

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**THAÍS CARNEIRO SANTOS RODRIGUES**

**INVESTIGAÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM CASCAVÉIS *Crotalus durissus*  
*collilineatus* MANTIDAS EM CATIVEIRO**

UBERLÂNDIA

2015

**THAÍS CARNEIRO SANTOS RODRIGUES**

**INVESTIGAÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM CASCAVÉIS *Crotalus durissus collilineatus* MANTIDAS EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária-UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV/UFU).

**Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos**

**Área de concentração: Saúde Animal**

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R696i Rodrigues, Thaís Carneiro Santos, 1989-  
2015 Investigação da leptospirose em cascavéis *Crotalus durissus collilineatus* mantidas em cativeiro / Thaís Carneiro Santos Rodrigues. - 2015.

60 f. : il.

Orientador: André Luiz Quagliatto Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bioquímica - Teses. 3. Leptospirose em animais - serpentes - Teses. 4. Microscópio e microscopia - Teses. 5. Zoonose - Teses. I. Santos, André Luiz Quagliatto. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

---

À minha família, amigos e colegas de profissão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, amigos e namorado pelo apoio incondicional em todas as etapas do meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos que acreditou no desenvolvimento desse trabalho e a todos os integrantes do LAPAS/UFU (Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres).

À Prof. Dra. Anna Monteiro Correia Lima e equipe do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas que foram fundamentais para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antônio Vicente Mundim e Danielle S. Vieira que auxiliaram em toda a pesquisa bioquímica.

À técnica Graciele Freitas Cardoso que realizou o manejo e contenção das serpentes, e à colaboração da Profa. Dra. Vera Lucia de Campos Brites.

Ao professor Ednaldo Carvalho Guimarães que orientou as análises estatísticas do trabalho.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV/UFU) pelo apoio financeiro.

RESUMO: A leptospirose é uma zoonose de importância em saúde pública global e pode acometer praticamente todos os grupos de vertebrados, inclusive répteis. Esses animais podem atuar no ciclo epidemiológico da doença mantendo e disseminando o agente causador no ambiente. A leptospirose é pouco conhecida em serpentes e, por isso, objetivou-se estudar a ocorrência da doença nesses animais. Para isso, foi avaliada a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em *Crotalus durissus collilineatus* mantidas em cativeiro e as sorovarietades mais frequentes nesses animais, utilizando o teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM). Também foram avaliadas as alterações nas concentrações de constituintes bioquímicos plasmáticos nas serpentes reagentes, relacionadas com o título de anticorpos apresentado na SAM. Quase 90% das cascavéis utilizadas nesse estudo foram reagentes no teste sorológico com triagem de 1:25 e os sorovares mais frequentes foram Javanica, Andamana e Patoc. Os títulos mais frequentes foram 25 e 50, mas houve títulos de até 1600. Apesar de aparentemente saudáveis, a avaliação dos parâmetros bioquímicos indicou inflamação e infecção mesmo nos animais com títulos de anticorpos considerados baixos para mamíferos ( $\leq 50$ ). As cascavéis com títulos altos apresentaram quadros mais graves que aquelas com títulos menores, sugestivos de lesão renal grave e indícios de doença hepática, que são lesões características da leptospirose. Serpentes de cativeiro podem atuar como fontes de infecção de leptospiras para humanos e outros animais e por isso, é fundamental que a doença seja conhecida e controlada em criadouros. A avaliação bioquímica de répteis reagentes no teste sorológico pode ser importante para o diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp. nesses animais.

PALAVRAS-CHAVE: Bioquímica plasmática, *Leptospira*, Serpentes, Soroaglutinação Microscópica, Zoonose ocupacional.

## **LEPTOSPIROSIS IN RATTLESNAKES *Crotalus durissus collilineatus* KEPT IN CAPTIVITY**

**ABSTRACT:** Leptospirosis is a zoonosis of global public health importance and can affect all groups of vertebrates, including reptiles. These animals can play a role in the epidemiological cycle of the disease spreading and keeping the causative agent in the environment. Leptospirosis is little known in snakes and this study was designed to cover the gaps in the occurrence of the disease in these animals. The occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in rattlesnakes *Crotalus durissus collilineatus* kept in captivity was evaluated and the most common serotypes in these animals were determined using the Microscopic Agglutination Test (MAT). Changes in concentrations of plasma biochemical constituents in positive snakes were also evaluated, depending on the antibody titre presented at MAT. Almost 90% of the rattlesnakes used in this study were positive to the serological test and the most common serotypes were Javanica, Andamana and Patoc. The most common titres were 25 and 50, but there were titres as high as 1600. Captive snakes can act as important sources of leptospira infection for humans and so it is critical that the disease is recognized and controlled. Although apparently healthy, alterations in biochemical parameters indicated inflammation and infection in animals with low antibody titres. Rattlesnakes with high titres showed signs of severe kidney damage and liver disease, which are common in leptospirosis. The biochemical assessment of positive MAT reptiles may be important to diagnose the infection in these animals.

**KEYWORDS:** Leptospirosis, Microscopic agglutination test, Occupational zoonosis, Plasmatic biochemistry, Snakes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/G	=	albumina/globulina
ALT	=	alanina aminotransferase
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
EMJH	=	meios de cultura de Stuart, Fletcher e Ellinghausen
et al.	=	e colaboradores
FAL	=	fosfatase alcalina
G	=	força centrífuga relativa
g/dL	=	grama por decilitro
GGT	=	gama glutamiltransferase
IBAMA	=	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
mg/dL	=	miligrama por decilitro
mL	=	mililitro
mm	=	milímetro
µg/dL	=	micrograma por decilitro
µL	=	Microlitro
PCR	=	reação em cadeia pela polimerase
SAM	=	soroaglutinação microscópica
SISBIO	=	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
U/L	=	unidades internacionais por litro
x	=	Vezes

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1/Capítulo 2: Espécies, sorogrupos e sorovares de *Leptospira* spp. utilizados no teste de soroaglutinação microscópica. Uberlândia, 2014. 30
- Tabela 1/Capítulo 3: Concentrações (média  $\pm$  desvio padrão) dos constituintes plasmáticos de *Crotalus durissus collilineatus* não reagentes, reagentes com títulos  $\leq 50$  e reagentes com títulos  $\geq 100$  no teste de soroaglutinação microscópica. Uberlândia, 2014. 48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 / Capítulo 2: Coleta de sangue de *Crotalus durissus collilineatus* por punção do plexo venoso vertebral. Uberlândia, 2014. 28
- Figura 2 / Capítulo 2: Número de amostras de soro de *Crotallus durissus collilineatus* reagentes para cada um dos 22 sorovares utilizados no teste de soroaglutinação microscópica. Uberlândia, 2014. 32
- Figura 3 / Capítulo 2: Número de amostras de soro de *Crotallus durissus collilineatus* reagentes para cada título no teste de soroaglutinação microscópica. Uberlândia, 2014. 32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	11
1.1	LEPTOSPIROSE .....	11
1.2	APRESENTAÇÃO CLÍNICA.....	13
1.3	DIAGNÓSTICO .....	15
1.4	LEPTOSPIROSE EM ANIMAIS SELVAGENS E RÉPTEIS .....	16
1.5	<i>Crotalus durissus collilineatus</i> .....	17
	REFERÊNCIAS.....	19
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2- ANTICORPOS CONTRA-<i>Leptospira</i> spp. EM <i>Crotallus durissus collilineatus</i></b> .....	25
2.1	INTRODUÇÃO .....	26
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.2.1	Animais e área de estudo.....	27
2.2.2	Coleta do material .....	28
2.2.3	Soroaglutinação microscópica .....	29
2.2.4	Análise estatística .....	30
2.3	RESULTADOS.....	31
2.4	DISCUSSÃO .....	33
2.5	CONCLUSÕES .....	36
	LITERATURA CITADA.....	37
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3- ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS EM <i>Crotalus durissus collilineatus</i> SORORREAGENTES PARA LEPTOSPIROSE</b> .....	42
3.1	INTRODUÇÃO .....	43
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2.1	Animais e grupos amostrais .....	44
3.2.2	Amostras .....	45
3.2.3	Análises bioquímicas.....	46
3.2.4	Análises estatísticas.....	46
3.3	RESULTADOS.....	47
3.4	DISCUSSÃO .....	48
3.5	CONCLUSÕES .....	51
	LITERATURA CITADA.....	52

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais .....	56
ANEXO B - Autorização para atividades com finalidade científica SISBIO .....	57

## 1 CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma zoonose reemergente de grande importância em saúde pública global. Ocorre em países desenvolvidos e em desenvolvimento, nas áreas rural e urbana (VINETZ, 2001). Nos últimos anos, diversos surtos foram registrados, principalmente em países de clima tropical e úmido (VIJAYACHARI, SUGUNAN e SHRIRAM, 2008). Em algumas áreas da China, Sul da Ásia, África e Américas do Sul e Central, a doença é endêmica (DUTTA e CHRISTOPHER, 2005). Os surtos geralmente estão associados a chuvas fortes e inundações e frequentemente afetam moradores de periferias, turistas que visitam áreas com pouco controle sanitário e pessoas que têm contato com animais infectados (VINETZ, 2001; LAU et al., 2010).

De acordo com Bharti et al. (2003), na maioria dos países afetados, a incidência da doença é subestimada devido à falta de diagnóstico e de notificações, mas sabe-se que ocorrem mais de um milhão de casos graves de leptospirose humana anualmente em todo o mundo (ADLER et al., 2001), porém o número de casos em animais é desconhecido (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) estima que a incidência da infecção varie de 0,1 a 1/100.000 pessoas em áreas de clima temperado e países desenvolvidos e de 1 a 100/100.000 em climas tropicais úmidos e países em desenvolvimento. Em surtos epidêmicos, a incidência da doença pode chegar a mais de 100/100.000 pessoas e a taxa de mortalidade é significativa (BHARTI et al., 2003). Ainda assim, a leptospirose é uma doença pouco estudada, pouco conhecida e subdiagnosticada (WHO, 2003).

Trata-se de uma infecção bacteriana causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, da família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). Existem mais de 260 sorovares de leptospiros patogênicas e 60 sorovares considerados saprófitas (ADLER et al., 2011). Há mais de 13 espécies, mas a maior parte dos sorovares patogênicos é classificada em *Leptospira interrogans* e *Leptospira borgpetersenii*, enquanto *Leptospira biflexa* agrupa os sorovares saprófitas (ADLER et al., 2011).

Os sorovares patogênicos se alojam nos túbulos renais proximais de hospedeiros carreadores e são excretados na urina (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Já os sorovares saprófitas existem no ambiente, principalmente no solo e em águas superficiais (ADLER et al., 2011). Algumas espécies de animais são tidas como principais carreadoras de certos sorovares, atuando como reservatórios naturais, mas essa associação não é absoluta (WHO, 2003). Um sorovar pode infectar diversas espécies, assim como uma única espécie pode atuar como hospedeiro de vários sorovares (WHO, 2003).

