

EDMILSON FERREIRA DE OLIVEIRA FILHO

SOROLOGIA PARA O VIRUS DA PSEUDORAIVA (VPr) E *Brucella abortus* EM CARNÍVOROS SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA.

RECIFE
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

EDMILSON FERREIRA DE OLIVEIRA FILHO

SOROLOGIA PARA O VIRUS DA PSEUDORAIVA (VPr) E *Brucella abortus* EM CARNÍVOROS SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:
Prof. Dr Fabrício Bezerra de Sá

**RECIFE
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

SOROLOGIA PARA O VIRUS DA PSEUDORAIVA (VPr) E *Brucella abortus* EM CARNÍVOROS SILVESTRES MANTIDOS EM CATIVEIRO NOS ESTADOS DE PERNAMBUCO E PARAÍBA.

**Dissertação de Mestrado elaborada por
EDMILSON FERREIRA DE OLIVEIRA FILHO**

Aprovada em 03/08/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. FABRÍCIO BEZERRA DE SÁ

Orientador – DFMA/UFRPE

Prof. Dr. RINALDO APARECIDO MOTA

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. JEAN CARLOS RAMOS SILVA

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Dr^a. ADRIANA SOARES LEITE

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Dedicatória

Dedico a todos os obstáculos que surgiram no meu caminho durante esse período, pois me ajudaram a crescer para atingir o meu objetivo.

Agradecimentos

Ao orientador e amigo Prof. Fabrício por toda atenção, paciência e principalmente por ter aceitado esse nosso grande desafio ao escolher esse tema.

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

Aos professores Jean Silva, Roberto Soares, Rinaldo Mota, Leonildo Bento pela atenção, orientação, e por disponibilizar as instalações.

Ao fundamental apoio prestado pelo LANAGRO – PE em nome da Dra. Diana Sione, cedendo as instalações e possibilitando a realização deste trabalho. E, em especial, a todos que compõem os Laboratórios de Virologia e Bacteriologia, pela participação fundamental na construção do processo de aprendizagem que permitiu a realização deste trabalho.

A todos que compõem os Zoológicos: Parque de Dois Irmãos (Recife – Pernambuco), Melo Verçosa (Vitória de Santo Antão – Pernambuco) e Arruda Câmara (João Pessoa – Paraíba), tanto por permitirem a realização do trabalho como por todo o apoio dado durante as coletas. Em especial a Luiz Carlos Mafra, Ana Lizia Brito da Cunha, Débora Rochelly e Rivânia Alves de Oliveira e a “Seu Amaro”.

Aos amigos José Wilton Junior, Filipe Dantas Torres, Aderaldo Freitas, pelas valiosas contribuições prestadas na redação do trabalho.

Amigos e companheiros de coletas Taciana Spinelli, Rinaldo Ferri, Fábio Pina e Ílvio Vidal, pela ajuda e aprendizagem.

A minha família, em especial aos meus pais, minha irmã e Bruno, por todo o apoio, principalmente nas horas mais difíceis.

E por fim, a todos que contribuíra direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Epígrafe

“Assim como o homem carrega o peso do próprio corpo sem o sentir, mas sente o de qualquer outro corpo que quer mover, também não nota os próprios defeitos e vícios, mas só os dos outros. Entretanto, cada um tem no seu próximo um espelho, no qual vê claramente os próprios vícios, defeitos, maus hábitos e repugnâncias de todo o tipo. Porém, na maioria das vezes, faz como o cão, que ladra diante do espelho por não saber que se vê a si mesmo, crendo ver outro cão”.

Arthur Schopenhauer, em “Aforismos para a Sabedoria de Vida”

Resumo: A brucelose é uma doença emergente a sua complexidade devido ao grande número de espécies da bactéria envolvidas e cada uma delas apresenta distintos fatores epidemiológicos, particulares da patogenia de cada espécie. A Doença de Aujeszky apresenta um grande risco potencial de se transformar em uma doença emergente devido à grande variação de hospedeiros e a capacidade dos vírus da família herpesviridae saltar para outras espécies. Objetivou-se com esse estudo realizar a pesquisa de anticorpos anti-Vírus da Pseudorraiva (VPr), e anti-*Brucella abortus* em carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiro nos estados de Pernambuco e Paraíba. Foram utilizadas 42 amostras de soro, provenientes da população de 17 quatis (*Nasua nasua*), oito guaxinins (*Procyon cancrivorus*), três raposas (*Cerdocyon thous*), três raposas-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e dois gatos-do-mato (*Leopardus tigrinus*), cinco papa-méis (*Eira barbara*), dois furões (*Galictis vittata*) e duas lontras (*Lontra longicaudis*), oriundos das populações do Horto de Dois Irmãos (Recife, PE), Zoológico Municipal Melo Verçosa (Vitória de Santo Antão, PE) e o Parque Zoobotânico Arruda Câmara (João Pessoa, PB). As amostras foram submetidas aos testes de vírusneutralização para a pesquisa de anticorpos anti-VPr e os testes do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e Fixação do Complemento (FC) para a pesquisa de anticorpos anti *B. Abortus*. Na prova de soroneutralização, nenhuma amostra testada demonstrou presença de anticorpos anti-VPr. Na pesquisa de anticorpos para *B. abortus* foram encontrados um total 19 (45,34%) amostras negativas, 23 (54,76%) amostras positivas na prova do AAT e 15 (80,5%) das amostras negativas e 8 (19,5%) amostras positivas no teste de FC. Em relação a Pseudorraiva mais estudos serão necessários incluindo animais de vida livre e domésticos, para determinar se ocorre ou não a circulação do vírus na região. Esse foi o primeiro relato de anticorpos contra *B. abortus* nessas espécies. Os resultados aqui apresentados estão longe de incriminar alguma dessas espécies como um reservatório silvestre bem como interferir no programa nacional de controle. No entanto, o desconhecimento dos aspectos epidemiológicos nas populações silvestres é com certeza um obstáculo para avaliar o Programa Nacional de Controle da Brucelose no Brasil.

Palavras-chave: Neotropical, Carnívoros, Brucelose, Doença de Aujeszky

Abstract: Brucellosis is an emergent disease and its complexity because the large number of bacterial involved species and also each one shows different epidemiological aspects associated to the pathogenesis in each host species. Aujeszky Disease has also a big potential to become an emergent disease as a consequence to the large host range and the ability to the viruses from *Herpesviridae* family jump to another species. The aim of this study was determine the *Brucella abortus* and Pseudorabies virus (PrV) prevalence in neotropical captive wild carnivores from three Zoos in the northeast of Brazil. Blood samples were collected from 42 animals, including 17 coatis (*Nasua nasua*), eight crab-eating raccoons (*Procyon cancrivorus*), three crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), three hoary foxes (*Lycalopex vetulus*), two little spotted cats (*Leopardus tigrinus*), five tayras (*Eira barbara*), two greater grisons (*Galictis vittata*) and two neotropical river otters (*Lontra longicaudis*). To detect *B. abortus* antibodies, two different serological tests were performed; the Rose-Bengal test (RBT) and the Complement Fixation Test (CFT) and to detect PrV antibodies the virusneutralization was performed. Antibodies to PrV were not detected. Our results showed 19 (45.34%) negative and 23 (54.76%) positive in BBAT test. On CFT 8 (19.50%) were positive and 15 (80.50%). To determine the Pseudorabies epidemiological situation more studies should be necessary in another keep-in-captivity and also in free-range animal populations to well conclude that this virus is not present in these neotropical wild carnivores populations. We are far to incriminate any of these species as wild reservoir and as interfering with national control programs. However, the lack of knowledge of epidemiological aspects in wild populations certainly is an obstruction to evaluate the Brucellosis control program in this country.

