

Danilo Kluyber

**Avaliação da Prevalência de Patógenos Zoonóticos de Importância para Saúde
Pública em Tatus de Vida Livre – Mato Grosso do Sul - Brasil**

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical de São Paulo da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Expedito de A. Luna

São Paulo

2016

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Kluyber, Danilo

Avaliação da prevalência de patógenos zoonóticos de importância para saúde pública em tatus de vida livre – Mato Grosso do Sul - Brasil / Danilo Kluyber. – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Expedito José de Albuquerque Luna

Descritores: 1. TATUS. 2. TOXOPLASMA GONDII. 3. TRYPANOSOMA CRUZI. 4. LEISHMANIA. 5. MYCOBACTERIUM LEPRAE. 6. PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS.

USP/IMTSP/BIB-05/2016.

Dedico este estudo à estas espécies tão fascinantes e que só poderiam ter toda a atenção que merecem com alguém à altura e competência para tal feito, a você meu amigo e parceiro Arnaud L.J. Desbiez, por toda dedicação e por tudo que tem feito por mim, meus eternos agradecimentos...

*In memoriam à Catarina Kluyber,
que com toda certeza nos acompanha de onde quer esteja...*

AGRADECIMENTOS

A Dna. Dayse Kluyber por toda paciência, dedicação, companhia e até hoje por cuidar e demonstrar o maior amor do mundo. As tias Maria José (Zezé), Tia Creusa (Teda) e tia Márcia pela companhia e apoio desde sempre, principalmente durante estes anos. Aos meus padrinhos José Reinaldo Tosi e Tais Helena Tosi, sem vocês eu não chegaria até aqui.

Meus eternos agradecimentos à melhor equipe de todos os tempos, na qual tenho o privilégio de fazer parte e com absoluta certeza sem vocês nada disso seria possível, obrigado ao Projeto Tatu-Canastra (Arnaud Desbiez, Gabriel Massocato, Camila Luba, Bruna Oliveira e ao Mario H. Alves).

The Royal Zoological Society of Scotland – RZSS – Zoo de Edimburgo – Escócia, pela confiança e credibilidade depositada no nosso trabalho desde início e ao Instituto de Pesquisas Ecológicas – IPÊ pelo suporte e incentivo ao Projeto Tatu-Canastra. A Fazenda Baía das Pedras, aos proprietários Rita, Carlos Teodoro (Sr. Dóio), Isabel, Vicente e Julia) e aos funcionários por todo apoio. A toda equipe da Iniciativa Nacional para Conservação da Anta brasileira (Patricia Medici, Renata Santos, Caroline Testa, e José Maria de Aragão).

Ao Professor Expedito A. Luna, pela orientação, carinho e atenção que me recebeu desde a primeira vez, confiando toda credibilidade para que pudesse realizar este estudo. Aos Professores do Instituto de Medicina da Tropical – Universidade de São Paulo – USP. Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. pelas orientações e em especial à Dra. Luciana R. Meireles (Laboratório de Protozoologia) pela grande contribuição a este estudo e a Capes/CNPQ pelo financiamento da bolsa de estudo.

Aos laboratórios e instituições que gentilmente cederam seus espaços e profissionais para realizarem as análises deste estudo: Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias (Labmam/IOC/Fiocruz) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ, aos novos amigos e parceiros Dr. Philip Noel Suffys, Dra. Amanda Brum, MsC. Jéssica Ferreira, e Dr. Flávio Lara.

A special thanks to Dr. Richard W. Truman, for all support, advices and kindness since the beginning of the giant armadillo conservation project.

Ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, da Fundação Oswaldo Cruz, RJ (Labtrip), Professora Dra. Ana Jansens, Prof. Dr. André Roque, aos pesquisadores MsC. Renata de Cassia-Pires, e Bruno Alves, e em especial à Dra. Fabiana Rocha (Bia) pelas orientações e ajuda de sempre.

Ao Laboratório do Instituto de Biociências, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista Unesp-Botucatu e a equipe do Prof. Dr. Eduardo Bagagli, Prof. Dra. Sandra Bosco, aos pesquisadores pela ajuda durante as análises Marluce Hrycyk e ao Hans Garcia Garcés.