As leptospirosas podem infectar praticamente todos os grupos de animais vertebrados, sendo que os mamíferos apresentam maior significado epidemiológico (BADKE, 2001), já que muitos atuam como reservatórios naturais da bactéria (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011). A doença representa um importante problema de saúde animal, podendo afetar animais domésticos, selvagens e de produção (WHO, 2003). Causa grandes perdas econômicas em sistemas de produção animal, principalmente por redução na produção de leite, abortos e infertilidade (BENNETT, CHRISTIANSEN e CLIFTON-HADLEY, 1999; GROOMS, 2006). No Rio de Janeiro (RJ), por exemplo, é a principal infecção causadora de problemas na produção de pequenos ruminantes (MARTINS et al., 2012).

Em ecossistemas rurais e urbanos, os principais reservatórios de leptospirosas são roedores sinantrópicos, especialmente ratas e ratos de esgoto (BADKE, 2001). Nesses animais, há evidências de equilíbrio na relação hospedeiro-parasita de forma que animais acometidos não apresentam sinais clínicos da infecção, mas eliminam o agente etiológico no meio (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Várias espécies animais (incluindo humanos, mais raramente) podem ser carreadores renais de leptospirosas por longos períodos, o que é fundamental para a persistência e epidemiologia da doença (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

As espiroquetas são capazes de penetrar ativamente nas mucosas, pele lesada ou pele íntegra umedecida (IMPPAZ, 1997) e a transmissão da leptospirose se dá principalmente de forma indireta, por meio de exposição à água, solo úmido ou vegetação contaminada com urina de animais infectados (ETTINGER e FELDMAN, 2004). A transmissão direta ocorre pelo contato próximo com urina, sangue, tecidos ou órgãos de animais infectados, e já foi evidenciada transmissão transplacentária ou ainda através do leite e por ingestão de alimentos contaminados (BRASIL, 1995),

inalação de aerossóis contaminados e pelo trato genital de animais domésticos (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011).

A transmissão da doença de humano para humano é rara e, quase sempre, a urina de animais infectados é a fonte de infecção (seja de maneira direta ou indireta) (BHARTI et al., 2003). A leptospirose é também caracterizada como doença ocupacional, sendo associada principalmente aos trabalhadores da produção animal e agricultura, veterinários, pessoas que trabalham com roedores selvagens ou sinantrópicos e pessoas que têm contato com esgoto (ADLER e MOCTEZUMA, 2010; HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011).

No Brasil, houve duas epidemias de leptospirose humana em 1996, uma em Salvador, Bahia (KO et al., 1999) e outra no Rio de Janeiro (RJ), onde a doença é endêmica (BARCELLOS e SABROZA, 2001; MARTINS e LILENBAUM, 2013). Em Salvador, 326 casos da doença foram registrados, sendo que 15% resultaram em óbito e 23% necessitaram de tratamento de suporte agressivo, incluindo diálise (KO et al., 1999). Desses pacientes, 46% haviam recebido diagnóstico de dengue, o que dificultou o tratamento correto, que poderia diminuir a mortalidade (KO et al., 1999). Segundo Souza et al. (2011), no ano de 2007, os custos hospitalares para tratamento de casos confirmados de leptospirose no Brasil foram de R\$ 831,5 mil.

Além dos custos com tratamento e prejuízos na produção animal, a leptospirose pode gerar importante impacto social nas populações afetadas, já que os surtos epidêmicos geralmente ocorrem em comunidades pobres, com menor acesso a serviços de saúde e saneamento básico, causando redução da capacidade de trabalho em longo prazo e, com isso, redução de poder socioeconômico (LAU et al., 2010). É quase certo que as atuais mudanças climáticas, o aumento da ocorrência de inundações, o crescimento da população e a urbanização levarão a um aumento no número de casos de leptospirose em todo o mundo e são necessários maiores estudos para compreender a epidemiologia da doença e evitar que ocorram maiores danos (LAU et al., 2010).

## 1.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

De maneira geral, nos mamíferos domésticos, após a entrada das leptospiras patogênicas no organismo há um período de incubação de dois a cinco dias antes que essas atinjam a corrente circulatória. A bactéria se multiplica rapidamente no

sangue e em praticamente todos os órgãos e tecidos (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Por isso, pode causar sintomatologia variada, mas lesa principalmente as células hepáticas, renais e esplênicas (ROSE, 1966). Os mecanismos patogênicos pelos quais as leptospiras causam danos ao hospedeiro ainda não são bem conhecidos. A leptospiremia pode durar aproximadamente três dias e nesse período pode haver febre e anemia por destruição de hemácias (ETTINGER e FELDMAN, 2004). Ocorre a colonização dos rins e as espiroquetas persistem no epitélio tubular renal, sendo eliminadas na urina (leptospiúria) por tempo indeterminado (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Os sinais clínicos são inespecíficos e variam de acordo com os órgãos em que houve multiplicação da bactéria, do estado imunológico do hospedeiro e dos sorovares envolvidos, mas é comum a ocorrência de lesões hepáticas e renais. Geralmente relata-se febre, anorexia, oligúria, anúria, vômito, desidratação, conjuntivite, icterícia (por retenção biliar), insuficiência renal aguda e hepática, diarreia sanguinolenta, debilitação e úlceras e hemorragias gástricas e intestinais (CORRÊA e CORRÊA, 1992). Quadros reprodutivos podem estar presentes, sendo comuns abortos, natimortalidades, morte em neonatos e maceração fetal. As infecções hiperagudas causam leptospiremia maciça, choque e óbito. Os achados hematológicos e bioquímicos variam, mas geralmente indicam lesão hepática e renal, podendo haver leucocitose, trombocitopenia, uremia, aumento da concentração sérica de creatinina e de enzimas hepáticas e bilirrubina (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Dentre os achados de necropsia, observa-se principalmente icterícia e hemorragia pulmonar além de alterações macroscópicas hepáticas e renais (TOCHETTO et al., 2012). Cita-se também a ocorrência de petéquias na pleura, peritônio, mucosas nasal e oral e hipertrofia de baço e linfonodos (CORRÊA e CORRÊA, 1992; JONES et al., 1997). Podem ocorrer ainda hemorragias e edemas de vários órgãos como miocárdio, bexiga, pâncreas e vesícula biliar (ETTINGER e FELDMAN, 2004).

Na histologia dos rins de cães com leptospirose, Tochetto et al. (2012) relataram graus variados de nefrose tubular e nefrite intersticial não supurativa. Já na histologia do fígado, citaram principalmente dissociação dos cordões de hepatócitos, colestase intra-canalicular e necrose hepática. Na histologia do pulmão, hemorragia e edema alveolares foram frequentes.

Em humanos, a severidade da doença varia muito, principalmente dependendo da idade, estado imunológico e sorovar infectante. Pode apresentar sinais leves ou ainda caracterizar infecção grave, com falência renal e hepática, acometimento pulmonar, hemorragias e até óbito (ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Muitos pacientes humanos podem apresentar apenas febre em quadros agudos de leptospirose (BHARTI et al., 2003).

### 1.3 DIAGNÓSTICO

A leptospirose é uma doença de difícil diagnóstico clínico e laboratorial, e por isso é pouco reconhecida e severamente negligenciada (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011). Enquanto o diagnóstico clínico é dificultado pela grande variedade de sinais, os testes laboratoriais podem ser trabalhosos e requerem laboratórios equipados e profissionais especializados (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011).

A partir de suspeita clínica e análise do histórico do paciente, a confirmação da doença pode ser feita por meio de métodos indiretos ou diretos (GOMES, 2011). Os testes diretos detectam a presença do organismo, ou seu DNA, em tecidos e fluídos do hospedeiro. Dentre eles, destacam-se a microscopia de campo escuro, imunofluorescência, cultura, histopatologia com corantes específicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Já os testes indiretos identificam anticorpos contra a bactéria no sangue ou líquido cefalorraquidiano e são os mais utilizados para diagnosticar a leptospirose em animais em todo o mundo. Dentre esses, destacam-se a soroaglutinação microscópica e diversos testes imunoenzimáticos (BOLIN e ALT, 1999).

O teste de soroaglutinação microscópica, também conhecido por SAM, é o método sorológico “padrão ouro” para diagnóstico da leptospirose, sendo a técnica de referência indicada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003). É utilizado em todo o mundo e a presença de anticorpos é indicada pela aglutinação de leptospiros em diferentes diluições de amostras de soro. Os antígenos utilizados para o teste são cepas padrão de *Leptospira*, mantidas por repiques semanais em meios de Stuart, Fletcher, e Ellinghausen (EMJH) mantidas em estufa bacteriológica.

A bateria de antígenos deve incluir representantes dos sorogrupos mais comuns na região ou espécie em estudo (BRASIL, 1995). De maneira geral, são

consideradas reagentes aquelas amostras que apresentam aglutinação em diluições iguais ou superiores que 1:100. Essas deverão ser reavaliadas frente ao sorotipo reagente, a fim de que seja obtido o título de aglutininas (GOMES, 2011).

É um método de alta especificidade e sensibilidade. Porém, há possibilidade de reação de aglutinação cruzada com um sorovar que não aquele que está causando a infecção. A ocorrência de reações cruzadas é possível devido proximidade antigênica entre os vários sorovares do gênero *Leptospira* (GOMES, 2011).

Geralmente, o diagnóstico da leptospirose é estabelecido quando há detecção de títulos altos de anticorpos, associado à sintomatologia compatível com a doença, mas não existe consenso quanto ao título a partir da qual deve-se considerar o animal positivo. A interpretação dos títulos encontrados na SAM é complicada e diversos fatores devem ser levados em consideração. Hospedeiros de manutenção podem exibir resposta imunológica baixa à infecção e, portanto, títulos baixos ou nulos. O mesmo pode ocorrer em bovinos que acabaram de abortar, em animais recém-infectados ou em infecções crônicas (BOLIN e ALT, 1999).

Deve se considerar também que o sorovar infectante pode não estar entre os utilizados no teste e, assim, o resultado será falso-negativo. Por isso, resultados negativos não eliminam a possibilidade da doença. Da mesma forma, resultados positivos não necessariamente indicam infecção atual, uma vez que os anticorpos podem permanecer na circulação sanguínea por longos períodos após o contato com as leptospirosas (WHO, 2003). Além disso, a vacinação pode produzir títulos baixos ou altos por vários meses, dependendo da resposta de cada animal imunizado (BOLIN e ALT, 1999).

#### 1.4 LEPTOSPIROSE EM ANIMAIS SELVAGENS E RÉPTEIS

Muitos mamíferos selvagens, inclusive mamíferos aquáticos, já foram identificados como carreadores de leptospirosas e a participação desses animais na epidemiologia da doença é indiscutível (HARTSKEERL e TERPSTRA, 1996; ADLER e MOCTEZUMA, 2010). Segundo Hartskeerl e Terpstra (1996), quase todos os mamíferos selvagens podem ser considerados possíveis disseminadores da leptospirose. Em geral, estes animais comportam-se como portadores assintomáticos e permanentes de vários sorovares de leptospirosas e por isso, atuam

como fontes perenes de infecção para humanos e outros animais (SANTA ROSA et al., 1980; THE WORLD ZOO CONSERVATION STRATEGY, 1993). No Brasil estudos epidemiológicos sobre infecção por *Leptospira* spp. em animais selvagens são escassos (GIRIO, 1999; LINS e LOPES, 1984).