Keywords: Pseudorabies virus (PrV), Aujeszky disease, carnivores, neotropical.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	OBJETIVOS	02
1.1.1	Objetivos gerais	02
1.1.2	Objetivos específicos	02
2	REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1	Contribuição para a investigação de surtos envolvendo animais silvestres mantidos em cativeiro	03
2.2	Definindo os surtos	04
2.3	Surtos em animais em cativeiro	05
2.4	Importância dos animais mantidos em cativeiro na conservação das espécies	06
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	07
3	REFERÊNCIAS	08
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	13
4.1	Pesquisa de anticorpos anti-virus da pseudorraiva (VPr) em carnívoros neotropicais mantidos em cativeiro nos estados de Pernambuco e Paraíba	13
4.1.1	Introdução	14
4.1.2	Material e Métodos	15
4.1.3	Resultados e discussão	16
4.1.4	Referências	18
4.2	Freqüência de aglutininas anti – <i>Brucella abortus</i> em Carnívoros silvestre	20

neotropicais mantidos em cativeiros nos Estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.....	
4.2.1 Introdução	21
4.2.2 Material e Métodos	22
4.2.3 Resultados	23
4.2.4 Discussão	25
4.2.5 Referências	27

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequência de Aglutininas Anti – <i>Brucella abortus</i> na prova AAT e pelo teste de FC	24
--	-----------

1. Introdução

A diversidade biológica global está diminuindo em uma taxa sem precedentes, e isso principalmente como resposta às diversas modificações realizadas pelo homem no meio ambiente. A magnitude dessas mudanças está cada vez mais relacionada às alterações no ecossistema e a utilização ainda desordenada dos recursos naturais pela humanidade (SALA, et al., 2000). Estas alterações estão presentes principalmente em regiões tipicamente menos industrializadas de países em desenvolvimento, em zonas tropicais e subtropicais, onde conflitos originam-se entre as necessidades físicas devido ao aumento do crescimento populacional e a necessidade de conservar os recursos biológicos e a diversidade. Isso reforça a indispensabilidade de um enfoque multidisciplinar, conectando-se com as perdas na diversidade biológica, investigando o impacto humano e outros impactos, com o intuito de desenvolver métodos para prevenção da extinção das espécies (KELLY e ENGLISH, 1997).

A captura e reintrodução de animais como um mecanismo de conservação de espécies ameaçadas tem como um grande obstáculo a ocorrência de doenças infecciosas. Muitos exemplos já demonstraram a magnitude do problema, tornando-o mais evidente e, conseqüentemente, ganhando maior relevância nos programas de conservação para as espécies em perigo. Atualmente, já existem algumas abordagens onde as doenças infecciosas são consideradas na análise do risco de extinção (LAFFERTY e GERBER, 2002).

A maioria das doenças infecciosas que representam um grande risco de emergência e reemergência são aquelas que apresentam uma grande variação de hospedeiros, ou ainda aquelas que possuem em sua cadeia epidemiológica espécies consideradas hospedeiros acidentais. Isso pode ocorrer devido a diversos fatores como a introdução de novas espécies, degradação do meio ambiente, alterações climáticas e a poluição (TAYLOR et al., 2001; CLEAVELAND, 2001; LAFFERTY e GERBER, 2002).

Dentro desse contexto, a brucelose é uma doença emergente considerando sua complexidade e o grande número de espécies envolvidas. Além disso cada uma destas apresenta distintos fatores epidemiológicos particulares da patogenia de cada espécie (CORBEL, 1997). Ao passo que a Doença de Aujeszky, causada por um vírus da família

herpesviridae, apresenta um grande risco potencial de se transformar em uma doença emergente devido à grande variação de hospedeiros e a capacidade dos vírus dessa família saltarem para outras, além disso, devido à alta morbidade e mortalidade relacionadas aos vírus dessa família observadas em outros hospedeiros (EBERLE and HILLIARD, 1996; TAKASHIMA and OTSUKA, 2000), deve ser considerado risco potencial para a emergência. (CLEAVELAND et al., 2001).

Portanto, faz-se necessário realizar o monitoramento dessas doenças, reduzindo os aglomerados populacionais e os fatores que tornam as populações mais susceptíveis, com o objetivo de auxiliar na compreensão e minimizar os riscos de emergência (LAFFERTY e GERBER, 2002).

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Estudar a ocorrência de doenças infecciosas em carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiros nos estados de Pernambuco e Paraíba, verificando o impacto para a saúde animal e para saúde pública.

1.1.2 Específicos

Determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*Brucella abortus* utilizando as técnicas do AAT e da FC em populações de carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiros nos estados de Pernambuco e Paraíba.

Determinar a soroprevalência de anticorpos anti-VPr através da virusneutralização em populações de carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiros nos estados de Pernambuco e Paraíba.

2. Revisão de Literatura

2.1 Contribuição para a investigação de surtos envolvendo animais silvestres mantidos em cativeiro: revisão de literatura.

Nas últimas décadas o mundo testemunhou as grandes e drásticas mudanças globais (ex., mudanças e variações climáticas, uso da terra e urbanização), o que potencializou a vulnerabilidade dos seres humanos a doenças infecciosas (SPENCER, 1993; HARVELL et al., 2002). Essas mudanças provocaram a emergência e reemergência de algumas epidemias como febres hemorrágicas, síndrome respiratória aguda (SARS) e os subtipos combinados de influenza H5 e N1 (H5N1), a *Escherichia coli* O157:H7, o ressurgimento da tuberculose e da cólera. As espécies silvestres desenvolvem um papel fundamental na epidemiologia em algumas dessas doenças infecciosas, que são de grande preocupação de saúde pública, devido às altas taxas de mortalidade e o grande impacto socioeconômico (BARATA, 1997; IZUMIYA et al., 1997; DASZAK et al., 2000; CUNNINGHAM, 2005; WHO, 2006).

Além disso, a destruição dos habitats resultou no declínio da população silvestre, encorajando a adaptação de algumas espécies a novos nichos ecológicos. Com essa mudança no ecossistema, a relação entre animais e humanos torna-se progressivamente mais próxima, trazendo uma ameaça potencial à saúde humana (WESTERN, 2001; HARVELL et al., 2002).

Grande parte das doenças emergentes e reemergentes que afetam a população humana são zoonoses (TAYLOR et al., 2001; LARSEN, 2006); que são infecções naturalmente transmissíveis entre animais vertebrados e humanos e vice versa. Além disso, a alta morbidade e mortalidade potenciais dessas doenças enfatizam a sua grande importância para saúde pública. (CLEAVELAND et al., 2001).

Os animais silvestres são componentes essenciais na epidemiologia de muitas, se não da maioria das zoonoses, e isto deve ser levado em consideração na análise do risco, principalmente pelo fato de que, na maioria das vezes, o real motivo da emergência dessas doenças permanece desconhecido (DASZAK et al., 2000; TAYLOR et al., 2001). Portanto, faz-se necessário aumentar e melhorar a capacidade de reconhecer zoonoses dentro de populações reservatórios silvestres de diversos patógenos. Assim como o aprimoramento

dos sistemas nacionais de vigilância dessas enfermidades infecciosas em humanos e animais, funcionando de forma integrada entre si e com os sistemas de outros países, sobretudo dos que apresentam fronteiras em comum. Portanto, mais pesquisas são necessárias para compreender melhor a epidemiologia e a patogenia de várias zoonoses envolvendo as espécies silvestres (MAINKA, 2001; LETKOVÁ et al., 2006).

Dentro dessa perspectiva os animais mantidos em cativeiro podem ser de fundamental importância, principalmente pela facilidade de acesso e a maior proximidade com o homem. Além disso, grande parte destes animais é proveniente de ambientes selvagens, funcionando como sentinela. Portanto, objetivou-se com essa revisão buscar informações sobre diversos surtos de doenças infecciosas ocorridos em zoológicos, bem como descrever a importância da investigação destes na conservação das espécies e para a saúde pública disponíveis na literatura especializada.

2.2 Definindo os surtos

Uma epidemia, ou surto, pode ser definida como a ocorrência de um agravo em uma frequência não-usual ou inesperada (JEKEL et al., 2003), ou como uma alteração, espacial e cronologicamente delimitada, do estado de saúde-doença de uma população, caracterizada por uma elevação progressivamente crescente, inesperada e descontrolada dos coeficientes de incidência de determinada doença ou agravo, ultrapassando e reiterando valores acima do limiar epidêmico preestabelecido. Já o surto caracteriza-se por uma ocorrência epidêmica restrita a um espaço extremamente delimitado (ROUQUAYROL, 2003).

