

EVIDÊNCIAS SOROLÓGICAS DA INFECÇÃO LEPTOSPÍRICA E TOXOPLÁSMICA EM QUATIS (*Nasua nasua*) DE CATIVEIROS.

Mayane Fogaça Kawaguchi, Helio Langoni, Carlos Roberto Teixeira, Josyanne Christine Oshika, Juliano Leônidas Hoffmann, Rodrigo Costa da Silva.- Ciências da Vida - Medicina Veterinária – Departamento de Higiene Sanitária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu.

A medicina de animais selvagens tem ganhado grande destaque dentro da Medicina Veterinária já que os mesmos participam cada vez mais do cotidiano das pessoas, nas suas casas, nos parques zoológicos e nas propriedades conservacionistas.

Um dos animais que está presente nesses locais, motivo de escolha desse estudo é o quati (*Nasua nasua*). Como outros animais selvagens, o quati pode ser relevante no contexto de saúde pública por participar da cadeia epidemiológica de algumas doenças zoonóticas como a leptospirose, brucelose, toxoplasmose e leishmaniose, entre outras.

O quati é um animal relativamente comum e para que se possa realizar um plano de manejo eficiente visando à conservação desta espécie, além da carga genética, biológica e comportamental, é extremamente importante levar em consideração quais doenças infecto-contagiosas estão presentes nas populações a serem remanejadas.

Além da saúde animal, é de extrema importância que entendamos qual o papel zoonótico e epidemiológico desta espécie frente a determinadas enfermidades.

O presente trabalho teve por objetivo pesquisar anticorpos anti-leptospíricos e anti-*Toxoplasma gondii* em quatis de cativeiro, para o estudo da toxoplasmose e leptospirose, visando conhecer a epidemiologia das doenças desses animais selvagens para o estabelecimento de ações de vigilância sanitária e epidemiológica.

Foram utilizados 17 quatis, provenientes de zoológicos e propriedades particulares, anestesiados com tiletamina-zolazepam (7mg/kg) juntamente a xilazina (0,5 mg/kg), com o auxílio de dardos, por via intramuscular. Coletou-se por punção veno-jugular, 5 ml de sangue em tubo sem anticoagulante, centrifugados a 600g por dez minutos. Os soros obtidos foram aliqüotados em tubos tipo Eppendorf, identificados com números de 1 a 17 e mantidos congelados a -20°C até o momento do processamento. Para a pesquisa de anticorpos anti-leptospíricos utilizou-se a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) testando os seguintes sorovares: australis, bratislava, autumnalis, butembo, castellonis, bataviae, canicola, whitcombi, cynopteri, djasiman, sentot, gryppotyphosa, patoc, wolffi, hebdomadis, copenhageni, icterohaemorrhagiae, javanica, panama, pomona, pyrogenes, hardjo, shermani, andamana, tarassovi.

No dia da prova, as culturas utilizadas como antígeno, foram diluídas em PBS pH 7,6 a 1:2, calculando-se o volume de cada antígeno de acordo com a quantidade necessária para a prova. Inicialmente, realizou-se a prova de triagem:

O soro foi diluído, pipetando-se 0,1ml da amostra em 4,9ml de solução de PBS pH 7,6 em tubo de ensaio tipo Wassermann, perfazendo a diluição de 1:50;

Em microplaca, devidamente identificada e marcada, pipetou-se 50 microlitros das respectivas amostras de soro diluídas nos poços, formando uma fileira. Fez-se o mesmo para os controles, pipetando-se somente a solução de PBS pH 7,6;

Acrescentou-se nos respectivos poços, 50 microlitros das correspondentes suspensões antigênicas (sorovares), transformando-se a diluição final de cada pocinho para 1:100. A seguir, agitou-se levemente a microplaca, deixando-a repousar em estufa a 37°C por uma hora de forma a permitir a reação antígeno-anticorpo, caso a amostra fosse positiva.

Com alça bacteriológica de aproximadamente 2mm de diâmetro, colocou-se uma gota do conteúdo de cada pocinho distribuídos em fileiras sobre uma lâmina de vidro, previamente lavada e desengordurada por imersão em solução de álcool, e devidamente secas.