Apesar de quase todo o conhecimento sobre a leptospirose estar associado à infecção em mamíferos, sabe-se que anfíbios, répteis e aves podem desempenhar papéis importantes como reservatórios e mantenedores de leptospiras no ambiente (DESVARS, CARDINALE e MICHAULT, 2010). Poucos estudos foram realizados buscando estudar a doença nos répteis e a sua participação na cadeia epidemiológica é incerta, mas existem relatos de serpentes peçonhentas e não peçonhentas (SANTA ROSA et al., 1980; ESTEVES et al., 2005), testudines (ALVES-JÚNIOR, 2013) e crocodilianos (FEUER e DOMASH-MARTINEZ, 2011) sorologicamente positivos. Sabe-se muito pouco sobre a ocorrência da leptospirose nesses animais e quase não há informações sobre a sua apresentação clínica.

#### 1.5 *Crotalus durissus collilineatus* (AMARAL, 1926)

As serpentes são amplamente distribuídas em quase todo o mundo e habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais. No Brasil existem 381 espécies de serpentes, agrupadas em dez famílias (BÉRNILS e COSTA, 2012). Dessas, apenas duas são peçonhentas, sendo a família Viperidae de maior importância em saúde pública por causar o maior número de acidentes ofídicos (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

São animais de grande importância ecológica, socioeconômica e farmacêutica, frequentemente criadas em cativeiro (MARTINS e MOLINA, 2008). Além da produção de soros antiofídicos e medicamentos, as serpentes são amplamente utilizadas em zoológicos, centros de pesquisa, criadouros conservacionistas, criadouros comerciais e como animais de companhia (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

No Brasil, a criação de serpentes peçonhentas para produção de soros antiofídicos se iniciou nos primeiros anos do século XX, no Instituto Butantan, e estima-se que a instituição receba quase 15 mil serpentes por ano. De fato, o número de ofídios em cativeiro no país é muito grande, já que é necessária boa representatividade de venenos no pool de imunização dos equídeos para produção

dos soros e, por isso, existem serpentários que abrigam centenas de animais (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002; COSTA et al., 2005). No Instituto Butantan, predomina a criação de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (COSTA et al., 2005).

No Brasil, o gênero *Crotalus* é representado pela espécie *Crotalus durissus* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009). Os acidentes crotálicos correspondem a aproximadamente 8% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil e apresentam o maior coeficiente de letalidade. No Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia de 1999 a 2003, esses acidentes corresponderam a cerca de 30% dos casos (NUNES et al., 2014).

A subespécie *Crotalus durissus collilineatus* tem distribuição ampla nas regiões sudeste, central e nordeste do país (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009). Pode ser encontrada nos estados de Rondônia, Mato Grosso, Goiás, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e estende-se até o sul do Paraná (HOGE e ROMANO, 1978/79 citado por VALLE e BRITES, 2012). É frequente em áreas alteradas do Triângulo e Alto Paranaíba, em Minas Gerais, sendo encontrada na cidade de Uberlândia até mesmo em áreas urbanas (BRITES e BAUAB, 1988). Nessa cidade, a maior parte dos encontros com *C. durissus collilineatus* ocorre em ocupações agrícolas e de pastagens, principalmente em plantações de milho e café (VALLE e BRITES, 2012).

A Lista de Répteis da Sociedade Brasileira de Herpetologia (BÉRNILS e COSTA, 2012) relaciona a subespécie *Crotalus durissus collilineatus* e menciona um ponto de vista diferente para a taxonomia de duas subespécies de *Crotalus durissus*, em que alguns pesquisadores sugerem que *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella* sejam sinônimos de *C. d. terrificus* (WÜSTER et al., 2005).

## REFERÊNCIAS

ADLER, B.; MIRANDA, L.; TORSTEN, S.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, v. 153, p. 73-81, 2011.

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

BADKE, M. R. T. Leptospirose. **ABRAVES, Santa Catarina**, 2001. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/abravessc/pdf/Memorias2001/1\\_manoelrenato.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/abravessc/pdf/Memorias2001/1_manoelrenato.pdf)  
Acessado em maio de 2013.

BARCELLOS, C.; SABROZA, P. C. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17(Suplemento), p.59-67, 2001.

BENNETT, R. M.; CHRISTIANEN, K.; CLIFTON-HADLEY, R. S. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 455–459, 1999.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Brazilian reptiles: List of species. Version 2012.2. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2012. Acessado em 13 de julho de 2014. [www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 757–71, 2003.

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practitioner**, v. 33, p. 50-55, 1999.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HARNAGUCHI, A.;

RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HORNSI-BRANDEBURGO, M. *Crotalus durissus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 54, p. 586-595, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais. Programa Nacional de Leptospirose. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

BRITES, V. L. C.; BAUAB, F. A. Fauna Ofidiana do Município de Uberlândia, Minas Gerais – Brasil. I. Ocorrência na Área Urbana. – **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v. 4, n.1, p. 3-7, 1988.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 219- 240,1992.

COSTA, A. C. O. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; GERMANO, V. J.; OLIVEIRA, L.; SCARTOZZONI, R. R.; SALOMÃO, M. G. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I- A longevidade dos generos *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil**, v. 8-9, p. 63-68, 2005.

DESVARS, A.; CARDINALE, E.; MICHAULT, A. Animal leptospirosis in small tropical areas. **Epidemiology and Infection**, v. 139, p. 167-188, 2010.

DUTTA, T. K.; CHRISTOPHER, M. Leptospirosis – An Overview. **Journal of the Association of Physicians of India**, Mumbai, v. 53, p. 545-551, 2005.

ESTEVES, F. M.; GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R. J. da S.; SILVA-VERGARA, M. L.; CARVALHO, A. C. de F. B. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.283-288, 2005.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato**. 5. ed., v. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirose**. Boca Raton: CRC Press, Melbourne Australia, ed. 2, 1999.

FEUER, B.; DOMASH-MARTINEZ, T. Report of case: leptospirosis after exposure to alligator carcass. **Osteopathic Family Physician**, v. 3, n. 1, p. 23-26, 2011.

GIRIO, R.J.S.; HERRERA, R.C.P. PEREIRA; F.J.G; MATHIAS, L.A. Pesquisa de infecção por *Leptospira Interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.65, p.87, 1999.

GOMES, M. Gênero *Leptospira* spp. **Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225**, 2011. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Lepto201102.pdf>

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

HARTSKEERL, P. A.; TERPSTRA, W. J. Leptospirosis in wild animals. **The Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 149-150, 1996.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 4, p. 494-501, 2011.

IMPPAZ. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, Organización Panamericana de la Salud. **Análisis del proyecto de presupuesto por programas del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos e Zoonosis para 1998- 1999 y 2000-2001**. Organización Panamericana de la Salud, Washington, p. 37, 1997.

JONES, T.C.; HUNT, R. D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, p. 477- 483, 1997.

ALVES-JÚNIOR, J. R. F. **Leptospira spp. e Brucella spp. em tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) do Vale do Rio Araguaia – GO**. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 89 pp., 2013

KO, A. I.; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON-JR, W. D.; RILEY, L. W.; Salvador Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, London, v. 354, p. 820-825, 1999.

LAU, C., L.; SMYTHE, L. D.; CRAIG, S. B.; WEINSTEIN, P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, p. 631-638, 2010.

LINS, Z.C.; LOPES, M.L. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil. **Transactions Royal of the Society Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.1, p.124-126, 1984.

MARTINS, M.; MOLINA, F. B. "Panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil". In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M.; Paglia, A. P. (Eds.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. MMA e Fundação Biodiversitas, Brasília e Belo Horizonte, p. 327-334, 2008.

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R. C.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, p. 773–777, 2012.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 237, 2013.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p., 2002. Disponível em: SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

NUNES, D. C. O.; FRANCO, P. S.; RODRIGUES, V. M.; MENDES, M. M. Clinical-epidemiologic aspects of ophidian accidents occurred in Triângulo Mineiro region,

Minas Gerais state, Brazil: Retrospective case series. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1942-1951, 2014.

ROSE, G. W. Mechanism of tissue cell penetration by leptospira pomona: active, penetration studies in vitro. **American Journal of Veterinary Reserach**, v.27, p.1461-1471, 1966.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YABAGUITA, R. M.; SILVA, A. S. Leptospirosis in wildlife in Brazil: Isolation of serovars Canicola, Pyrogenes and Grippotyphosa. **International Journal of Zoonosis**, Taipei, v.7, p. 40-43, 1980.

SOUZA, V. M. M.; SIMÕES, M. L. N.; CASTROL, A. P. B. de; ARAÚJO, W. N. de. Anos potenciais de vida perdidos e custos hospitalares da leptospirose no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 1001-1008, 2011.

THE WORLD ZOO CONSERVATION STRATEGY, International Union of Directors of Zoological Gardens, IUCN Species Survival Commission (SSC), Captive Breeding Specialist Group (CBSG). **The role of the zoos and aquaria of the world in global conservation**. Illinois: Chicago Zoological Society, p. 76, 1993.

TOCHETTO, C.; FLORES, M. M.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; FIGHERA, R. A. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.5, p. 430-443, 2012.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Ecologia e nomes populares de *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral, 1926) em áreas sob efeito antrópico do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zociências**, v.14, n. 1, 2, 3, p. 71-79, 2012.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAN, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 33, n. 4, p. 557-569, 2008.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curent Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p. 527-538, 2001.

WHO. World Health Organization. **Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. WHO Library Cataloguing in Publication Data, 2003.

WÜSTERN, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S.; Tracing na invasion: landeridges, refugia and the phylogeography os the Neotropical rattlesnake (Serpentes, Viperidae: *Crotalus durrisus*). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1095-1108, 2005.

## **2 CAPÍTULO 2- ANTICORPOS CONTRA-*Leptospira* spp. EM *Crotallus durissus collilineatus* MANTIDAS EM CATIVEIRO**

RODRIGUES, T.C.S.<sup>a</sup>; SANTOS, A.L.Q.<sup>b</sup>; LIMA, A.M.C.<sup>c</sup>; GOMES, D.O.<sup>d</sup>; BRITES, V.L.C.<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Avenida Amazonas 2245, Jardim Umuarama, 38.405-302, Uberlândia-MG, Brazil. thaiscarneiro\_25@hotmail.com

<sup>b</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Avenida Amazonas 2245, Jardim Umuarama, 38.405-302, Uberlândia-MG, Brazil. quagliatto.andre@gmail.com

<sup>c</sup> Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 33, Campus Umuarama, 38.405-315, Uberlândia-MG, Brazil. annalima@famev.ufu.br

<sup>d</sup> Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 33, Campus Umuarama, 38.405-315, Uberlândia-MG, Brazil. dayanevet@yahoo.com.br

<sup>e</sup> Setor de Manutenção de Répteis, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, 38.405-315, Uberlândia-MG, Brazil. veraluciabrites@gmail.com

**RESUMO:** A leptospirose é uma zoonose de importância em saúde pública em todo o mundo e pode acometer praticamente todos os grupos de vertebrados, inclusive répteis. É pouco estudada em serpentes e, por isso, objetivou-se investigar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 64 *Crotalus durissus collilineatus* de cativeiro, além de determinar os sorovares mais frequentes nesses animais, utilizando o teste de soroaglutinação microscópica. Dessas, 56 amostras foram reagentes (87,5%) e houve reações aos 22 sorovares utilizados no estudo. O sorovar mais frequente foi Javanica (83,92%), seguido de Andamana (60,71%) e

Patoc (51,78%), que ocorreram em 47, 34 e 29 animais, respectivamente. Os títulos variaram de 25 à 1600, sendo os títulos 25 (40,09%) e 50 (47,82%) os mais frequentes. Houve títulos altos como 1600, para os sorovares Whitcomb e Panama, e 800, para o sorovar Patoc, mesmo sem apresentação de sintomatologia clínica. Deve-se atentar para a possibilidade de serpentes de cativeiro atuarem como fontes de infecção de leptospiras para humanos e outros animais. Por isso, é fundamental que a doença seja prevenida e controlada no ambiente de cativeiro.