Agravos inusitados à saúde animal ou humana podem representar ameaças que precisam ser identificadas e controladas (TEIXEIRA et al., 2003), e o objeto torna-se ainda mais complexo quando consideramos as peculiaridades descritas em estudos de surtos nas populações de animais mantidas em cativeiro (BOORMAN et al., 1977; BOJESSEN et al., 2006; OH et al., 2002; GUPTA e CHAKRABORTY, 2005), pois, a percepção de uma epidemia só se efetivará se a doença deixar transparecer sintomas e sinais clínicos característicos, comuns a todos os indivíduos afetados (ROUQUAYROL, 2003).

Embora o processo saúde-doença nesses animais se apresente de forma diferenciada, quando da ocorrência destes agravos, a investigação epidemiológica deve ser

iniciada imediatamente após a notificação de casos isolados ou agregados de doença ou agravo, sejam eles suspeitos clinicamente declarados ou que estiveram em contato (TEIXEIRA et al., 2003) com os animais doentes.

2.3 Surtos em animais em cativeiro

Surtos em animais de zoológico aparentemente são freqüentes e ainda que em muitos casos não seja dada a devida atenção nem realizada a investigação adequada, existem alguns relatos. Em 2001, foi relatado o primeiro surto de hepatite viral causada por um vírus da família *Arenaviridae* levando ao óbito de calitriquídeos em um zoológico na cidade de Dortmund na Alemanha (ASPER et al., 2001). Em ruminantes no zoológico de Minnesota nos EUA foi descrito um surto causado por vírus do gênero *Parapoxvirus* (GUO et al., 2004). No Japão, após a realização de dois estudos de prevalência com intervalo de quatro anos, foi sugerida a existência de surto envolvendo o vírus da cinomose em leões (ENDO et al., 2004). Um estudo realizado em uma área em volta do zoológico de Chicago-EUA demonstrou o envolvimento de diferentes linhagens do vírus da cinomose envolvidas em surtos em raccoons (LEDNICKY, et al., 2004).

No Zoológico de Los Angeles-EUA, entre 1997 e 2000 foi realizado um estudo em diferentes espécies animais e, após ser isolado *Microbacterium tuberculosis* em lesões pulmonares de um elefante asiático, foi relatada infecção multiespécie com comprovação de análise de DNA entre dois elefantes, três cabras-das-montanhas-rochosas (*Oreamnos americanus*), um rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) e trabalhadores do zoológico (OH et al., 2002). Na Áustria foi descrito um surto de shigelose envolvendo primatas não humanos (*Macaca sylvanus*, *Pongo pygmaeus*) e humanos no zoológico de Viena, na ocasião sendo classificada como uma zoonose ocupacional (LEDERER et al., 2005). Na Dinamarca, recentemente foi relatado um caso fatal de enterocolite envolvendo dois elefantes-asiáticos (*Elephas maximus*) causada por *Clostridium difficile* (BOJESSEN et al., 2003).

Embora não sejam muito freqüentes, surtos envolvendo doenças parasitárias também foram descritos. Em 1977, ocorreu um surto devastador de toxoplasmose, levando a óbito quase 100% dos Kangurus (*Macropus robustus*) no Zoológico da Califórnia

(BOORMAN et al., 1977). No ano de 2005, foi relatado um surto de *Echinococcus multilocularis* causando morte em primatas (*Macaca fuscata*) no Zoológico de Hokkaido, no Japão (SATO et al., 2005). Dentro do contexto de desequilíbrio ambiental e alteração na biodiversidade, os artrópodes apresentam-se como potenciais transmissores de numerosos agentes patogênicos incluindo vírus, riquetsias (bactérias) e protozoários para o homem e outros animais (SERRA-FREIRA, 2001). Diante disso, já foi relatada a ocorrência de diversas espécies de carrapatos em carnívoros no Brasil (LABRUNA et al., 2005).

Embora exista uma quantidade relativamente alta de relatos de surtos em animais mantidos em cativeiro, não existem muitos trabalhos descrevendo a forma de investigação desses surtos, freqüentemente realizada de forma peculiar, bem como sua importância para a saúde pública.

2.4 Importância dos animais mantidos em cativeiro na conservação das espécies

Historicamente, o homem vem caçando os outros animais, inclusive, algumas teorias colocam a importância da caça de grandes animais na evolução do *Homo sapiens* (SZPILMAN, 2007). Inicialmente isso estava relacionado ao consumo para alimentação e vestimentas e por esporte. Em seguida, mas ainda em um passado recente, também foi realizada a captura de animais para exibição em zoológicos para o lazer e divertimento humano. Desta forma, tradicionalmente o zoológico era um lugar em que as pessoas visitavam para satisfazer a curiosidade de ver animais de espécies exóticas e silvestres (GUPTA & CHAKRABORTY, 2005).

No entanto, nas últimas décadas esse cenário vem sofrendo grandes mudanças principalmente em dois fatores. O primeiro com a mudança da percepção da sociedade em relação ao papel desenvolvido pelos zoológicos, processo que começou no início dos anos 60 com o surgimento dos movimentos de direito dos animais. O segundo fator é o aumento da dificuldade de encontrar animais silvestres para exibição em Zoológicos, por estes estarem cada vez menos presentes na natureza. Aliado a isso nos últimos anos, devido à grande destruição provocada pela atividade humana no planeta e o impacto na biodiversidade contribuiu para mudança da opinião pública tornando-se contra a aquisição

de animais no habitat natural para exibição em Zoológicos (WESTERN, 2001; GUPTA & CHAKRABORTY, 2005).

Portanto, a função desempenhada pelos zoológicos de fato mudou, e hoje vai muito mais além do que o simples entretenimento e diversão, desenvolvendo um papel fundamental na conservação de espécies ameaçadas, na educação ambiental para toda sociedade, reabilitação de animais mantidos em circos ou em cativeiros que foram mantidos em condições inadequadas (MAINKA, 2001; GUPTA & CHAKRABORTY, 2005) e animais interceptados no tráfico pelas autoridades de fiscalização.

Os Zoológicos desenvolvem também um papel fundamental na translocação e reintrodução, que são temas que se tornam cada vez mais importantes ao passo que os habitats naturais estão sendo destruídos, tendo como exemplo programas específicos de reprodução das espécies ameaçadas (SPENCER, 1993).

Dentro dessa perspectiva, os zoológicos representam um papel fundamental no desenvolvimento de pesquisas, sejam para conservação ou para o estudo das doenças, agravos nesses animais (SPENCER, 1993; MAINKA, 2001; GUPTA & CHAKRABORTY, 2005), descrevendo relações agente-hospedeiro sejam elas corriqueiras, emergentes ou reemergentes (BOORMAN et al., 1977). Portanto, a observação de surtos nesses animais é uma das ferramentas essenciais.

2.5 Considerações Finais

Diante do exposto é inegável a importância do estudo das doenças dos animais silvestres em cativeiro, sejam exóticos ou nativos, sobretudo quando ocorrem surtos ou eventos incomuns. Devido às particularidades existentes e pela inexistência de um modelo para se realizar uma investigação nesses animais, todos os eventos devem ser cuidadosamente investigados e divulgados. Sendo assim, mais pesquisas são necessárias para compreender melhor a epidemiologia e a patogenia das diversas doenças infecciosas que envolvem estes animais, principalmente no que concerne ao seu potencial zoonótico, ao impacto socioeconômico e ao risco para a saúde pública.

3. Referências

ASPER, M.; HOFMANN, P.; OSMANN, C.; et al.. First outbreak of callitrichid hepatitis in Germany: genetic characterization of the causative lymphocytic choriomeningitis virus strains. **Virology**. v. 284 n. 2, p. 203-213, 2001.

BARATA, R.C.B.. The challenge of emergent diseases and the return to descriptive epidemiology. **Rev. Saude Publica**. v. 31, p. 531–537, 1997.

BOJESEN, A.M., OLSEN, K.E., BERTELSEN, M.F.. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. **Vet. Microbiol**. v.116, n. 4, p. 329-335, 2006.

BOORMAN, G.A.; KOLLIAS, G.V.; TAYLOR, R.F. An outbreak of toxoplasmosis in wallaroos (*Macropus robustus*) in a California zoo. **J. Wildl. Dis.** v. 13, n. 1, p. 64-68, 1977.