Ao Laboratório de Medicina Preventiva e Saúde Animal-VPS-da Universidade de São Paulo-USP, Prof. Dr. Marcelo Labruna, Dr. Thiago Martins, Dr. Herbert Soares, e Profa. Dra. Solange Gennari. Ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista – UNIP– as eternas Professoras Dra. Vânia Carvalho e Dra. Selene Dall’Acqua, a Suzana e Cleide pelo apoio com as amostras.

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo e toda equipe em especial a amiga Dra. Patrícia Locosque, e a Carol Chagas, Iris Gonzalez, Dr. João Batista e Dr. Paulo Bressan pela parceria com o projeto Tatu-Canastra.

Aos grandes amigos e referências como profissionais, Dr. Rodrigo Teixeira, Dr. Rodrigo Jorge e Dr. Paulo Mangini, grandes responsáveis e motivadores por eu estar aqui hoje. E aos amigos Ricardo Duarte Lopes, Rodrigo Pinho (Grilo), Rodrigo Benedetto, Juliana Pereira e Gislaine Dalazen. A todos voluntários e profissionais que participaram do Projeto Tatu-Canastra e contribuíram para a colheita de amostras.

Mais que especial, à profissional que muito admiro, Dra. e parceira de vida, Vanessa T. Kanaan, por todo carinho, dedicação, companhia, motivação, paciência e muito amor.

RESUMO

Kluyber D. Avaliação da Prevalência de Patógenos Zoonóticos de Importância para Saúde Pública em Tatus de Vida Livre – Mato Grosso do Sul – Brasil (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Ao longo dos anos, a humanidade contribuiu para o surgimento de diversos patógenos, tornando-se vítimas de doenças transmitidas dos animais para o homem, as chamadas antropozoonoses. Dentre os animais, os tatus, mamíferos selvagens primitivos, apresentam características anatômicas e fisiológicas peculiares, que os tornam mais susceptíveis à diversas doenças e potenciais reservatórios de patógenos zoonóticos, relevantes para a saúde pública. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de cinco patógenos zoonóticos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp, *Mycobacterium leprae* e *Paracoccidioides brasiliensis*) em quatro espécies de tatus; *P. maximus*, *E. sexcinctus*, *D. novemcinctus* e *C. unicinctus* do Pantanal e Cerrado do Mato-Grosso-do-Sul. Um total de 50 tatus foram analisados. Sendo, 43 amostras de soros de indivíduos de vida livre (16 *Priodontes maximus*; 17 *Euphractus sexcinctus*; 02 *Dasyopus novemcinctus* e 08 *Cabassous unicinctus*) provenientes do Pantanal e 07 conjuntos de fragmentos de tecidos (pulmão, fígado e baço), de 06 *E. sexcinctus* e 01 (*D. novemcinctus*) atropelados em três rodovias do Cerrado do Mato-Grosso-do-Sul. Dos 43 indivíduos amostrados no Pantanal, 13/43 ou 30,23% apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*; 01/43 ou 2,32% anti-*T. cruzi* e 4/43 ou 9,30% anti-*Leishmania (L.) infantum chagasi*. Amostras de fragmentos de orelha dos 43 indivíduos do Pantanal, e fragmentos de tecido (pulmão, fígado e baço) dos tatus do Cerrado, também foram analisadas para *M. leprae* e *Leishmania* spp através de biologia molecular, nas quais foram negativas. Dos tatus provenientes do Cerrado, analisados para *P. brasiliensis*, 07 ou 100% dos indivíduos foram positivos. Baseado nestes resultados, pode-se afirmar que os tatus apresentam uma relação e histórico de exposição a estes patógenos, seja através do contato com outras espécies, seres humanos ou condições ambientais onde ocorrem. Contudo, confirma-se a importância destas espécies para o entendimento dos ciclos de transmissão de patógenos e de forma estratégica, como indicadores da saúde de um ecossistema em programas de investigação e monitoramento de doenças, especialmente as zoonoses.