Palavras-chave: Leptospirose, Répteis, Serpentes, Sorologia, Zoonose.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é a zoonose de maior distribuição mundial (Jamshidi et al., 2009) e tem grande importância em saúde pública e animal (Faine et al., 1999). É causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, capazes de afetar praticamente todos os grupos de animais vertebrados (Badke, 2001). Essas bactérias possuem diversas variedades patogênicas e saprófitas, que são classificadas em sorogrupos. Cada sorogrupo possui uma série de variedades, denominadas sorovares (Adler e Moctezuma, 2010). Um único animal pode ser hospedeiro de vários sorovares e um mesmo sorovar pode infectar vários hospedeiros (Quinn et al., 2005).

Sabe-se que muitas espécies de mamíferos domésticos e selvagens atuam como hospedeiros naturais ou acidentais de diversos sorovares de leptospiras. Entretanto, a participação de répteis na manutenção e disseminação do patógeno no ambiente é pouco conhecida (Lindtner-Knific et al., 2013). Esses animais podem desempenhar papéis importantes no ciclo epidemiológico da doença, mantendo o agente infeccioso no ambiente e transmitindo-o para outros animais (Glosser et al., 1974; Lindtner-Knific et al., 2013).

De acordo com Hyakutake et al. (1980), as serpentes podem constituir importantes reservatórios naturais de leptospiras, principalmente devido à sua dieta, geralmente baseada em roedores, que são os principais reservatórios do patógeno no ambiente (Faine et al., 1999). Nos ofídios, a leptospirose geralmente não está associada à sintomatologia clínica (Wallach, 1983), mas já foi relatada a ocorrência de alterações renais em uma serpente infectada (Abdulla e Karstad, 1962).

O número de serpentes criadas em cativeiro tem aumentado consideravelmente e além de tornarem-se animais de companhia, há um grande número de criadouros para fins científicos e comerciais. Apesar de não haver relatos da transmissão de leptospirose de répteis para humanos (Ebani e Fratini, 2005), é importante pesquisar a ocorrência da zoonose nesses animais para evitar o risco de exposição ao agente causador da doença (Silva et al., 2009). Biólogos, médicos veterinários e tratadores de serpentes também podem sofrer risco de infecção (Ebani e Fratini, 2005).

A incidência de diferentes sorovares em populações humanas depende fortemente dos hospedeiros reservatórios presentes na região em questão e dos sorovares que eles carregam (Bharti et al., 2003). Assim, estabelecer quais espécies animais atuam como hospedeiros de leptospirosas em determinada área é fundamental para o controle e prevenção da leptospirose (WHO, 2003; Desvars et al., 2010). Por isso, objetivou-se avaliar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cascavéis *Crotalus durissus collilineatus* de cativeiro, além de determinar os sorovares mais frequentes nos animais do criadouro estudado, utilizando o teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM).

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados mediante a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU (protocolo 120/14), assim como liberação do IBAMA (licença SISBIO número 46845).

### 2.2.1 Animais e área de estudo

Foram utilizadas 64 amostras de soro sanguíneo de *C. durissus collilineatus* adultas, machos e fêmeas, clinicamente saudáveis, pertencentes ao Setor de Répteis (Criadouro Conservacionista – Finalidade Científica) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todas as cascavéis foram encaminhadas ao criadouro pelo IBAMA, Polícia Ambiental, Laboratório de Zoonoses (prefeitura de Uberlândia) ou por membros da comunidade, por serem encontradas em áreas rurais e periurbanas nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto-Paranaíba (MG). São alimentadas a cada 15 dias com camundongos *Mus musculus*, variedade albina,

mantidos no próprio Setor e tinham acesso à água *ad libitum*. Não há rígido controle de roedores sinantrópicos e em duas ocasiões foi constatada a ocorrência de *Rattus rattus* (rato de telhado) no criadouro.

### 2.2.2 Coleta do material

Os espécimes de *C. d. collilineatus* foram contidos manualmente por técnicos treinados, utilizando ganchos e colchão de espuma, como indicado por Francisco (1997) e Goulart (2004). Após prévia assepsia com álcool 70%, coletou-se 2ml de sangue por punção do plexo venoso vertebral, descrito por Zippel et al. (2001), entre o osso occipital e o atlas, com agulhas hipodérmicas descartáveis 13x4,5mm e seringas descartáveis de 5ml.



Figura 1: Coleta de sangue de *Crotalus durissus collilineatus* por punção do plexo venoso vertebral. Uberlândia, 2014.

Imediatamente após a coleta, o sangue foi transferido para tubos sem anticoagulante e, após a formação do coágulo, centrifugado a 2.500 rotações por minuto, durante 10 minutos, para obtenção de amostras de soro que foram colocadas em microtubos identificados individualmente. Em seguida, foram armazenados à -20°C até a realização da SAM.

### 2.2.3 Soroaglutinação microscópica

A SAM foi realizada no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU, utilizando-se um painel de 22 sorovares (Tabela 1). Estabeleceu-se como triagem a diluição de 1:25, que foi utilizada em crocodilianos por Rossetti et al. (2003). Para isso, foram utilizadas placas de poliestireno com fundo chato e colocou-se em cada poço 23µL de solução salina 0,9%, 2µL do soro de cada animal, e 25µL de antígeno (cada um dos 22 sorovares), resultando em 50 µL de solução final.

A solução final foi levemente agitada manualmente e acondicionada à temperatura ambiente por uma hora. Após esse período, procedeu-se a leitura em microscopia de campo escuro, com objetiva e ocular de 10x, diretamente nos poços da placa. Foram consideradas reagentes as amostras em que houve aglutinação de mais de 50% do campo, conforme especificado pelo Ministério da Saúde (Brasil, 1995).

As amostras reagentes na prova de triagem foram submetidas à titulação de anticorpos. Para isso, o soro de cada amostra passou por diluições seriadas (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200), e acrescentou-se 50µL dos sorovares para os quais houve reação na diluição inicial de 1:25. A leitura foi realizada assim como na prova inicial, após o mesmo período de descanso em temperatura ambiente. O título de cada amostra foi a maior diluição em que houve aglutinação de 50% ou mais do campo (Brasil, 1995).

Tabela 1: Espécies, sorogrupos e sorovares de *Leptospira* spp. utilizados no teste de soroaglutinação microscópica, Uberlândia, 2014.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman
<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi
<i>L. borgpetersenii</i>	Celledoni	Whitcombi
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi

Fonte: Baranton, 2006

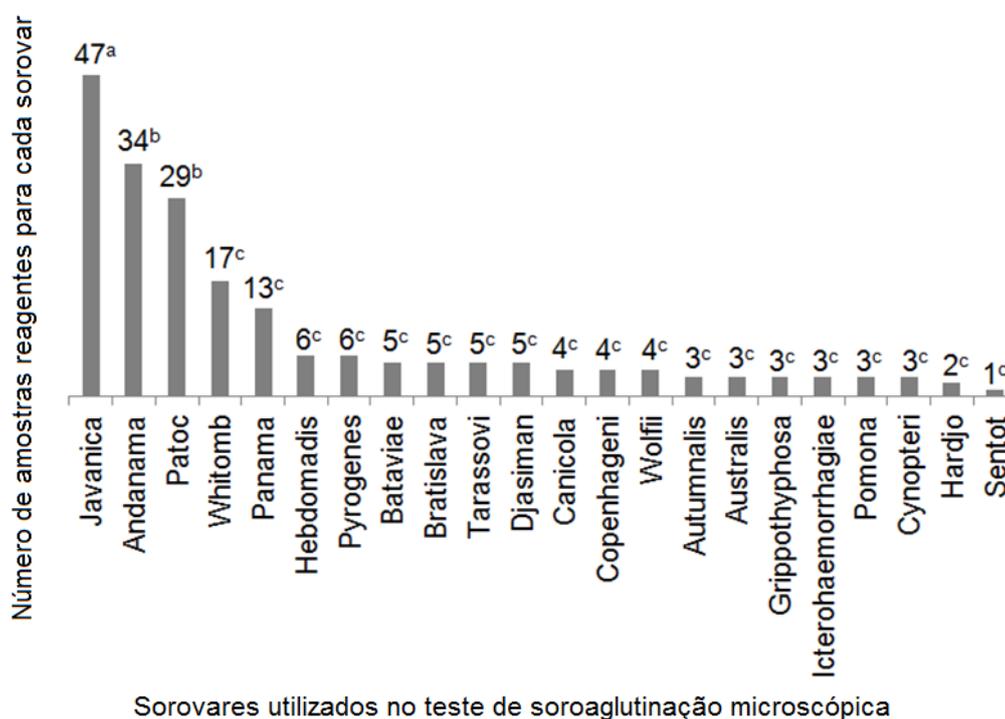
#### 2.2.4 Análise estatística

O teste Binomial para Duas Proporções, realizado no programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007), foi utilizado para determinar os sorovares e títulos mais

frequentes nas serpentes estudadas. Diferenças significantes foram inferidas em  $p < 0,05$ .