CLEAVELAND, S.; LAURENSEN, M.K.; TAYLOR, L.H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 356, p. 991–999, 2001.

CORBEL, M.J. Brucellosis: an Overview. *Emerg. Infect. Dis.* v. 3, n. 2, p. 213-221, 1997.

CUNNINGHAM, A.C.. A walk on the wild side – emerging wildlife diseases. **BMJ**. v. 331, p. 1214 – 1215, 2005.

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

ENDO, Y.; UEMA, M.; MIURA, R.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; TSUJIMOTO, H.; MONEDA, K.; KAI, C. Prevalence of canine distemper virus, feline immunodeficiency

virus and feline leukemia virus in captive African lions (*Panthera leo*) in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** v. 66, n. 12, p. 1587-1589, 2004.

ERBELE, R.; HILLIARD, J. The simian herpesviruses. **Infect Agents Dis.** v. 4: p. 55-70, 1995.

GUO J., RASMUSSEN, J.; WÜNSCHMANN, A.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.. Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. **Vet. Microbiol.** v. 99. p. 81-92, 2004.

GUPTA, B.K.; CHAKRABORTY, B. The role of zoos in the rehabilitation of animals in the circus. **J. Appl. Anim. Welf. Sci.** v. 8, n.4, p. 285-294, 2005.

HARVELL, C.D.; MITCHELL, C.E.; WARD, J.R.; ALTIZER, S.; DOBSON, A.P.; OSTFELD, R.S.; SAMUEL, M.D. Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. **Science.** v. 296, p. 2158-2162, 2002.

HAYDON, D.T.; CLEVELAND, S.; TAYLOR, L.H.; LAURENSEN, M.K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerg. Infect. Dis.** v. 8, n. 12, p. 1468-1473, 2002.

IZUMIYA, H.; TERAJIMA, J.; WADA, A.; INAGAKI, Y.; ITOH, K.; TAMURA, K.; WATANABE, H.. Molecular Typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates in Japan by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, n. 7, p. 1675-1680, 1997.

JEKEL, J.F.; KATZ, D.L.; ELMORE, J.G. Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva, 2ª ed. Tradução Jair Ferreira. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap 3, p. 54-74.

KELLY, J.D.; ENGLISH, A.W. Conservation biology and the preservation of biodiversity in Australia: a role for zoos and the veterinary profession. **Aust. Vet. J** v. 75, n.8, p. 568-74, 1997.

LABRUNA, M.B; JORGE, R.S; SANA, D.A.; JÁCOMO, A.T.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M. et al. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Exp. Appl. Acarol.** v. 36, n.1-2, p. 149-163, 2005.

LAFFERTY, K.D., GERBER, L.R. Good Medicine for Conservation Biology: the Intersection of Epidemiology and Conservation Theory. **Conserv. Biol.** v. 16, n. 3, p. 593-604, 2002.

LARSEN, R.S. Emerging zoonoses and pathogens of public health concern. **J. Zoo Wildl. Med.** v. 37, p. 574–575, 2006.

LEDERER, I.; MUCH, P.; ALLERBERGER, F.; VORACEK, T.; VIELGRADER, H. Outbreak of shigellosis in the Vienna Zoo affecting human and non-human primates. **Int. J. Infect. Dis.** v. 9, p. 290-291, 2005.

LEDNICKY, J.A.; DUBACH, J.; KINSEL, M.J.; MEEHAN, T.P.; BOCCHETTA, M.; HUNGERFORD, L.L.; SARICH, N.A.; WITECKI, K.E.; BRAID, M.D.; PEDRAK, C.; HOUDE, C.M. Genetically distant American *Canine distemper virus* lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. **Viol. J.** v.1 n.2, p.1-14, 2004.

LETKOVÁ, V.; LAZAR, P.; CURLIK, J.; GOLDOVÁ, M.; KOCISOVÁ, A.; KOSUTHOVÁ, L.; MOJZISOVÁ, J. The red fox (*Vulpes vulpes*) as a source of zoonoses. **Veterinarski Arhiv.** v. 76, p. 73-91, 2006.

MAINKA, A.S. THE VETERINARIAN'S ROLE IN BIODIVERSITY CONSERVATION. **J. Zoo Wildl. Med.** v. 32, n.2, p. 165–167, 2001.

OH, P.; GRANICH, R.; SCOTT, J.; SUN, B.; JOSEPH, M.; STRINGFIELD, C.; THISDELL, S.; STALEY, J.; WORKMAN-MALCOLM, D.; BORENSTEIN, L.; LEHNKERING, E.; RYAN, P.; SOUKUP, J.; NITTA, A.; FLOOD, J. Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. **Emerg. Infect. Dis.** v.8, n. 11, p. 1290-1293, 2002.

ROUQUAYROL, M.Z. O processo Epidêmico. In: _____ ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA-FILHO, N. *Epidemiologia & Saúde*, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2003. Cap. 5, p. 123–148.

SATO, C.; KAWASE, S.; YANO, S.; PAGANO, H.; FUJIMOTO, S.; KOBAYASHI, N.; MIYAHARA, K.; YAMADA, K.; SATO, M.; KOBAYASHI, Y. Outbreak of larval *Echinococcus multilocularis* infection in Japanese monkey (*Macaca fuscata*) in a zoo, Hokkaido: western blotting patterns in the infected monkeys. **J. Vet. Med. Sci.** v. 67, n.1, p. 133-5, 2005.

TAKASHIMA, Y.; OTSUKA, H. (Pathogenesis of animal herpesviruses to human). **Nippon Rinsho.** v. 58, p. 957–961, 2000.

SALLAS, O.E.; CHAPIN, F.S.; ARMESTO, J.J.; BERLOW, E. et al. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. **Science.** v. 287, n. 5459, p. 1770–1774, 2000.

SERRA-FREIRE, N.M. Ácaros (Carrapatos e Outros). In:_____ Marcondes, C.B. *Entomologia Médica e Veterinária*, 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2001. Cap12, p. 263–316.

SPENCER, L. Zoo and wildlife veterinarians examine their role in conservation. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 202, n. 5, p. 714-717, 1993.

SUTHERST, R.W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 17, p. 136–73, 2004.

SZPILMAN M. Respondendo a uma terceira pergunta: quais foram os fatores seletivos mais importantes que canalizaram a evolução humana? Disponível em <http://www.institutoaqualung.com.br/info_evolucao36.html>. Acesso em 25 jun. 2007.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

Teixeira, M.G.; Junior, J.B.R.; Costa, M.C.N. Vigilância Epidemiológica In: _____ Rouquayrol MZ, Almeida-Filho N. Epidemiologia & Saúde, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap 11, p. 313–356.

WESTERN, D. Human-modified ecosystems and future evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 98, p. 5458 – 5465, 2001.

World Health Organization. 2006. Weekly epidemiological record. 81(38): 357–364. Disponível em: <<http://www.who.int/werhttp://www.who.int/wer/2006/wer8138.pdf>>. Acesso em 12 mar. 2007.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 . Pesquisa de anticorpos anti-virus da pseudorraiva (VPr) em carnívoros neotropicais mantidos em cativeiro nos estados de Pernambuco e Paraíba. *

Resumo: A Doença de Aujeszky é causada por um herpesvirus – Vírus da Pseudorraiva (VPr) – que inicialmente foi detectado em suínos e em seguida em outros mamíferos domésticos e silvestres, inclusive no homem. Foi realizada vírus-neutralização em soros de 42 carnívoros, sendo 17 quatis (*Nasua nasua*), 8 guaxinins (*Procyon cancrivorus*), 3 raposas (*Cerdocyon thous*), 3 raposas-do-campo (*Lycalopex vetulus*) 2 gatos do mato (*Leopardus tigrinus*), 5 papa-méis (*Eira barbara*), 2 furões (*Galictis vittata*) e 2 lontras (*Lontra longicaudis*), provenientes de 3 zoológicos dos Nordeste do Brasil. Nenhuma amostra testada demonstrou presença de anticorpos anti-VPr. Conclui-se que os carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiro nos estados de Pernambuco e Paraíba não apresentaram anticorpos anti-VPr, no entanto mais estudos serão necessários principalmente em animais de vida livre e domésticos, para determinar se ocorre ou não a circulação do vírus na região.