A seguir procedeu-se o exame microscópico de campo escuro com a objetiva de 10X e ocular de 10X, anotando-se o grau de aglutinação de cada sorovar, considerando-se como positivos aqueles que apresentavam 50% ou mais de leptospiros aglutinadas, tendo-se como referência, os respectivos controles.

O soro, que na prova de triagem revelou 50% ou mais de leptospiras aglutinadas foi submetido à prova de titulação para se conhecer o título final de anticorpos anti-leptospíricos.

A partir da diluição de 1:50, utilizada na prova de triagem, realizou-se as demais diluições consecutivas e ao dobro. Preparou-se uma microplaca com fileiras com seis poços, que corresponderam à titulação de um determinado sorovar (antígeno). Na mesma placa, preparou-se um poço para controle de cada antígeno testado.

Pipetaram-se 100 microlitros da amostra de soro diluído a 1:50 no primeiro poço de reação e 50 microlitros de PBS pH7,6 nos demais poços referentes a esse antígeno. Para obtenção da diluição desejada, pipetou-se 50 microlitros da primeira diluição para a subsequente e após homogeneização, pipetou-se 50 microlitros para a seguinte, agindo-se assim sucessivamente, desprezando 50 microlitros da última diluição.

Distribuíram-se 50 microlitros do antígeno (sorovar) correspondente a cada poço da respectiva fileira bem como no controle (nessa etapa, as diluições de soro passaram a ser 1:100 até 1:3.200).

Após homogeneização, incubou e procedeu-se a leitura, conforme descrito anteriormente, para a prova de triagem, considerando-se como título final, a maior diluição de soro capaz de ainda aglutinar 50% ou mais das leptospiras, respectivas aos antígenos testados.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* realizou-se a técnica de aglutinação direta modificada, com antígeno inativado pelo metanol (MAT-AM). As amostras de soro foram diluídas em placas de poliestireno de fundo chato, e foram transferidos 50µl de cada diluição do soro (1: 16, 1: 64, 1: 256 e 1: 1024) para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”. Adicionou-se 50µl de 2-mercaptoetanol 0,2M, diluído em solução tampão borato pH 8,97 a cada cavidade.

As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas a temperatura de 30°C, overnight procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados. Um depósito da suspensão de parasitas, no fundo do poço em forma de botão bem definido, foi interpretado como uma reação negativa. No caso de reação positiva observou-se a formação de “malha de aglutinação”.

Os resultados referentes à pesquisa de anticorpos anti-leptospíricos estão apresentados na tabela 1, que mostra a procedência dos animais, os resultados obtidos, bem como o título final para o sorovar envolvido, destacando-se que entre os animais titulados 9 (52,94%) apresentaram reação para um ou mais sorovares.

Tabela 1: Procedência dos animais e resultados da soroaglutinação microscópica com respectivos títulos de anticorpos anti-leptospíricos em amostras de soro de quatis. Botucatu, 2006.

Identificação	Procedência	Resultado da SAM	Títulos
1	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
2	SOROCABA	Copenhageni	100
3	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
4	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
5	SOROCABA	Andamana	200
6	SOROCABA	Copenhageni	100
7	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
8	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
9	BOTUCATU	NÃO REAGENTE	----
10	BOTUCATU	NÃO REAGENTE	----
11	BOTUCATU	NÃO REAGENTE	----

12	SOROCABA	Shermani	100
13	SOROCABA	Shermani	100
14	SOROCABA	Wolffi	1600
15	SOROCABA	Hebdomadis Wolffi	400 >3200
16	SOROCABA	Hardjo Hebdomadis Wolffi	100 200 >3200
17	SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	Pyrogenes	100

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pela prova de aglutinação direta modificada estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Procedência dos animais e resultados da prova de aglutinação direta modificada (MAT-AM) para a pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* em amostras de soro de quatis. Botucatu, 2006.