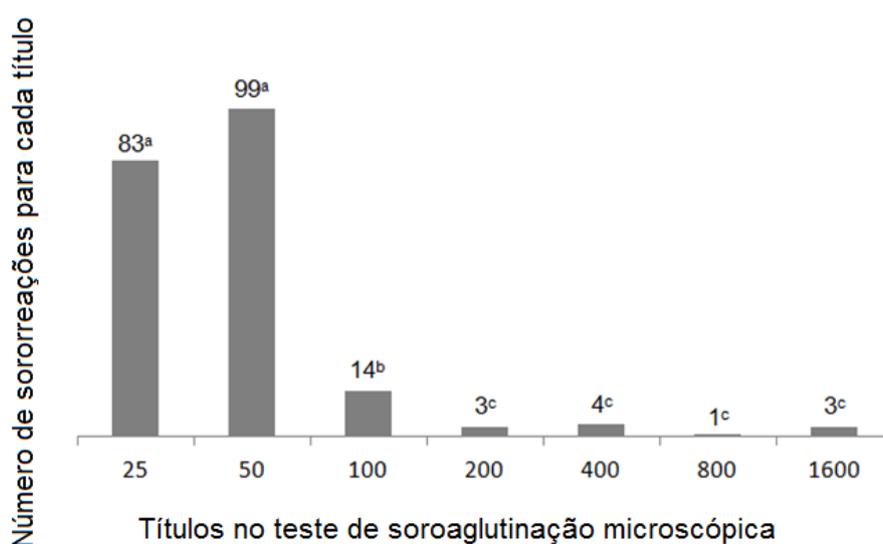
### 2.3 RESULTADOS

Das 64 amostras testadas, 56 (87,5%) foram positivas a pelo menos um sorovar, 51 (91,07%) amostras reagiram a dois ou mais sorovares e duas amostras aglutinaram todos os sorovares testados, com exceção do sorovar Sentot. Houve reações a todos os sorovares utilizados no estudo e o sorovar mais frequente nas *C. d. collilineatus* foi Javanica, seguido de Andamana e Patoc, que ocorreram em 47 (81,50%), 34 (60,71%) e 29 (51,78%) amostras, respectivamente. O número de amostras consideradas positivas para cada sorovar e as diferenças estatísticas de frequência de cada um deles é mostrado na Figura 2. Os títulos variaram de 25 à 1600, sendo os títulos 50 (47,82%) e 25 (40,09%) os mais frequentes (Figura 3). Os títulos mais elevados foram para os sorovares Whitcomb (1600), Panama (1600) e Patoc (800).



Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 0,05 pelo teste Binomial para duas Proporções.

Figura 2: Número de amostras de soro de *Crotallus durissus collilineatus* reagentes para cada um dos 22 sorovares utilizados no teste de soroaglutinação microscópica. Uberlândia, 2014.



Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 0,05 pelo teste Binomial para duas Proporções.

Figura 3: Frequência de cada título no teste de soroaglutinação de amostras de soro de *Crotallus durissus collilineatus*. Uberlândia, 2014.

## 2.4 DISCUSSÃO

Os sorovares mais frequentes nas *Crotalus durissus collilineatus* podem causar leptospirose em humanos. Andamana e Patoc são considerados variedades saprófitas (*L. biflexa*), mas essa classificação tem sido discutida já que sabe-se que são capazes de causar doença (Shenberg et al., 1975). O sorovar Andamana foi originalmente isolado de humanos (Taylor e Goyle, 1930 citado por Hyakutake et al., 1980) e pode causar meningites fatais (Corrêa et al., 1964). Patoc foi identificado como causador de leptospirose aguda em crianças no Rio de Janeiro (Cruz et al., 1994) e o sorovar Javanica afeta humanos e bovinos na Índia (Natarajaseenivasan et al., 2011), sendo comum no sudeste da Ásia (WHO, 2011).

A ocorrência desses sorovares em serpentes evidencia a sua importância como possíveis fontes de infecção para humanos. Não existem relatos da transmissão direta de *Leptospira* spp. de serpentes para humanos, mas esses últimos podem se infectar por contato com o ambiente em que os répteis vivem (Ebani e Fratini, 2005). Por isso, profissionais que fazem manejo de animais selvagens em cativeiro, como tratadores, veterinários e biólogos de zoológicos e criadouros de serpentes, estão mais susceptíveis a esse tipo de infecção.

Segundo Feuer e Domash-Martinez (2011), nos Estados Unidos, nove tratadores de crocodilianos contraíram leptospirose após contato com os animais e alguns precisaram de hospitalização. A transmissão das leptospirosas pode ter ocorrido de maneira direta (dos répteis para as mãos dos profissionais) ou mais provavelmente de maneira indireta, por exposição à água contaminada com urina de animais em leptospiúria. Esses autores também relataram um caso de leptospirose humana após contato com carcaça de crocodilo no estado da Flórida.

Veen et al. (2012) destacaram a importância da criação de protocolos de controle e prevenção de zoonoses como a leptospirose em zoológicos, principalmente para evitar a transmissão da doença para as profissionais grávidas. Segundo esses autores, grande parte dos tratadores de animais selvagens de cativeiro são mulheres jovens e, durante a gravidez, estão mais propensas à infecção devido ao enfraquecimento do sistema imune. A leptospirose pode causar aumento da taxa de aborto espontâneo, problemas placentários e icterícia neonatal (Puliyath e Singh, 2012).

Todas as cascavéis estavam aparentemente saudáveis mesmo apresentando títulos de anticorpos altos, como 1600. Biscola et al. (2011) afirmaram que tanto serpentes de vida livre quanto serpentes mantidas em cativeiro podem ser hospedeiras de vários sorovares de leptospiros sem apresentar sintomatologia clínica. A ausência de apresentação clínica dificulta a identificação de animais hospedeiros do patógeno e, por isso, pode facilitar a transmissão para humanos e outras serpentes.

Diferente de mamíferos, répteis raramente apresentam sinais clínicos de afecções renais (Miller, 1998). Ao realizar infecção experimental de serpentes com o sorovar Pomona, Abdulla e Karstad (1962) observaram nefrite intersticial em um animal. Já Biscola et al. (2011) relataram problemas reprodutivos em jararacas (*Bothrops*) soropositivas para o sorovar Hardjo.

Todas as cascavéis deste estudo eram mantidas em cativeiro. Ambientes estressantes, concentração de grande número de animais, agrupamento de diferentes espécies e erros de manejo são condições que facilitam a multiplicação e transmissão de patógenos em répteis cativos. Todos esses fatores reduzem a capacidade de resposta imune e aumentam as chances de desenvolvimento de doenças como a leptospirose. O estabelecimento de práticas de saneamento e higiene pessoal pode minimizar os riscos de transmissão (Rataj et al., 2011). Além disso, é fundamental que sejam realizados exames sorológicos periodicamente para que se conheça a ocorrência da zoonose no plantel, já que em serpentes, os exames físicos podem ser insuficientes.

Também devem passar por testes diagnósticos os animais que serão introduzidos nos plantéis ou levados para residências como animais de companhia. Na maioria dos criadouros de serpentes, parte dos animais é retirada de vida livre ou resultante do cruzamento de animais de vida livre com serpentes nascidas em cativeiro (Rataj et al., 2011) e a introdução de animais hospedeiros de *Leptospira* spp. pode ser uma importante forma de transmissão da leptospirose nesses serpentários. As serpentes podem se infectar por contato direto com animais hospedeiros de leptospiros, ou ainda pela ingestão de água contaminada (Hyakutake et al., 1980).

As cascavéis utilizadas no presente estudo foram retiradas de vida livre e habitavam áreas rurais ou periurbanas antes de serem confinadas. Portanto, existe a possibilidade de que alguns animais tenham entrado em contato com leptospiros em

seu ambiente natural e introduzido esse agente no criadouro, contaminando outras serpentes.

Roedores são reservatórios naturais dos sorovares Javanica, Andamana e Patoc (Shenberg et al., 1975; Priya et al., 2007), frequentes nas serpentes deste estudo. Por isso, deve-se considerar também a possibilidade de que essas cascavéis tenham sido expostas a *Leptospira* spp. ao ingerirem presas infectadas, já que no criadouro não há controle de roedores sinantrópicos. Essa possibilidade de transmissão pela cadeia alimentar em serpentes também foi sugerida nos estudos de Andrews et al. (1965) e Hyakutake et al. (1980). No zoológico de João Pessoa, Paraíba, nenhum réptil foi positivo na SAM (triagem de 1:100), e os autores do trabalho relacionaram esse resultado ao tipo de alimentação oferecida aos animais, sendo camundongos advindos de biotério com rígido controle sanitário (Brasil, 2011).

Existem poucos estudos sobre a ocorrência de anticorpos contra leptospiras em serpentes e não foram encontradas pesquisas sobre a doença em *C. durissus collilineatus*. Até onde se sabe, reações aos sorovares Djasiman, Cynopteri, Sentot e Whitcomb ainda não foram descritas em serpentes. Entretanto, os outros para os quais houve sororreação no presente estudo já foram relatados nesses animais (Andrews et al., 1965; Hyakutake et al., 1980; Stanchi et al., 1986; Calle et al., 2001; Biscola et al., 2011; Lindtner-Knific et al., 2013).

Mais da metade das serpentes desse estudo foi sororreagente para o sorovar Andamana. Hyakutake et al. (1980) sugeriram que esses répteis podem atuar como reservatórios do sorovar, devido à alta frequência de animais positivos para essa variedade de leptospira. Esses autores também isolaram Andamana do rim de um ofídio.

Existem relatos de serpentes que apresentaram títulos altos na SAM, de até 3200 (Biscola et al., 2011) e 6400 (Hyakutake et al., 1980). Já Calle et al. (2001) encontraram títulos mais baixos, de 100 e 200 em sucuris (*Eunectes murinus*) na Venezuela. Os títulos mais baixos, como os que ocorreram com maior frequência neste estudo, podem indicar infecções recentes, anticorpos remanescentes de infecções antigas, resposta de anticorpos à leptospiras presentes nas presas ingeridas ou reações cruzadas contra sorovares que não foram testados na SAM (Calle et al., 2001). Os títulos altos, como as de 800 e 1600 podem indicar doença aguda.

Não existem estudos sobre o ponto de corte que deve ser utilizado na sorologia de répteis e nem sobre os títulos padrões nesses animais. Por isso, qualquer título, mesmo os mais baixos, pode ser importante e representar doença mesmo sem apresentação de sinais clínicos. Os mecanismos de resposta do sistema imunológico de serpentes ainda não foram completamente descritos, mas sabe-se que podem manter leptospiros patogênicas ativas em seu organismo mesmo sem demonstrarem títulos detectáveis de anticorpos nas provas sorológicas (Minette, 1983).

## 2.5 CONCLUSÕES

Quase 90% das cascavéis *C. durissus collilineatus* deste estudo entraram em contato com leptospiros e algumas apresentaram títulos altos mesmo sem mostrar sintomatologia clínica. Esses animais podem atuar como hospedeiros de manutenção de sorovares de leptospiros e por isso, deve-se atentar para a possibilidade de serpentes de cativeiro atuarem como fontes de infecção de leptospiros para humanos e outros animais e à importância da leptospirose como zoonose ocupacional.

## LITERATURA CITADA

Abdulla, P. K., Karstad, L., 1962. Experimental infections with *Leptospira pomona* in snakes and turtles. *Zoonoses Research*, 1, 295-306.

Adler, B., Moctezuma, A. P., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140, 287-296.

Andrews, R. D., Reilly, J. R., Ferris, D. H., Hanson, L. E., 1965. Leptospiral agglutinins in sera from southern Illinois herpetofauna. *Journal of Wildlife Diseases*, 1 (4), 55-59.

Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. S., 2007. *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 364 pp.

Badke, M. R. T., 2001. *Leptospirose*. ABRAVES, Santa Catarina.  
[http://www.cnpsa.embrapa.br/abravesc/pdf/Memorias2001/1\\_manuelrenato.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/abravesc/pdf/Memorias2001/1_manuelrenato.pdf)

Baranton, G., 2006. Institut Pasteur.  
<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>

Biscola, N. P., Fornazari, F., Saad, E., Richini-Pereira, V. B., Campagner, M. V., Langoni, H., Barraviera, B., Ferreira Junior, R. S., 2011. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31 (9), 806-811.