Palavras-chave: Pseudorraiva, Doença de Aujeszky, carnívoros, neotropicais.

Abstract: Aujeszky Disease is caused by an agent from Herpesvirus family, which was firstly detected in swine and, after, there were many reports of infection in others domestics and wild mammals, including humans. Virusneutralization technique was processed using 42 serum samples from wild carnivores, 17 coatis (*Nasua nasua*), 8 crab-Eating raccoons (*Procyon cancrivorus*), 3 crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), 3 hoary foxes (*Lycalopex vetulus*) 2 little spotted cats (*Leopardus tigrinus*), 5 tayras (*Eira barbara*), 2 greater grisons (*Galictis vittata*) e 2 neotropical river otters (*Lontra longicaudis*), from three Zoos from Northeast of Brazil. Antibodies to PrV were not detected. Although more studies should be necessary mainly in free-range animals thus we concluded that this virus is not present in these neotropical wild carnivores keep in captivity populations.

Keywords: Pseudorabies virus (PrV), Aujeszky disease, carnivores, neotropical.

***Virology**

4.1.1 Introdução

A Doença de Aujeszky é causada pelo Vírus da Pseudorraiva (VPr), um *Alphaherpesvirus* da família Herpesviridae conhecido por afetar suínos, causando grande perda econômica. É considerada um grande obstáculo à exploração e ao comércio internacional de suínos em todo mundo (GROFF et al., 2005).

Na América do Norte, relatos de surtos do VPr vêm inicialmente acompanhados de mortalidade de mamíferos silvestres como alguns roedores, guaxinins (*Procyon lotor*) e até marsupiais como gambá de-cara-branca (*Didelphis virginiana*) (WEIGEL et al., 2000; WEIGEL et al., 2003).

A infecção natural por este vírus já foi relatada em várias espécies de canídeos como raposa-do-ártico (*Alopex lagopus*), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (BITSCH & KNOX, 1971); em mustelídeos como texugo (*Meles meles*), furão (*Mustela putorius*) (ESKENS et al., 1981) e doninha-européia (*Mustela lutreola*). Também foi relatada em roedores como o *Microtus arvalis*, cervídeos como o corso (*Capreolus capreolus*) e em lagomorfos como a lebre comum (*Lepus europaeus*) (SKODA e GRUNERT, 1964; ESKENS et al., 1981).

Thawley e Wright (1982), estudando raccoons (*P. lotor*), sugeriram que, devido a alguns sinais clínicos semelhantes às infecções pelo vírus da raiva canina e da cinomose, os profissionais responsáveis por estes animais devem ficar alerta para realizar o diagnóstico adequado e protegendo, assim, a saúde pública. Pois, embora não freqüente, existe relato da infecção no homem (MRAVAK et al., 1987).

Em 1981, Eskens et al. relataram um surto da Doença de Aujeszky em quatis (*Nasua nasua*) e raccoons (*P. lotor*) em um Zoológico na Alemanha. Em 1999, Mitchell et al., em um estudo realizado nos EUA, encontraram uma prevalência de VPR de 17% em raccoons.

Embora ainda exista uma discussão em torno do tema, segundo Weigel et al. (2003) há evidências para incluir o raccoon, como reservatório silvestre do VPr. O mesmo ainda aponta a erradicação do tipo silvestre do VPr como etapa fundamental para o êxito no controle do vírus em suínos.

Devido à proximidade filogenética, a possibilidade destes animais como reservatórios naturais sugerem a possibilidade de que as espécies neotropicais, embora habitando regiões distintas e, conseqüentemente, apresentando diferentes aspectos epidemiológicos, também poderiam estar envolvidas na manutenção deste vírus na natureza. Além disso, a ocorrência da Doença de Aujeszky poderia comprometer a conservação dos animais mantidos em cativeiro. Diante disso objetivou-se, com o presente trabalho, realizar um inquérito sorológico para o Vírus da Pseudorraiva em carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiro nos estados de Pernambuco e Paraíba.

4.1.2 Material e Métodos

Foram utilizados 42 carnívoros, sendo 17 quatis (*Nasua nasua*), 8 guaxinins (*Procyon cancrivorus*), 3 raposas (*Cerdocyon thous*), 3 raposas-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e 2 gatos-do-mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), 5 papa-méis (*Eira barbara*), 2 furões (*Galictis vittata*) e 2 lontras (*Lontra longicaudis*).

Os animais foram provenientes de três zoológicos nos estados de Pernambuco e Paraíba: o Horto de Dois Irmãos em Recife – PE, o Zoológico Municipal Melo Verçosa em Vitória de Santo Antão – PE e o Parque Zoobotânico Arruda Câmara em João Pessoa – PB.

Os animais foram contidos fisicamente com auxílio de puçás e, em seguida submetidos ao protocolo de contenção química com xilazina e quetamina, seguindo as recomendações de Diniz, (1999) e Evans (2005). O sangue foi coletado através da venopunção da jugular externa.

A prova de vírusneutralização foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco, no Ministério da Agricultura (LANAGRO-PE/MAPA), seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2004).

O vírus de Aujeszky, da cepa “Shope” foi inicialmente inoculado em garrafas tipo Roux, contendo cultura de células PK15 (células de rim de suíno cultivadas com meio “Eagle’s Minimum Essential Medium” – MEM – suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 IU/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), para produção de vírus de trabalho. Decorrido o tempo necessário para observação do efeito

citopático, este material passou por ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugado (1000g) e feita alíquotas de 1 mL, e conservado em temperatura de -70°C .

Em seguida foi realizada titulação do vírus em diluições decimais, utilizando um volume de vírus de 50 μL por poço. O título obtido foi de $10^{-5.75}$ TCID₅₀%/50 μL calculado através do pelo Reed and Muench.

Para a realização das análises, os soros foram diluídos em base 2 até a diluição 1:256. Foi adicionada às diluições de soro, uma suspensão de vírus contendo 100 TCID₅₀%/50 μL , e levadas a estufa a 37°C por uma hora, em uma atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Em seguida, foi colocada suspensão de células PK15 (contendo 250.000cél/mL), e o material foi recolocado na estufa por 72 horas.

Após este período, foram observados os poços e anotado em ficha de leitura os que continham efeito citopatogênico. Para validação dos testes foi utilizado como controle soros padrões positivo e negativo, controles de crescimento celular e doses efetivamente utilizadas na prova. As análises foram validadas se todos os controles apresentaram um comportamento esperado e as doses utilizadas efetivamente na prova estiveram entre 30 TCID₅₀%/50 μL e 300 TCID₅₀%/50 μL , sendo observado neste teste 287 TCID₅₀%/50 μL .

4.1.3 Resultados e discussão

Em todos os poços observados houve destruição do tapete celular, o que significa que todas as 42 amostras analisadas não apresentaram anticorpos contra o Vírus da Pseudorraiva. Faz-se necessário acrescentar que todos os controles positivos para o vírus reagiram perfeitamente o que significa que o vírus estava ativo e que prova de soroneutralização ocorreu com sucesso.

Dos 42 animais utilizados nesse estudo, três guaxinins (*Procyon cancrivorus*) apresentavam sinais clínicos oculares como ceratite ulcerativa com vascularização superficial e formação de tecido de granulação. Com sinais clínicos oftálmicos sugestivos de doença viral, além na anamnese foi verificado um histórico de sinais clínicos neurológico, como dismetria. Thawley e Wright (1982) relataram a Doença de Aujeszky relacionada com sinais clínicos neurológicos em raccoons, como desorientação e

incoordenação, no entanto de acordo com resultados obtidos nesse estudo não houve essa associação clínica.

A ausência de anticorpos anti-VPr sugere que a infecção pelo vírus da pseudorraiva não ocorre na população estudada. Esses resultados são compatíveis com a não ocorrência de relatos da doença em animais domésticos, embora tampouco exista relato de estudos epidemiológicos na região.