Descritores: Tatus. *Toxoplasma gondii*. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania* spp. *Mycobacterium leprae*. *Paracoccidioides brasiliensis*

ABSTRACT

Kluyber D. Prevalence of zoonotic pathogens important for public health in wild armadillos, Mato Grosso do Sul, Brazil. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Over the years mankind has contributed to the emergence of several diseases, while becoming victims of those passed among humans and other animals, known as zoonosis. Armadillos are primitive wild mammals who present peculiar anatomical and physiological characteristics which make them susceptible and potential reservoirs of zoonotic pathogens relevant to public health. The goal of the present study was to evaluate the prevalence of five zoonotic pathogens (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Mycobacterium leprae* and *Paracoccidioides brasiliensis*) in four armadillo species (*Priodontes maximus*, *Euphractus sexcinctus*, *Dasypus novemcinctus* and *Cabassous unicinctus*) found in Pantanal and Mato-Grosso-do-Sul tropical savanna ecoregion, the Cerrado. A total of 50 armadillos were sampled: 43 free living individuals from Pantanal (16 *P. maximus*; 17 *E. sexcinctus*; 02 *D. novemcinctus* and 08 *C. unicinctus*) and 07 individuals found dead in three different roads of the Cerrado. Of the 43 individuals sampled in Pantanal, 13 (30.23%) presented *T. gondii* antibodies; 01 (2.32%) showed antibodies anti-*T. cruzi*; and 04 (9.30%) showed anti-*Leishmania (L.) infantum chagasi* antibodies. All 50 samples were also analyzed by molecular biology based on the polymerase chain reaction (PCR). None of the samples tested positive for *M. leprae* and *Leishmania* spp. And all seven or (100%) individuals from the Cerrado were tested positive for *P. brasiliensis*. The results suggest that the armadillos have been exposed to these pathogens, either by contact with other species, including humans or by their own environmental conditions in certain ecosystems. The armadillo species studied may have a greater susceptibility to these pathogens in the natural environment where they occur. Armadillos are key species in understanding diseases transmission cycle, especially regarding zoonotic pathogens and they can strategically act as an indicator of ecosystem health for research programs and zoonotic diseases monitoring.

Descriptors: Armadillo. *Toxoplasma gondii*. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania*. *Mycobacterium leprae*. *Paracoccidioides brasiliensis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da área de estudo e distribuição espacial dos indivíduos de tatus amostrados no Pantanal.....	32
Figura 2 – Mapa da área de estudo e distribuição espacial dos indivíduos de tatus amostrados no Cerrado.....	37
Figura 3 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus com anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	58
Figura 4 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus com anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 5 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus com anticorpos anti- <i>Leishmania infantum chagasi</i>	62
Figuras 6 - Demonstração do resultado parcial da análise por PCR para <i>Leishmania</i> spp (amostras não amplificadas).	63
Figuras 7 - Demonstração análise do PCR para <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	65
Figura 8- Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus positivos para análise molecular por PCR para <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	67
Figura 9 – Resultados das análises por PCR convencional para amplificação de RLEP utilizando os primers RLEP2-1 (5'-atatcgcagcgcgtgag-3') e RLEP2-2 (5'-ggatcatcgcactgttc-3') -- 282-bp.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das sequências de <i>primers</i> e sonda do gene RLEP.	51
Tabela 2 - Lista das espécies de tatus de vida livre testados para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	57
Tabela 3 - Lista das espécies de tatus de vida livre testados para a presença de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
Tabela 4 - Lista das espécies de tatus de vida livre testados para a presença de anticorpos anti- <i>Leishmania (L) infantum chagasi</i>	61
Tabela 5 - Lista das espécies de tatus de vida livre (Pantanal) e mortos atropelados (Cerrado) testados para a detecção de <i>Leishmania spp.</i>	64
Tabela 6 - Lista das espécies de tatus de vida livre (Cerrado) mortos atropelados testados para a detecção de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	66
Tabela 7 - Lista de amostras avaliadas e valores para CT (*quando reagiram em duplicata).	68
Tabela 8 - Demonstração das amostras analisadas em quatro diluições cada (1:10; 2, e 5 µl), seus valores de CT correspondentes e os valores de CT para DNA conhecido.	70
Tabela 9 - Demonstração das amostras analisadas (em três diluições) que amplificaram para esta combinação VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3).	71
Tabela 10 - Demonstração das amostras analisadas (em três diluições) que amplificaram para esta combinação VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3).	72
Tabela 11 - Demonstração das amostras analisadas (em três diluições) que amplificaram para todas as combinações VNTR's (combinação #1; #2; #3 e #4). ...	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido dietilenoaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
g	gramas
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
H ₂ O	Fórmula química da água (2 átomos de hidrogênio ligados a 1 átomo de oxigênio)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade
IMT	Instituto de Medicina Tropical
IUCN	<i>International Union for the Conservation of Nature</i> – União Internacional para a Conservação da Natureza
Kg	Quilograma
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MAT	Teste de aglutinação modificada
ng/ml	nanogramas por mililitro
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Mato Grosso do Sul
pH	Potencial Hidrogeniônico
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i> – solução salina fosfatada tamponada
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> – Reação em Cadeia pela Polimerase