Brasil, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Leptospirose. 1995. *Manual de Leptospirose (2 Ed)*. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 98 pp.

Brasil, A. W. L., 2011. Anticorpos anti-leptospira em animais silvestres do Parque Zoológico Arruda Câmara na cidade de João Pessoa. Trabalho de Conclusão de Curso, Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 37 pp.

Calle, P. P., Rivas, J., Muñoz, M., Thorbjarnarson, J., Holmstrom, W., Karesh, W. B., 2001. Infectious disease serologic survey in free-ranging Venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 32, 320-323.

Corrêa, M. O. A., Hyakutake, S., Natale, V., Tribia, A. C., Galvão, P. A. A., 1964. Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 6 (2), 71-74.

Cruz, M. L. S., Andrade, J., Pereira, M. M., 1994. Leptospirose em crianças no Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27 (1), 5-9.

Ebani, V. V., Fratini, F., 2005. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. *Annali dello Facoltà di Medicina Veterinaria*, 58, 85-89.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. *Leptospira* and Leptospirosis (2 Ed.). MediSci, Melbourne, 272 pp.

Francisco, L. R., 1997. Répteis do Brasil – Manutenção em Cativeiro (1 Ed.). Amaro, São José dos Pinhais, 207 pp.

Feuer, B., Domash-Martinez, T., 2011. Report of case: leptospirosis after exposure to alligator carcass. *Osteopathic Family Physician*, 3 (1), 23–26.

Glosser, J. W., Sulzer, C. R., Eberhardt, M., Winkler, W. G., 1974. Cultural and serologic evidence of *Leptospira interrogans* serotype Tarassovi infection in turtles. *Journal of Wildlife Diseases*, 10, 429-435.

Goulart, C. E. S., 2004. Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis (1 Ed.). L.F. Livros e Veterinária, Rio de Janeiro, 329 pp.

Hyakutake, S., Biasi, P. D., Belluomini, H. E., Santa Rosa, C. A., 1980. Leptospiroses in Brazilian snakes. *The International Journal of Zoonoses*, 7, 73-77.

Jamshidi, S., Akhavizadegan, M. A., Bokaie, S., Maazi, N., Ghorban, A. A., 2009. Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 1 (2), 32-36.

Lindtner-Knific, R., Vergles-Rataj, A., Vlahovic, K., Zrimsek, P., Dovic, A., 2013. Prevalence of antibodies against *Leptospira* sp. in snakes, lizards and turtles in Slovenia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 65.

Miller, H. A., 1998. Urinary Diseases of Reptiles: Pathophysiology and Diagnosis. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 7 (2), 93-103.

Minette, H. P., 1983. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. *International Journal of Zoonoses*, 10 (2), 111-121.

Natarajaseenivasan, K., Vedhagiri, K., Sivabalan, V., Prabakaran, S. G., Sukumar, S., Artiushin, S. C., Timoney, J. F., 2011. Seroprevalence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Javanica infection among dairy cattle, rats and humans in the Cauvery River Valley of Southern India. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42 (3), 679-686.

Puliyath, G., Singh, S., 2012. Leptospirosis in pregnancy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31, 2491-2496.

Priya, C. G., Hoogendijk, K. T., Berg, M. V. D., Rathinam, S. R., Ahmed, A., Muthukkaruppan, V. R., Hartskeerl, R. A., 2007. Field rats from a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India. *Journal of Postgraduated Medicine*, 53 (4), 236-240.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C., 2005. Espiquetas. In: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Ed. Artmed, 179-189.

Rataj, A. V., Lindtner-Knific, R., Vlahović, K., Mavri, U., Dovč, A., 2011. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 33.

Rossetti, C. A., Uhart, M., Romero, G. N., Prado, W., 2003. Detection of leptospiral antibodies in caimans from the Argentinian Chaco. *Veterinary Record*, 153, 632-633.

Shenberg, E., Lindenbaum, I., Dikken, H., Torten, M., 1975. Isolation of a "saprophytic" leptospiral serotype Andamana from carrier rats in Israel. *Tropical and Geographical Medicine*, 27, 395-398.

Silva, E. F., Seyfert, N., Cerqueria, G. M., Leihs, K. P., Athanzio, D. A., Valente, A. L. S., Dellagostin, A. O., Brod, C. S., 2009. Serum antileptospiral agglutinins in freshwater turtles from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 227-230.

Stanchi, N. O., Grisóla, C. S., Martino, P. E., Peluso, F. O., 1986. Presence of antileptospira antibodies in ophidia in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 18, 127-130.

Veen, I. M., Keessen, E. C., Knapen, F., 2012. Control of zoonotic risks for pregnant animal handlers in zoos. Department of Veterinary Public Health, IRAS, 9 pp.

Wallach, J. D., 1983. *Diseases of Exotic Animals Medical And Surgical Management*. WB. Saunders, Philadelphia, 979-1043.

WHO, World Health Organization, 2003. *Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. WHO Library Cataloguing in Publication Data.

WHO/FAO/OIE, 2011. *Leptospira* Serovar Data Sheet – Serovar Javanica. Collaborating Centre for Reference & Research on Leptospirosis. <http://www.health.qld.gov.au/qhcss/qhss/lepto/documents/javanica.pdf>

Zippel, K. C., Lillywhite, H. B., Mladinich, C. R. J., 2001. New Vascular System in Reptiles: Anatomy and Postural Hemodynamics of the Vertebral Venous Plexus in Snakes. *Journal of Morphology*, 250, 173-184.

### **CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS EM *Crotalus durissus collilineatus* SORORREAGENTES PARA LEPTOSPIROSE**

RODRIGUES, T. C. S.<sup>1</sup>; SANTOS, A. L. Q.<sup>1</sup>; LIMA, A. M. C.<sup>2</sup>; BRITES, V. L. C.<sup>3</sup>; VIEIRA, D. S.<sup>4</sup>; MUNDIM, A. V.<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Avenida Amazonas 2245, Jardim Umuarama, 38.405-302, Uberlândia-MG, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 33, Campus Umuarama, 38.405-315, Uberlândia-MG, Brazil.

<sup>3</sup>Setor de Manutenção de Répteis, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Campus Umuarama, 38.405-315, Uberlândia-MG, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório Clínico Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. (UFU), Av. Mato Grosso 3289, Bloco 2S, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38405-314, Brazil.

**RESUMO:** O diagnóstico da leptospirose em serpentes é dificultado pela falta de estudos sobre a doença nesses animais. Objetivou-se determinar as alterações bioquímicas plasmáticas em cascavéis *Crotalus durissus collilineatus* reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (SAM) com triagem de 1:25 e avaliar se a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. pode indicar infecção e alterações bioquímicas nesses animais. Além disso, buscou-se estudar as diferenças bioquímicas dependendo do título de anticorpos na SAM e com isso e somar informações para interpretação do teste sorológico nas serpentes. Foram utilizadas 48 *C. d. collilineatus* divididas em 3 grupos: negativas na SAM, positivas com títulos  $\leq 50$  e positivas com títulos  $\geq 100$ . Foram dosadas as concentrações plasmáticas de proteínas totais, albumina, globulinas, relação albumina/globulinas, ácido úrico, creatinina, ureia, ALT, GGT, fosfatase alcalina e ferro em processador automático.

Apesar de aparentemente saudáveis, a avaliação dos parâmetros bioquímicos das cascavéis sugere que as serpentes reagentes para leptospirose possam apresentar inflamação e infecção mesmo com títulos de anticorpos considerados baixos para mamíferos. As serpentes com títulos altos apresentaram alterações que indicam quadros mais graves que aquelas com títulos menores, como lesão renal grave e indícios de doença hepática, que são característicos da leptospirose. A avaliação bioquímica de répteis reagentes para o teste sorológico pode auxiliar o diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp. já que esses animais raramente apresentam sintomatologia clínica.

Palavras-Chave: Bioquímica clínica, Cascavel, *Leptospira*, Répteis, Soraglutinação microscópica.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose pouco conhecida em répteis e bastante estudada nos mamíferos, causando principalmente lesões hepáticas e renais (Rose, 1966) e sintomatologia inespecífica e variada, dependendo dos órgãos afetados (Corrêa e Corrêa, 1992). Geralmente relata-se febre, anorexia, oligúria, anúria, vômito, desidratação, icterícia e hemorragias gastrointestinais, além de quadros reprodutivos (Ettinger e Feldman, 2004).

Na maior parte das vezes, o diagnóstico da doença é feito pela associação dos sinais clínicos ao resultado de provas laboratoriais, como o teste de soraglutinação microscópica (SAM). Esse teste é utilizado em todo o mundo e indica a presença e títulos de aglutininas contra *Leptospira* spp. no soro de animais infectados. Nos mamíferos domésticos, são consideradas reagentes as amostras com títulos iguais ou superiores a 100. A interpretação desses títulos é complicada e diversos fatores devem ser levados em consideração (Bolin e Alt, 1999; Gomes, 2011).

Resultados positivos nem sempre indicam infecção atual, pois os anticorpos podem permanecer na circulação sanguínea por longos períodos após o contato com as leptospiros (WHO, 2003). Em mamíferos, títulos baixos podem ser encontrados em hospedeiros de manutenção, animais recém-infectados ou em

infecções crônicas. Títulos altos associados à sintomatologia compatível indicam doença atual (Bolin e Alt, 1999).

Nos répteis, o diagnóstico da leptospirose é ainda mais difícil. Tanto serpentes de vida livre quanto serpentes mantidas em cativeiro podem ser hospedeiras de vários sorovares de leptospiros sem apresentar sintomatologia clínica (Biscola et al., 2011). Além disso, a falta de estudos sobre os títulos nesses animais prejudica a sua interpretação (Rossetti et al., 2003) e não se sabe a partir de qual título deve-se considerar ocorrência de infecção.

O estudo da bioquímica sanguínea pode ser importante para conhecer o estado de saúde desses animais (Hidalgo-Vila et al., 2007) e, associado ao resultado do teste sorológico, diagnosticar a leptospirose. Apesar do aumento do número de pesquisas sobre os valores de bioquímica de répteis, ainda se sabe muito pouco sobre esses parâmetros e sua interpretação (Bryant et al., 2012). Nesses animais, a concentração de constituintes plasmáticos pode variar de acordo com as condições ambientais e adaptações fisiológicas dos répteis, tornando difícil estabelecer os significados clínicos de variações (Nardini et al., 2013).

Nos mamíferos, os achados bioquímicos de animais com leptospirose indicam lesão renal e hepática. Geralmente são relatados uremia e aumento da concentração sérica de creatinina, enzimas hepáticas e bilirrubina (Ettinger e Feldman, 2004). As alterações mais frequentes nos répteis acometidos pela doença não são conhecidas.