Mesmo com a situação epidemiológica desconhecida, os resultados aqui encontrados poderiam sugerir a não participação desses carnívoros como reservatórios naturais do VPr, embora não tenham sido estudados animais de vida livre, iria de encontro a afirmação de Platt et al. (1983) que sugere a participação de um outro procionídeo o *Procyon lotor* como um significativo reservatório natural do vírus nos EUA. No entanto, deve-se considerar que são diferentes espécies do gênero *Procyon*, além de diferentes gêneros e famílias da ordem Carnívora, pertencentes a regiões Zoogeográficas diferentes.

Rabinowitz e Potgieter (1984) em um estudo realizado em *P. lotor* de vida livre nos Estados Unidos também não encontraram anticorpos para o VPr. Na ocasião os autores sugeriram que a ausência destes se deve ao fato desse vírus ser fatal a esses animais, portanto não seria surpresa não encontrar anticorpos anti VPr em animais sadios. Essa idéia ainda pode ser corroborada pela alta letalidade demonstrada em um surto da Doença de Aujeszky afetando quatis (*N. nasua*) e raccoons (*P. lotor*), em um Zoológico na Alemanha (Eskens et al., 1981).

Existem diversos estudos sobre VPr em raccoons (*Procyon lotor*) (PLATT et al., 1983; RABINOWITZ e POTGIETER, 1984; MITCHEL et al., 1999; WEIGEL et al., 2000; WEIGEL et al., 2003). No entanto, é necessária bastante cautela quando comparamos esses estudos com o guaxinim da América do Sul (*Procyon cancrivorus*). Pois, além de serem espécies diferentes, o raccoon possui uma relação bem mais próxima do homem e dos animais domésticos de produção (THAWLEY e WRIGHT, 1982), sendo até considerado como sinantrópico, enquanto que o guaxinim é um animal de hábitos selvagens e não é comum sua proximidade ao homem.

Conclui-se que os carnívoros silvestres neotropicais mantidos em cativeiro nos estados de Pernambuco e Paraíba não apresentaram anticorpos anti-VPr, no entanto mais

estudos serão necessários principalmente em animais de vida livre e domésticos, para determinar se ocorre ou não a circulação do vírus na região.

4.1.4 Referências

BITSCH, V., Knox, B., Munch, B., 1969. Cases of pseudorabies in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) and in captive blue foxes (*Alopex Lagopus*) in Denmark. Acta Veterinaria Scandinavica, Copenhagen, 10, 195–196.

ESKENS, V. U.; FRESE, K.; KNECHT-WICKE, E. Aujeszky'sche Krankheit bei südamerikanischen Nasenbären (*Nasua nasua*). **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**. Berlin, v.94, p.105-108, 1981.

Groff FHS, Merlo MA, Stoll PA, Stepan AL, Weiblen R, Flores EF Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. Pesq. Vet. Bras. 25(1):25-30, 2005.

Mitchell MA, Hungford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier R, Dubey JP. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. J Wildl Dis. 1999; 35: 347–355.

Mravak S, Bienzle U, Feldmeier H, Hampl H, Habermehl KO. Pseudorabies in man. Lancet. 1987; 8531: 501–502.

OIE, Aujeszky's Disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2004. Available in http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00041.htm.

PLATT, K.B., Graham, D.L., Faaborg A., 1983. Pseudorabies: experimental studies in raccoons with different virus strains. Journal of Wildlife Diseases, 19, 297–301.

Rabinowitz, A.R., Potgieter, L.N.D., 1984. Serologic survey for selected viruses in a population of raccoons, *Procyon lotor* (L.), in the Great Smoky Mountains. *Journal of Wildlife Diseases*, 20, 146–148.

THAWLEY D.G.; WRIGHT, J.C. Pseudorabies virus infection in raccoons: a review, *Journal of Wildlife Disease*, Ames, v.18, n.1, p. 113-116, 1982.

Weigel RM, EC Hahn, B Paszkiet, G Scherba. Aujeszky's disease virus (ADV) in mammalian wildlife on swine farms in Illinois (USA): Potential for transmission to non-infected herds. *Vet Res*. 2000; 31: 148–149.

4.2 Freqüência de aglutininas anti – *Brucella abortus* em Carnívoros silvestre neotropicais mantidos em cativeiros nos Estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil.*

Resumo: Objetivou-se com o presente trabalho determinar a freqüência de aglutininas anti-*Brucellas abortus* em animais mantidos em cativeiros nos Estados de Pernambuco e Paraíba. Foram utilizadas 42 amostras de carnívoros, sendo 17 quatis (*Nasua nasua*), oito guaxinins (*Procyon cancrivorus*), três raposas (*Cerdocyon thous*), três Raposas do Campo (*Lycalopex vetulus*) e dois gatos do Mato (*Leopardus tigrinus*), cinco papa-méis (*Eira barbara*), dois furões (*Galictis vittata*) e duas lontras (*Lontra longicaudis*). As amostras foram procedentes do Horto de Dois Irmãos (Recife, PE), Zoológico Municipal Melo Verçosa (Vitória de Santo Antão, PE) e o Parque Zoobotânico Arruda Câmara (João Pessoa, PB), foi realizada as provas sorológicas do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e as animais que foram reagentes essa foi realizada a prova de Fixação do Complemento (FC). Foram encontrados um total 19 (45,34%) amostras negativas, 23 (54,76%) amostras positivas na prova do AAT e 15 (80,5%) das amostras negativas e 8 (19,5%) amostras positivas no teste de FC. Os resultados aqui apresentados estão longe de incriminar alguma dessas espécies como um reservatório silvestre bem como interferir no programa nacional de controle. No entanto, o desconhecimento dos aspectos epidemiológicos nas populações silvestres é com certeza um obstáculo para avaliar o Programa Nacional de Controle da Brucelose no Brasil.

Palavras-chave: Brucelose, carnívoros, neotropicais, sorodiagnóstico.

Abstract: The objective of the current study was to determine the antibody prevalence against *Brucella abortus* in neotropical captive wild carnivores from three Zoos in the northeast of Brazil. Blood samples were collected from 42 animals, including 17 coatis (*Nasua nasua*), eight crab-eating raccoons (*Procyon cancrivorus*), three crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), three hoary foxes (*Lycalopex vetulus*), two little spotted cats (*Leopardus tigrinus*), five tayras (*Eira barbara*), two greater grisons (*Galictis vittata*) and two neotropical river otters (*Lontra longicaudis*). Two different serological tests were performed; the Rose-Bengal test (RBT) and the Complement Fixation Test (CFT). Our

results showed 23 (54.76%) positives in the RBT test. On CFT, 8 (19.50%) of the samples were positive. These were the first reports of these host-pathogen associations. The presence of antibodies suggests that these animals had previous contact with *Brucella abortus*, and that certain wildlife species are susceptible. We ignore whether wild neotropical carnivores are naturally affected by *Brucella abortus* and what is the epidemiological significance of this. On the other hand our results do not permit to extrapolate from carnivores to other wild species, and future studies should be developed to clear the role of wildlife populations. We are far to incriminate any of these species as wild reservoir and as interfering with national control programs. However, the lack of knowledge of epidemiological aspects in wild populations certainly is an obstruction to evaluate the Brucellosis control program in this country.

Keywords: Brucellosis, Neotropical, carnivores, serodiagnosis.

4.2.1 Introdução

A brucelose é uma zoonose causada por uma bactéria Gram-negativa do gênero *Brucella*. Ocorre em todo mundo, no entanto, a distribuição das diferentes espécies apresenta variações geográficas (Acha e Szyfres, 2001). Encontra-se amplamente distribuída em animais domésticos e silvestres e em humanos, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 1997).

A infecção natural por *Brucella* se apresenta em uma grande quantidade de espécies silvestres, inclusive com algumas originando focos naturais da infecção (Acha e Szyfres, 2001; Nishi et al., 2002). O estudo da prevalência de brucelose em animais silvestres é importante devido ao envolvimento ecológico entre estes e o gado bovino tanto pelo aspecto econômico relacionado à produção como pelo papel na conservação das espécies silvestres (Acha e Szyfres, 2001; Cleaveland et al., 2001; Lafferty e Gerber, 2002; Zarnke et al., 2006).