μl	microlitros
UI	Unidades Internacionais
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VNTR	Variable number of tandem repeats

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
=	igual
\geq	maior ou igual
\leq	menor ou igual
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 SUPERORDEM XENARTHRA	3
2.2 ORDEM CINGULATA	5
2.3 RELAÇÃO ENTRE TATUS E OS PATÓGENOS	6
3 PATÓGENOS ZOONÓTICOS E SUA OCORRÊNCIA EM TATUS	8
3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	8
3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
3.3 <i>Leishmania</i> spp.	17
3.4 <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	21
3.5 <i>Mycobacterium leprae</i>	25
4 OBJETIVO GERAL	30
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 ÁREA DE ESTUDO – BIOMA PANTANAL	31
5.2 CAPTURA DOS ANIMAIS E COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	33
5.3 MARCAÇÃO DOS ANIMAIS	35
5.4 ÁREA DE ESTUDO – BIOMA CERRADO	36
5.5 PROJETO ESTRADAS – LEVANTAMENTO DE ANIMAIS ATROPELADOS - MATO GROSSO DO SUL	36
5.6 COLHEITA DE MATERIAL BIOLÓGICO - BIOMA CERRADO	38
5.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
5.8 ANÁLISES LABORATORIAIS	40
5.8.1 Teste sorológico para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	40
5.8.2 Teste sorológico para detecção de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
5.8.3 Teste sorológico para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania (L) infantum</i> <i>chagasi</i>	43
5.8.4 Teste de diagnóstico molecular para detecção de <i>Leishmania</i> spp.	44
5.8.5 Teste de diagnóstico molecular para detecção de <i>Paracoccidioides</i> <i>brasiliensis</i>	46
5.8.5.1 Extração de DNA	46
5.8.5.2 Condições da PCR	47
5.8.5.3 Purificação do DNA	48
5.8.5.4 Sequenciamento do DNA	48
5.8.5.6 Teste de diagnóstico molecular para detecção de <i>Mycobacterium leprae</i>	49
5.8.5.7 Extração de DNA dos tecidos	50
5.8.5.8 Detecção do DNA de <i>M. leprae</i>	51
5.8.5.9 Genotipagem	52
5.8.6 MLVA (Multiple-locus VNTR Analysis)	53
5.8.6.1 Análise do comprimento dos Fragmentos (Fragment Length Analysis)	54
5.8.6.2 Análise dos eletroferogramas de sequenciamento	55
5.8.6.3 Análise de polimorfismos de base única (SNP do inglês, “Single Nucleotide Polymorphism”)	56
6 RESULTADOS	57

6.1 DIAGNÓSTICOS LABORATORIAIS.....	57
6.2 Detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	57
6.3 Detecção de anticorpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
6.4 Detecção para anticorpos anti- <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>	61
6.5 Detecção molecular (PCR) para <i>Leishmania spp</i>	63
6.6 Detecção molecular (PCR) para <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	65
6.7 Detecção molecular (PCR) para <i>Mycobacterium leprae</i>	68
6.7.1 PCR em tempo real – alvo RLEP.....	68
6.7.2 PCR em tempo real – alvo RLEP.....	69
6.7.3 PCR multiplex para amplificação de VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3).....	71
6.7.4 PCR multiplex para amplificação de VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3).....	72
6.7.5 PCR multiplex para todas as combinações: #1 (AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3), #2 (21-3, AC9, AT15 e AC8a), #3 (27-5, 6-7, TA18 e TTC) e #4 (18-8, 12-5, 23-3 e TA10).....	73
6.7.6 PCR convencional para amplificação de RLEP utilizando os primers RLEP2-1 (5'-atatcgatgcaggcgtgag-3') e RLEP2-2 (5'-ggatcatcgatgcactgttc-3') -- 282-bp.....	74
7 DISCUSSÃO.....	75
7.1 Exposição dos tatus ao <i>Toxoplasma gondii</i>	75
7.2 Exposição dos tatus a <i>Leishmania infantum chagasi</i>	78
7.3 Exposição dos tatus ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	81
7.4 Exposição dos tatus ao <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	84
7.5 Exposição dos tatus ao <i>Mycobacterium leprae</i>	86
8 CONCLUSÃO.....	89
9 EM SÍNTESE.....	94
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO.....	124