Baseado na falta de informações sobre o tema objetivou-se determinar as alterações bioquímicas plasmáticas em cascavéis *Crotalus durissus collilineatus* positivas no teste de soroaglutinação microscópica e assim, avaliar se a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. pode indicar infecção e desenvolvimento de quadros patológicos nesses animais. Além disso, buscou-se estudar as diferenças bioquímicas dependendo do título de anticorpos na SAM.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Animais e grupos amostrais

Sessenta e quatro cascavéis *C. durissus collilineatus* pertencentes ao Setor de Répteis (Criadouro Conservacionista – Finalidade Científica) da Universidade

Federal de Uberlândia (UFU) passaram por teste de soroaaglutinação microscópica (SAM) para diagnóstico de leptospirose (Rodrigues et al., não publicado). Foram consideradas positivas as amostras que aglutinaram na diluição de 1:25 e os títulos variaram de 25 a 1600. A partir do resultado desse teste, foram selecionadas 48 serpentes divididas igualmente em três grupos: animais negativos na SAM, positivos com título menor ou igual a 50 ( $\leq 50$ ) e positivos com título maior ou igual a 100 ( $\geq 100$ ).

Todas as serpentes eram adultas, de ambos os sexos, clinicamente saudáveis, com boa condição corporal e aparentemente bem hidratadas. Foram encaminhadas ao criadouro pelo IBAMA ou pela Polícia Ambiental, por terem sido encontradas em áreas periurbanas nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (MG). A cada 15 dias, foram alimentadas com camundongos criados no biotério do próprio Setor e tinham acesso à água *ad libitum*. A pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU (análise final 120/14), assim como liberação do IBAMA (licença SISBIO número 46845).

Foram realizadas coletas de sangue e análises de parâmetros bioquímicos plasmáticos das serpentes a fim de avaliar as possíveis alterações causadas pela infecção em cada grupo de animais positivos (títulos  $\leq 50$  e  $\geq 100$ ) quando comparados com o grupo de animais negativos. Para minimizar as alterações bioquímicas causadas por diferenças no manejo, localização geográfica, época do ano, alimentação e forma de coleta do sangue, as serpentes foram mantidas nas mesmas condições de criação.

### 3.2.2 Amostras

As serpentes foram contidas manualmente utilizando ganchos, como indicado por Francisco (1997) e Goulart (2004), de maneira a permitir livre acesso à cabeça do indivíduo. A colheita do sangue (2mL) foi realizada após prévia assepsia com álcool 70%, por punção do plexo venoso vertebral, descrito por Zippel et al. (2001), entre o osso occipital e o atlas, com agulha 0,45 x 13mm e seringa de 5mL. As amostras foram armazenadas em tubos de 3mL contendo heparina lítica, e posteriormente centrifugadas a 720g durante cinco minutos em centrífuga Baby 2-Fanem para a obtenção do plasma. Todos os animais estavam em jejum de 15 dias para realização da coleta.

### 3.2.3 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram processadas colorimetricamente em Analisador Automático de Bioquímica Chemwell (Awareness Technology®, Inc), previamente calibrado com calibra H e aferido com soro controle qualitol H. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: proteínas totais (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), globulinas (cálculo: proteína total-albumina), relação albumina/globulinas (relação A/G) (cálculo: albumina/globulinas), ácido úrico (método enzimático Trinder), creatinina (método picrato alcalino), uréia (método enzimático UV), ferro (método Ferrosina), alanina aminotransferase (ALT) (método Cinético UV IFCC), gama glutamiltransferase (GGT) (método Szasz modificado) e fosfatase alcalina (FAL) (método Bowers e Mc Comb modificado).

### 3.2.4 Análises estatísticas

O trabalho foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso, com 16 repetições, totalizando 48 observações. Testou-se a normalidade dos resíduos de cada variável utilizando o teste de Anderson-Darling (significância de 5%), com a finalidade de definir o tipo de teste a ser aplicado em cada caso. Usou-se análise de variâncias e teste de Tukey para as variáveis com distribuição normal e teste de Kruskal-Wallis para aquelas que não atendiam aos pressupostos da análise de variâncias. Esses procedimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a ocorrência de diferença estatística entre cada grupo e também foi adotado significância de 5%.

Os procedimentos de análise de normalidade de resíduos e testes de Kruskal-Wallis foram feitos por meio da ferramenta Action (2014) ([www.portalaction.com.br](http://www.portalaction.com.br)) que utiliza o programa R (R Development Core Team, 2014). Já para análise de variância e teste de Tukey foi utilizado o software SISVAR (Ferreira, 2011). Todos os procedimentos de análise estatística utilizados foram descritos por Banzatto e Kronka (1989), Triola (1999) e Ayres et al. (2007).

### 3.3 RESULTADOS

As concentrações (média±desvio padrão) dos constituintes bioquímicos avaliados constam na Tabela 1. As variáveis albumina, proteína total, globulina, relação A/G, ácido úrico e creatinina tiveram distribuição normal e, por isso, foi aplicado o teste de análise de variância seguido de teste de Tukey. As demais variáveis passaram pelo teste de Kruskal-Wallis por não terem distribuição normal.

Os valores plasmáticos de albumina foram maiores nos animais negativos na SAM do que nos animais com títulos altos ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferença dependendo dos títulos e nem entre animais negativos e com títulos mais baixos ( $p > 0,05$ ). A concentração de proteína total foi maior no grupo de animais com títulos  $\leq 50$  que no grupo de animais negativos ( $p < 0,05$ ) e não houve diferença entre os animais negativos e os com títulos  $\geq 100$  e nem entre os grupos de diferentes títulos ( $p > 0,05$ ). As concentrações plasmáticas de globulinas foram maiores nos animais reagentes do que nos animais negativos ( $p < 0,05$ ) e não houve diferenças entre os grupos de títulos diferentes ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

A relação A/G foi menor nos animais reagentes que nos negativos ( $p < 0,05$ ) e não sofreu alterações dependendo dos títulos ( $p > 0,05$ ). Já o valor de ácido úrico foi maior nas serpentes com títulos  $\geq 100$  do que naquelas com títulos  $\leq 50$  ou negativas ( $p < 0,05$ ). Esse constituinte teve valores estatisticamente iguais nos animais negativos e com títulos baixos ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre as concentrações plasmáticas de creatinina, ureia, ferro, ALT, GGT e FAL entre os grupos independente da presença de anticorpos contra *Lepstospira* spp. ou títulos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações (média  $\pm$  desvio padrão) dos constituintes bioquímicos plasmáticos de *Crotalus durissus collilineatus* não reagentes, reagentes com títulos  $\leq 50$  e reagentes com títulos  $\geq 100$  no teste de soroaglutinação microscópica (SAM). Uberlândia, 2014.

Constituintes bioquímicos (unidade)	Não reagentes (n=16)	Títulos $\leq 50$ (n=16)	Títulos $\geq 100$ (n=16)
Albumina (g/dL)	1,33 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	1,15 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	0,97 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
Prot. total (g/dL)	5,07 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	6,15 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	5,65 $\pm$ 1,62 <sup>ab</sup>
Globulina (g/dL)	3,74 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	5,00 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	4,68 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup>
Relação A/G (A/G)	0,37 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,23 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Ac. Úrico (mg/dL)	0,90 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	1,55 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	2,96 $\pm$ 1,38 <sup>b</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,52 $\pm$ 0,21	0,42 $\pm$ 0,26	0,40 $\pm$ 1,38
Uréia (mg/dL)	10,98 $\pm$ 14,81	8,31 $\pm$ 4,46	5,96 $\pm$ 3,50
Ferro ( $\mu$ g/dL)	99,68 $\pm$ 61,40	122,62 $\pm$ 60,62	99,66 $\pm$ 69,09
ALT (U/L)	11,93 $\pm$ 11,32	12,81 $\pm$ 12,21	8,50 $\pm$ 5,40
GGT (U/L)	12,10 $\pm$ 6,53	9,89 $\pm$ 6,33	9,76 $\pm$ 8,95
FAL (U/L)	93,05 $\pm$ 45,06	86,93 $\pm$ 34,45	58,46 $\pm$ 32,12

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

De maneira geral, a análise das proteínas plasmáticas é uma importante ferramenta para avaliar o estado de saúde de um réptil (Lawton, 2005) e nesse estudo as alterações nas concentrações de albumina, globulinas e relação A/G foram relevantes. Os animais com títulos  $\geq 100$  mantiveram os valores de proteínas totais iguais aos dos animais negativos, o que sugere que a redução dos valores de albumina tenha sido compensada pelo aumento das globulinas. Já no grupo com títulos  $\leq 50$  houve aumento da concentração de proteína total, que pode ter ocorrido pelo aumento das globulinas somado à manutenção dos valores fisiológicos de albumina. Nos dois grupos reagentes houve elevação das concentrações de

globulinas acompanhada de redução na relação A/G. Segundo Cray et al. (2001) e Stahl (2006) essas alterações indicam inflamação e infecção em répteis.

A albumina atua na manutenção da pressão oncótica e é produzida pelo fígado. Quedas em sua concentração podem ser causadas por redução na absorção de aminoácidos (má nutrição, anorexia ou doenças intestinais), redução em sua produção (doenças hepáticas) ou perdas proteicas (doenças intestinais, doenças renais ou hemorragias) (Eatwell et al., 2014). Como as *C. d. collilineatus* desse estudo alimentavam-se com a mesma periodicidade e não apresentavam alterações intestinais, acredita-se que o menor valor de albumina nos animais com títulos altos seja relacionado a danos hepáticos e renais, que são comuns na leptospirose. Segundo Eatwell et al. (2014), a hipoalbuminemia pode gerar edemas e ascite, mas esses sinais não foram percebidos nesse estudo.

Diferente do que ocorre em mamíferos, o ácido úrico é o principal produto do metabolismo de proteínas excretado por répteis terrestres. É produzido no fígado e a excreção ocorre pelos rins. Em condições normais apenas pequena parte passa para o sangue, mas elevações plasmáticas desse metabólito são comuns após a alimentação de répteis carnívoros ou em animais com desnutrição grave, devido ao aumento do catabolismo de compostos nitrogenados (Knotek et al. 2011; Eatwell et al., 2014). A hiperuricemia também pode decorrer de diminuição na taxa de excreção por redução do fluxo sanguíneo renal em casos de desidratação ou falência renal aguda (Eatwell et al., 2014).

Segundo Lawton (2005), para que haja elevação da concentração plasmática de ácido úrico é necessário que mais de 60% da função renal esteja comprometida. Já que as serpentes desse estudo não estavam desnutridas ou desidratadas e passaram por breve jejum antes da coleta do sangue, o aumento nos valores de ácido úrico no grupo de cascavéis com títulos  $\geq 100$  pode sugerir lesão renal severa. Essa elevação também pode estar relacionada à bacteremias (Miller, 1998), reforçando a suspeita de infecção ativa nesse grupo.

Répteis com lesões renais graves raramente apresentam sinais clínicos e podem parecer saudáveis (Miller, 1998), assim como as cascavéis desse estudo. Quando presentes, os sinais de nefropatias podem incluir anorexia, caquexia, aumento dos rins à palpação, edemas, entre outros (Ramsay e Dotdon, 1995). A avaliação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos pode ser importante no diagnóstico dessas patologias, principalmente se interpretados levando em

consideração o histórico do paciente e a suspeita clínica (Stahl, 2006; Eatwell et al., 2014). Segundo Wallach (1983), a leptospirose geralmente não está associada à sintomatologia clínica em serpentes, mas Abdulla e Karstad (1962) observaram nefrite intersticial em um animal inoculado experimentalmente com leptospirosas.