Diversos estudos sorológicos e bacteriológicos já foram realizados direcionados para identificação dos potenciais reservatórios da infecção entre os animais silvestres (Szyfres e Tome, 1967; Neiland, 1975; Randhawa et al., 1977; Moore e Schnurrenberger,

1981; Nishi et al., 2002; Zarnke et al., 2006), inclusive sendo apontado como um risco para emergência ou reemergência da infecção em rebanhos domésticos em regiões previamente declaradas como livres (Nishi et al., 2002).

A patogenia da infecção em animais varia de acordo com a espécie e sexo envolvidos, bem como de acordo com a espécie do gênero *Brucella* que está acometendo o mesmo. No entanto, ainda não se sabe exatamente o efeito da brucelose nos carnívoros silvestres, porém, acredita-se que esta doença é responsável por distúrbios reprodutivos e em geral caracteriza-se clinicamente por aborto e natimorto (Randhawa et al., 1977; Acha e Szyfres, 2001).

O contágio ocorre através da ingestão de tecidos contaminados com a bactéria como restos fetais e placenta, além disso, também pode ocorrer através da ingestão de leite, carne e derivados onde a bactéria está presente (Acha e Szyfres, 2001).

O isolamento da *Brucella* sp de líquidos e tecidos orgânicos constitui a prova definitiva para determinar a presença da infecção, apesar da dificuldade de utilização em grande escala, como requer um programa de controle da doença. O isolamento da bactéria deve ser usado quando ocorrerem abortos em uma localidade sem que exista um histórico conhecido de brucelose, ou quando se pretendem utilizar as informações para fins epidemiológicos ou de investigação. Na prática, o diagnóstico da brucelose é feito por meio de testes sorológicos, em que se procuram anticorpos específicos anti-*Brucella* no soro e plasma sanguíneos ou líquidos orgânicos como leite, líquido seminal e muco vaginal (Acha e Szyfres, 2001; Acypreste et al., 2002).

Devido à escassez de dados sobre a ocorrência de brucelose em carnívoros silvestres no continente Sul Americano, objetivou-se com o presente trabalho determinar a frequência de aglutininas anti-*Brucella abortus* em animais mantidos em cativeiros nos Estados de Pernambuco e Paraíba.

4.2.2 Material e Métodos

Foram utilizadas 42 amostras de carnívoros, sendo 17 quatis (*Nasua nasua*), oito guaxinins (*Procyon cancrivorus*), três raposas (*Cerdocyon thous*), três raposas-do-Campo (*Lycalopex vetulus*) e dois gatos-do-mato (*Leopardus tigrinus*), cinco papa-méis (*Eira*

barbara), dois furões (*Galictis vittata*) e duas lontras (*Lontra longicaudis*). As amostras foram procedentes do Horto de Dois Irmãos (Recife, PE), Zoológico Municipal Melo Verçosa (Vitória de Santo Antão, PE) e o Parque Zoobotânico Arruda Câmara (João Pessoa, PB).

Os animais foram capturados e contidos fisicamente de acordo com as recomendações de Evans (2005), utilizando-se puçás e, em seguida submetidos a um protocolo de contenção química com xilazina e quetamina, seguindo as recomendações previamente descritas por Diniz (1999) e Evans (2005). O sangue foi coletado por meio da venopunção da jugular externa.

Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-PE/MAPA) utilizando-se antígeno fornecido pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

Foram realizados o teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e as amostras reagentes ao AAT foram submetidas à prova de fixação do complemento (FC) de acordo com o preconizado pelo MAPA (BRASIL, 2004) com a confirmação do diagnóstico, realizada de acordo com Alton et al. (1998).

A análise estatística foi descritiva calculando-se as frequências absoluta e relativa de acordo com Sampaio (1998).

4.2.3 Resultados

Os resultados da prova de aglutinação pelo AAT encontram-se descritos na tabela 1 e os da prova de Fixação do Complemento na tabela 2.

Em relação à prova do AAT, os resultados demonstraram que todas as famílias estudadas apresentaram aglutininas. No entanto, entre os mustelídeos, a lontra (*Lontra longicaudis*) e entre os canídeos a raposa (*Cerdocyon thous*), foram as únicas espécies que não demonstraram a presença de aglutininas.

Entre as famílias estudadas, embora com resultados variados, todas, apresentaram pelo menos um animal positivo, com exceção das amostras dos felídeos que se apresentaram negativas.

Todas as amostras de quatis (*Nasua nasua*) que foram submetidas a prova de FC, apresentaram resultados negativos, o mesmo acontecendo com as duas amostras de gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*). O restante das amostras das outras espécies e famílias estudadas permaneceu semelhante ao AAT.

Nos carnívoros estudados não foi observado nenhum sinal clínico de brucelose.

Tabela 2 - Frequência de Aglutininas Anti – *Brucella abortus* na prova AAT e pelo teste de FC

Family and species	RBT		CFT	
	Positives			
	A.F.	R.F. (%)	A.F.	R.F. (%)
Procionidae	17	68,0%	4	16,0%
<i>Nasua nasua</i>	13	76,5%	-	-
<i>Procyon cancrivorus</i>	4	50,0%	4	50,0%
Mustelidae	3	33,3%	3	33,3%
<i>Eira barbara</i>	1	20,0%	2	20,0%
<i>Lontra longicaudis</i>	-	-	-	-
<i>Galictis vittata</i>	2	100,0%	2	100,0%
Canidae	1	16,7%	1	16,7%
<i>Cerdocyon thous</i>	-	-	-	-
<i>Lycalopex vetulus</i>	1	33,3%	1	33,3%
Felidae	2	100,0%	-	-
<i>Leopardus tigrinus</i>	2	100,0%	-	-
Total	23	54,7%	8	19,5%

4.2.4 Discussão

A interpretação de resultados utilizando métodos sorológicos desempenha um papel fundamental na determinação da exposição prévia a antígenos do agente etiológico ou infecção atual, sobretudo quando a *B. abortus* é o organismo de interesse (Williams et al., 1991). A presença de aglutininas anti - *Brucella abortus* é sugestiva da ocorrência de um contato prévio destes animais com a bactéria.

A prevalência de anticorpos pode variar de acordo com a técnica utilizada (Williams et al., 1991), o que está de acordo com os nossos resultados. Uma possível explicação seria que a prova da FC detecta a IgG presente no soro e durante o processamento ocorre a inativação da IgM. Portanto isso explicaria os diferentes resultados obtidos nas técnicas de AAT e FC, principalmente nos resultados apresentados pelos quatis, sugerindo que esses animais poderiam apresentar uma infecção recente ou por uma outra bactéria que provocou reação cruzada (Paulin e Ferreira-Neto, 2003).

Os reservatórios não ruminantes do agente também são preocupantes (Moore e Schnurrenberger, 1981). A presença de anticorpos anti *Brucella* sp, em carnívoros silvestres já foi relatada (Randhawa et al., 1977). Szyfres e Tomé (1966, 1967), relataram a presença de brucelose em canídeos na Argentina – raposa cinza (*Dusicyon griseus*) e em graxaim-do-campo (*Dusicyon gymnocercus*). Esta bactéria também já foi relatada e estudada em ursos pardos (*Ursus arctos*) de vida livre no Alaska (Kenneth e Neiland, 1975) e em ursos-negros (*Ursus americanus*) no norte dos EUA (Moore e Schnurrenberger, 1981).

Existem, ainda, relatos dessa bactéria em diferentes espécies de carnívoros como em raccoons (*Procyon lotor*), texugo americano (*Taxidea taxus*), doninha (*Mustela nivalis*), cangambá (*Mephitis mephitis*), “gambá malhado do oeste” (*Spilogale gracilis*), geneta (*Genetta genetta*), hiena malhada (*Crocuta crocuta*), lince-pardos (*Lynx rufus*) e em leões (*Panthera leo*) (Moore e Schnurrenberger, 1981).

Alguns autores sugerem que os carnívoros infectam-se ao se alimentar de presas, principalmente ruminantes (Randhawa et al., 1977) e roedores (Acha e Szyfres, 2001). Uma outra forma muito comum de adquirir a infecção é pela ingestão de fetos, envoltórios fetais, restos de partos e por escavar e alimentar-se de carcaças infectadas (Acha e Szyfres, 2001, Zarnke et al., 2006).