Identificação	Procedência	RESULTADO DA MAT – AM	Titulação
1	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
2	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
3	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
4	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
5	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
6	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
7	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
8	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
9	BOTUCATU	Reagente	64
10	BOTUCATU	NÃO REAGENTE	----
11	BOTUCATU	NÃO REAGENTE	----
12	SOROCABA	Reagente	16
13	SOROCABA	Reagente	16
14	SOROCABA	Reagente	16
15	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
16	SOROCABA	NÃO REAGENTE	----
17	SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	NÃO REAGENTE	----

O presente trabalho mostrou que alguns dos quatis que estão nos zoológicos e propriedades particulares apresentaram anticorpos anti-leptospíricos, com nove (52,94%) de positividade, para um ou mais sorovares de leptospiros.

Das nove amostras reagentes, as amostras 2 e 6 reagiram (22,22%), para o sorovar Copenhageni. A amostra 5 (11,11%) reagiu para o sorovar Andamana. As amostras 12 e 13 reagiram (22,22%) para o sorovar Shermani. A amostra 14 (11,11%) reagiu para o sorovar Wolffi. A amostra 15 reagiu (11,11%) para os sorovares: Hebdomadis e Wolffi. A amostra 16 reagiu (11,11%) para os sorovares Hebdomadis, Hardjo e Wolffi. A amostra 17 reagiu (11,11%) para o sorovar Pyrogenes. Os títulos variaram de 100 a >3200 para os diferentes sorovares, sendo que a maior titulação foi para o sorovar Wolffi em dois (22,22%) animais.

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* dos 17 animais testados, os soros 9, 12, 13 e 14 foram reagentes (23,53%) com títulos 64 em um (25%) animal e 16 em três (75%).

Três animais (17,64%) apresentaram positividade tanto para leptospirose como toxoplasmose, concomitantemente.

Conclui-se pela importância do monitoramento sorológico, destas zoonoses para se conhecer os fatores de risco que os locais onde estes animais são mantidos, representam para o meio ambiente bem como para os visitantes e as pessoas que exercem atividades laborais nestes locais.

Referências Bibliográficas

- ACHA, P., SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles communes al hombre y a los animals. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica 503, 2° ed, 1989.
- BEISIEGEL, B. M. Notes on the coati, *Nasua nasua* (carnivora: procyonidae) in an atlantic forest area, Braz. J. Biol. v.61, n.4, 2001.
- CARRUTHERS, V.B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses and arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitol. Intern.*, v.48, p.1-10, 1999.
- CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. Toxoplasmose: In: _____ *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 1° ed. Medsi, 1992, p.757-66.
- DESMONTS G., REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, v. 11, p. 562-568, 1980.
- DUBEY, J.P., FAIR, P.A., BOSSART, G.D., HILL, D., FAYER, R., SREEKUMAR, C., KWOK, O.C., THULLIEZ, P. A comparasion of several serologic tests to detect antibodies to *Toxoplasma gondii* in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. of Parasitology* v. 91, n.5, p.1074-1081, 2005.
- GIRIO, R.J.S. et al. Investigation of antibodies to *Leptospira* spp. in wild and feral animals from the region of Nhecolandia, Mato Grosso do Sul, Brazil. Use of the immunohistochemistry technique for the agent detection. *Ciência Rural*, v. 34, n.1, p.165-169, 2004
- LUNA, A. M. A., MOLES, C. L. P., TORRES, B. J. I. & GUAL, S. F Investigación serologica de leptospirosis en fauna silvestre mantenida en cautiverio en el zoológico de Chapultepec de la ciudad de Mexico. *Veterinaria Mexico* v.3, p.229-234, 1996.
- LILENBAUM W., R. V. MONTEIRO, P. RISTOW, S. FRAGUAS, V. S. CARDOSO, L. P. L. FEDULLO. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Research in Veterinary Science* v.73, p.319-321, 2002.
- LINS, Z. C. & LOPES, M. L. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v.78, p.124-126, 1984
- ROTH, E. E.. Leptospirosis in wildlife in the United States. In: *Scientific Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association*, Chicago, 211-218, 1964.
- SIEMERING, H. Zoonoses. *Zoo and Animal Medicine*. MURRAY, E. F., Philadelphia, W.B. Saunders, Co. p. 63-68, 1986
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.