Uréia e creatinina não são parâmetros úteis para avaliar a função renal nos répteis nem mesmo em casos de falência dos rins (Miller, 1998; Eatwell et al., 2014). Esses constituintes têm produção e excreção baixas e variáveis e o aumento em sua concentração plasmática pode indicar desidratação (Lawton, 2005). Os valores de uréia e creatinina foram iguais em todos os grupos desse trabalho, indicando que todas as cascavéis estavam normohidratadas.

ALT, GGT e FAL são enzimas encontradas no fígado, rins e diversos outros tecidos. Diferente do que ocorre em mamíferos e aves, são pouco específicas e por isso, pouco úteis para avaliar a função hepática de répteis. Elevações nessas enzimas nem sempre indicam lesões hepáticas ou renais e mesmo em caso de hepato ou nefropatia podem não estar alteradas (Stahl, 2006; Anderson et al., 2013; Eatwell et al., 2014). FAL e ALT foram encontradas em concentrações altas nos rins de serpentes *Elaphe obsoleta quadrivittata*, mas acredita-se que em caso de lesão renal essas enzimas sejam excretadas na urina e não aumentem sua concentração no sangue (Ramsay e Dotdon, 1995).

O ferro tem papel fundamental em diversas funções celulares (Ciuraszkiewicz et al., 2007) e pode ser importante também no controle de infecções. Em um estudo realizado por Grieger e Kluger (1978) foi observado que lagartos infectados experimentalmente com bactérias *Aeromonas hydrophila* tiveram queda das concentrações séricas de ferro, assim como ocorre em mamíferos. Segundo Garibaldi (1972) e Weinberg (1974) (citados por Grieger e Kluger, 1978), o crescimento de algumas bactérias está relacionado à disponibilidade de ferro no hospedeiro. O papel desse mineral nas infecções de répteis não é bem conhecido, mas sugere-se que a redução dos seus valores séricos diminua o potencial de desenvolvimento de bactérias (Grieger e Kluger, 1978). Ao contrário do que se esperava, não houve diferenças nas concentrações de ferro plasmático entre as *C. d. collilinetas* reagentes e não reagentes para o teste sorológico de leptospirose.

### 3.5 CONCLUSÕES

Apesar de aparentemente saudáveis, a avaliação dos parâmetros bioquímicos de *C. durissus collilineatus* sugere que as serpentes reagentes no teste de soroaglutinação microscópica possam apresentar inflamação e infecção mesmo com títulos de anticorpos considerados baixos para mamíferos. Por isso, sugere-se que seja utilizado o título 1:25 para triagem da SAM nessa espécie.

*C. d. collilineatus* com títulos  $\geq 100$  alterações bioquímicas que sugerem a ocorrência de lesão renal grave e doença hepática, que são características da leptospirose. A avaliação bioquímica de répteis positivos para o teste sorológico pode ser importante para o diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp., em associação ao teste de soroaglutinação microscópica, já que esses animais raramente apresentam sintomatologia clínica. Para isso, sugere-se que as concentrações de albumina, proteína total, globulinas e ácido úrico sejam analisadas, além da relação A/G.

## LITERATURA CITADA

Abdulla, P. K., Karstad, L., 1962. Experimental infections with *Leptospira pomona* in snakes and turtles. *Zoonoses Research*, 1, 295-306.

Action. Disponível em [www.portalaction.com.br](http://www.portalaction.com.br). Acesso em 04/09/2014.

Anderson, E. T., Socha, V. L., Gardner, J., Byrd, L., Manire, C. A., 2013. Tissue enzyme activities in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1), 62–69.

Ayres, M., Ayres Jr. M., Ayres, D. L., Santos, A. S., 2007. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: CNPq, 364 pp.

Banzatto, D. A., Kronka, S. do N., 1989. Experimentação agrícola. FUNESP, 247 pp.

Biscola, N. P., Fornazari, F., Saad, E., Richini-Pereira, V. B., Campagner, M. V., Langoni, H., Barraviera, B., Ferreira Junior, R. S., 2011. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31 (9), 806-811.

Bolin, C. A., Alt, D. P. 1999. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. *Bovine Practitioner*, 33, 50-55.

Bryant, G. L., Fleming, P. A., Twomey, L., Warren, K. A., 2012. Factors affecting hematology and plasma biochemistry in the southwest carpet python (*Morelia spilota imbricata*). *Journal of Wildlife Diseases*, 48(2), 282–294.

Ciuraszkiewicz, J., Olczak, M., Watorek, W., 2007. Isolation and characterisation of crocodile and python ovotransferrins. *Acta Biochimica Polonica*, 54 (1), 175–182.

Corrêa, W. M., Corrêa, N. M., 1992. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos (2 Ed.). Medsi, Rio de Janeiro, 219-240.

Cray, C., Varella, R., Bossart, G. D., Lutz, P. 2001. Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 32 (4), 436–440.

Eatwell, K., Hedley, J., Barron, J. H., 2014. Reptile haematology and biochemistry. In *Practice*, 36, 34-42.

Ettinger, S. J., Feldman, E. C., 2004. Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato. 5. ed., v. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2156 pp.

Ferreira, D. F., 2011. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35 (6), 1039-1042.

Francisco, L. R., 1997. Répteis do Brasil – Manutenção em Cativeiro (1 Ed.). Amaro, São José dos Pinhais, 207 pp.

Gomes, M., 2011. Gênero *Leptospira* spp. *Microbiologia Clínica Veterinária VET* 3225. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/Lepto201102.pdf>

Goulart, C. E. S., 2004. Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis (1 Ed.). L.F. Livros e Veterinária, Rio de Janeiro, 329 pp.

Grieger, T. A., Kluger, M. J. 1978. Fever and Survival: The role of serum iron. *Journal of Physiology*, 279, 187-196.

Hidalgo-Vila, J., Diaz-Paniagua, C., Perz-Santigosa, N., Plaza, A., Camacho, I., Recio, F., 2007. Hematologic and Biochemical Reference Intervals of Free-Living Mediterranean Pond Turtles (*Mauremys leprosa*). *Journal of Wildlife Diseases*, 43 (4), 798–801.

Knotek Z., Knotkova Z., Hrdá, A., 2011. Clinical Haematology and Plasma Chemistry in Reptiles. -5th ed. Southern European Veterinary Conference (SEVC) Sept. 20 - Oct. 2. Barcelona, Espanha.

Lawton, M. P. C., 2005. Herp biochemistry results – What do they mean and why do I need them? The North American Veterinary Conference Proceedings, 1285-1286.

Miller, H. A., 1998. Urinary Diseases of Reptiles: Pathophysiology and Diagnosis. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 7 (2), 93-103.

Nardini, G., Leopardi, S., Bielli, M., 2013. Clinical Hematology in Reptilian Species. Veterinary Clinics: Exotic Animals, 16, 1-30.

Ramsay, E. C., Dotson, T. K., 1995. Tissue and serum enzyme activities in the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). American Journal of Veterinary Research, 56 (4), 423-428.

R Development Core Team., 2014. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>

Rodrigues, T. C. S., Santos, A. L. Q., Lima, A. M. C., Gomes, D. O., Brites, V. L. C., 2014. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em *Crotallus durissus collilineatus*. Não publicado.

Rose, G. W., 1966. Mechanism of tissue cell penetration by leptospira pomona: active, penetration studies in vitro. American Journal of Veterinary Reserach, 27, 1461-1471.

Rossetti, C. A., Uhart, M., Romero, G. N., Prado, W. Detection of leptospiral antibodies in caimans from the Argentinian Chaco. Veterinary Record, 153, 632-633, 2003.

Stahl, S. J. 2006. Reptile hematology and serum chemistry. Proceedings of the North American Veterinary Conference, Small Animal Edition – Exotics: Reptiles and Amphibians, Orlando, Florida, 20, 1673-1676.

Triola. M. F., 1999. Introdução à Estatística. LTC: Rio de Janeiro, 7. ed., 410p.

Wallach, J. D., 1983. Diseases of Exotic Animals Medical And Surgical Management. WB. Saunders, Philadelphia, 979-1043.

WHO. World Health Organization. 2003. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO Library Cataloguing in Publication Data.

Zippel, K. C., Lillywhite, H. B., Mladinich, C. R. J., 2001. New Vascular System in Reptiles: Anatomy and Postural Hemodynamics of the Vertebral Venous Plexus in Snakes. Journal of Morphology, 250, 173-184.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;  
e-mail: ceua@propp.ufu.br; [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº 014/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 120/14

Projeto Pesquisa: "Leptospirose em cascavéis *Crotalus durissus collilineatus* de cativeiro e de vida livre."

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 28 de janeiro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU

## ANEXO B - Autorização para atividades com finalidade científica SISBIO



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

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 46845-1	Data da Emissão: 11/11/2014 23:09	Data para Revalidação*: 11/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Thaís Carneiro Santos Rodrigues	CPF: 016.100.276-55
Título do Projeto: LEPTOSPIROSE EM CASCAVÉIS <i>Crotalus durissus collilineatus</i> DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Estudo da ocorrência de leptospirose em cascavéis <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	12/2014	12/2018

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

## Outras ressalvas

1	1) Esta Autorização não contempla a coleta in situ de exemplares de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> , posto que dos setenta(70) exemplares a serem utilizados no estudo, alguns são oriundos de vida livre, repassados ao Hospital Veterinário da UFU pelo IBAMA e POLÍCIA AMBIENTAL/MG, sendo que os exemplares de cativeiro já pertencem ao plantel do Setor de Manutenção de Répteis do Instituto de Biologia da UFU, registrado no IBAMA sob nº301283, na modalidade Criadouro Conservacionista da Fauna Silvestre com Fins Científicos (IN Ibama 169/2008); 2) A proponente deverá atualizar o campo FORMAÇÃO ACADEMICA/TITULAÇÃO, do seu LATTES, no tocante ao seu vínculo de pós-graduanda junto à UFU.
---	---

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA RIBEIRO	Coordenador Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas	966.309.496-88	5420105 SSP-MG	Brasileira
2	Danielle Souza Vieira	Executor das análises de patologia clínica	101.144.386-41	13738870 ssp-MG	Brasileira
3	André Luiz Quagliatto Santos	Coordenador do projeto	028.478.228-95	8334281 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 93868364





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

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 46845-1	Data da Emissão: 11/11/2014 23:09	Data para Revalidação*: 11/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Thaís Carneiro Santos Rodrigues	CPF: 016.100.276-55
Título do Projeto: LEPTOSPIROSE EM CASCAVÉIS <i>Crotalus durissus collilineatus</i> DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE	
Nome da Instituição : Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

4	Vera Lucia de Campos Brites	Coordenador Setor de Répteis do Instituto de Biologia	236.115.968-04	M-131.083 SSP-MG	Brasileira
5	Antonio Vicente Mundim	Coordenador Laboratório de Patologia Clínica	138.726.136-34	M-948994 SSP-MG	Brasileira

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

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	UBERLÂNDIA	MG	Universidade Federal de Uberlândia	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	<i>Crotalus durissus</i>

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Secreção
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal de Uberlândia	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 93868364