Embora ainda não tenha sido comprovada a transmissão entre carnívoros (Acha e Szyfres, 2001), o comportamento de transportar presas ou carcaças por longas distâncias pode representar, por exemplo, um papel epidemiológico na transmissão da bactéria para os carnívoros silvestres e para os animais domésticos, inclusive os de produção (Zarnke et al., 2006).

Como não existe nenhum trabalho sugerindo os possíveis efeitos da brucelose nas espécies aqui estudadas, poderíamos extrapolar os resultados de alguns estudos experimentais em outros carnívoros (Neiland, 1975; Zarnke et al., 2006) e sugerir a possibilidade de ocorrerem distúrbios reprodutivos nestes animais.

A habilidade dos patógenos infectarem uma grande variedade de hospedeiros foi demonstrada como um fator de risco para a emergência da doença tanto em humanos (Taylor et al., 2001) como em animais (Cleaveland et al., 2001). Patógenos que infectam mais de uma espécie de hospedeiros são, por definição, facilmente encontrados em muitas populações de hospedeiros, algumas das quais podem constituir-se em reservatórios do agente (Haydon et al., 2002).

No norte do Canadá a brucelose é considerada endêmica na população de bisão-dos-bosques (*Bison bison athabasca*) no Wood Buffalo National Park, sendo, inclusive apontados como reservatório (Nishi et al., 2002). O país erradicou a brucelose dos seus rebanhos bovinos por meio de um programa nacional de controle na década de 80, no entanto casos isolados continuam a aparecer, onde o bisão-dos-bosques foi apontado como fonte primária da infecção (Nishi et al., 2002).

Alguns autores sugeriram ainda que os carnívoros poderiam ser reservatórios devido ao fato desses animais possuírem na sua dieta herbívoros, principalmente ruminantes que seriam os tradicionais reservatórios sejam silvestres ou domésticos (Neiland, 1975). No entanto, considerando o conceito amplo de reservatório proposto por Haydon et al. (2002), ainda existem muitas janelas na cadeia epidemiológica para entendermos o verdadeiro papel dos carnívoros na manutenção silvestre do ciclo. Faz-se necessário ressaltar também que esses estudos realizados anteriormente incluíram espécies distintas em diferentes situações ecoepidemiológicas.

Por outro lado, a ocorrência de anticorpos anti-*brucella abortus* nestes animais pode também significar apenas que estes tiveram contato e desenvolveram uma resposta

imunológica contra o antígeno em questão. De qualquer forma, acordando com Szyfres e Tomé (1967), o conhecimento obtido pelos resultados aqui demonstrados não nos permite assegurar que a *Brucella* sp é eliminada naturalmente ou até que grau estes animais podem contribuir na disseminação da brucelose entre os animais da mesma e de outras espécies de vida livre e em cativeiro.

Embora apenas tenham sido estudados animais de cativeiro e mesmo sem ser possível identificar a origem da fonte de infecção, a susceptibilidade demonstrada pelos resultados obtidos nesse estudo levantam algumas hipóteses relacionadas à importância epidemiológica desses animais na transmissão da brucelose. Como exemplo, a possibilidade de ocorrer o envolvimento de espécies de vida livre; e desta forma, ocorrer a transmissão para as espécies domésticas. Uma outra questão levantada está relacionada as implicações dessa possível transmissão e os seus possíveis reservatórios apresentariam no controle da doença, sendo sugerida a possibilidade de existir diferença entre sorotipos, genótipos ou espécies de *Brucella* sp entre as espécies de carnívoros. Futuros estudos devem buscar respostas a esses questionamentos, confirmando ou não essas hipóteses o que poderia significar, em algumas delas, uma mudança na cadeia epidemiológica.

Portanto, mais estudos devem ser realizados futuramente, incluindo animais em vida livre, para compreender o papel das diversas espécies e populações na transmissão da brucelose, identificando possíveis reservatórios silvestres, contribuindo assim para o controle desta enfermidade.

Os resultados aqui apresentados estão longe de incriminar alguma dessas espécies como um reservatório silvestre bem como interferir no programa nacional de controle. No entanto, o desconhecimento dos aspectos epidemiológicos nas populações silvestres é com certeza um obstáculo para avaliar o Programa Nacional de Controle da Brucelose no Brasil.

4.2.5 Referências

Acha, P.N., Szyfres, B., 2001. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Publicación Científica y Técnica N.º 580, (1) pp. 28-56.

Acypreste, C. S., Silva, L. A. F., Mesquita, A. J., Fioravaanti, M. C. S., Dias Filho, F. C., Ramos, L. S., 2002. Diagnóstico da frequência de brucelose bovina em vacas em lactação na bacia leiteira de Goiânia pela provas do anel do Leite e rosa bengala. *Ciencia Brasileira Animal*. 3(1), 59-64.

Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D. *et al.*, 1988. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 545p.

BRASIL, 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.12 de 05/02/2004: legislação. Brasília.

Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, L.H., 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356, 991–999.

Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an Overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3(2), 213-221.

Diniz, L.S.M. 1999. Imobilização química em animais silvestres. In: Spinosa, H.S., Górnjak, S.L., Bernardi, M.M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*, 2 ed., Rio Janeiro, Guanabara, pp. 165-179.

Evans, R.H. 2005. Anestesia e contención de Mapaches y otros miembros de su familia (Carnivora, Procyonidae). *Zoological Restraint and Anesthesia*, www.ivis.org. Acessado em 13/05/2006.

Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8(12), 1468-1473.

Letková, V., Lazar, P., Curlík, J., Goldová, M., Kocisová, A., Kosuthová, L., Mojzisoová, J., 2006. The red fox (*Vulpes vulpes*) as a source of zoonoses. *Veterinarski Arhiv*. 76, 73-91.

Lafferty, K.D., Gerber, L.R., 2002. Good Medicine for Conservation Biology: the Intersection of Epidemiology and Conservation Theory. *Conserv. Biol.* 16(3), 593-604.

Moore, C.G., Schnurrenberger, P.R., 1981. A review of naturally occurring *Brucella abortus* infections in wild mammals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179(11), 1105-1112.

Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyo'n, I., 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiol.* 90, 209-227.

Neiland, K.A., 1975. Further observations on rangiferine brucellosis in Alaskan carnivores. *J. Wildl. Dis.* 11(1), 45-53.

Nishi, J.S., Stephen, C., Elkin, B.T., 2002. Implications of agricultural and wildlife policy on management and eradication of bovine tuberculosis and brucellosis in free-ranging wood bison of northern Canada. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 236-244.

Paulin, L.M., Ferreira-Neto, J.S., 2003. O Combate a Brucelose Bovina: Situação Brasileira. Funep, Jaboticabal, pp. 48-66.

Randhawa, A.S., Kelly, V.P., Baker, E.F. Jr., 1977. Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella* spp, with particular reference to *Brucella canis*, in wild animals of southern Texas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171(9), 939-942.

Sampaio, I.B.M., 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. pp 221.

Szyfres, B., Tome, J.G., 1966. Natural *Brucella* infection in Argentine wild foxes. *Bull. World Health Organ.* 34(6), 919-23.

Szyfres, B., Tome, J.G., 1967. Natural *Brucella* infection of wild foxes in Argentina. *Bol. Oficina. Sanit. Panam.* 62(2), 144-150.

Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356(1411), 983-989.

Whatmore, A.M., Shankster, S.J., Perrett, L.L., Murphy, T.J., Brew, S.D., Thirlwall, R.E., Cutler, S.J., MacMillan, A.P., 2006. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella spp.* *J. Clin. Microbiol.* 44(6), 1982-1993.

Williams, J.D., Heck, F.C., Davis, D.S., Adams, L.G., 1991. Comparison of results from five serologic methods used for detecting *Brucella abortus* antibody activity in coyote sera. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29(1-2), 79-87.

WHO. The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting. 1997, WHO/EMC/ZDI/98.14

Zarnke, R.L., Ver Hoef, J.M., DeLong, R.A., 2006. Geographic pattern of serum antibody prevalence for *Brucella spp.* in caribou, grizzly bears, and wolves from Alaska, 1975-1998. *J. Wildl. Dis.* 42(3), 570-7.