brazilian Institute of Conservation Medicine – Triade, São Paulo, Brazil; 4 – Instituto Pasteur, São Paulo, Brazil

Rabies is an important issue for Public Health throughout the world. Although it has been controlled in developed countries, most of the developing regions of the world, including Latin America, still have high rates of occurrence. In Brazil, where efforts to control the incidence of rabies in humans have been focused in controlling the disease in dogs and cats through vaccination, it is likely that the silvatic cycle may increase its importance. The disease also represents a threat to wildlife, especially carnivores. From 2002 to 2006, 76 free-ranging wild carnivores were captured in the Pantanal and serum samples were collected, including 43 crab-eating foxes *Cerdocyon thous*, 13 racoons *Procyon cancrivorous* , 8 maned wolves *Chrysocyon brachyurus*, 7 pumas *Puma concolor*, 4 ocelots *Leopardus pardalis* and 1 bush dog *Speothos venaticus*. Additionally, 102 domestic dogs from the surrounding settlements were also sampled. They were all tested for the presence of rabies neutralizing antibodies with a simplified fluorescence inhibition microtest (SFIMT). One bush dog and 14 domestic dogs presented a titer > 0,50 IU/mL, which demonstrates exposure to the virus or vaccination. The diagnosis of a wild non-vaccinated positive animal shows the presence of the virus in the region. Among the positive domestic dogs, 12 were vaccinated and the information given by their owners that the other 2 positive animals had not been vaccinated should be seen with caution. Based on these results, we discuss the possibilities of exposure of the non-vaccinated animals to the virus.

Support: CNPq, PIBIC, SESC.