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, os seres humanos têm sido afetados e contribuído para o surgimento e disseminação de diversas doenças.¹ Tal fato, torna-se concreto, pois as doenças estão se tornando a maior causa da simplificação ecológica, incluindo a extinção.² Um a cada cinco assuntos relacionados à saúde humana, apresenta relação com causas ambientais³, envolvendo impactos substanciais na economia, agricultura, produção, saúde pública e conservação de espécies ameaçadas.⁴

As causas destes fatores estão diretamente associadas ao crescimento explosivo da população humana, o aumento da frequência e velocidade de viagens internacionais, o aumento do consumo de animais e produtos de origem animal, mudanças nas práticas de agriculturas, e as alterações ou degradações ambientais que impactam a distribuição de reservatórios e favorecem a transferência de patógenos entre espécies selvagens e domésticas. E no entanto, podem assumir características zoonóticas, mediante situações de contato com as pessoas.³

Dois padrões diferentes de transmissão de patógenos de animais selvagens para humanos são evidentes entre as zoonoses emergentes. O primeiro padrão a transmissão de um patógeno para humanos é considerada um evento raro, mas quando ocorre, a transmissão humano–humano se mantém por um período de tempo ou permanentemente. No segundo padrão, direto ou mediado por vetores, transmissão animal–humano é um recurso mais comum de infecção, no qual populações de espécies selvagens são considerados os principais reservatórios de patógenos e a transmissão de humano-humano é mais rara.⁵

Não apenas os humanos podem contrair as doenças de animais selvagens, mas também podem introduzir doenças que põem em risco a vida selvagem. Populações de animais selvagens infectadas por patógenos considerados tipicamente causadores de doenças em humanos, podem tornar-se um foco enzoótico para estas infecções.⁴

Um desafio que vem sendo enfrentado pelas autoridades na área de saúde animal e pública são os focos em animais silvestres de doenças infecciosas que acometem animais domésticos e seres humanos. Estes focos ameaçam a eficácia de programas nacionais e internacionais de controle e erradicação de doenças, os quais vem sendo implementados e executados com sucesso significativo e a elevados custos.⁶

No entanto, para o entendimento da dinâmica das zoonoses e seus ciclos, criou-se o conceito de estudo conhecido como “saúde ecológica”, como essencial e não tão novo assim. Baseado neste conceito, a “Medicina da Conservação” torna-se uma disciplina que tem como principal objetivo, desenvolver um entendimento científico da relação entre a crise ambiental, a saúde humana e não humana⁷, e criar soluções para os problemas na interface entre meio ambiente e ciência da saúde.⁸

Iniciativas que envolvem este conceito, trazem novas alternativas para conservação da biodiversidade, desenvolvimento de políticas públicas e potenciais melhorias da saúde humana. Podem contribuir na identificação de lacunas no controle de doenças e no desenvolvimento de ações preventivas aplicáveis a determinadas espécies, como também à saúde pública.⁹

O presente estudo teve como objetivo, avaliar a prevalência de exposição à patógenos zoonóticos de importância para saúde pública em tatus de vida livre. Justifica-se a implementação do estudo, por apresentar um valor real de estratégia de baixo custo para a investigação e monitoramento de importantes doenças zoonóticas e na contribuição de resoluções de questões eco-epidemiológicas nas populações de tatus e seu impacto para a saúde humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Superordem Xenarthra

Os xenarthras pertencem a um grupo distante, composto de espécies radicalmente especializadas que fazem parte de apenas 0,5% da diversidade de mamíferos existentes. Junto aos marsupiais, os xenarthras são os mamíferos mais antigos da história na América do Sul.¹⁰ No passado, a superordem xenarthra foi muito mais diversa e numerosa, e continha animais agora extintos, como por exemplo, várias espécies de gliptodontes e de preguiças-gigantes.¹¹

Algumas destas espécies estiveram entre os maiores mamíferos terrestres já encontrados e as existentes são remanescentes de uma radiação evolucionária que ocorreu durante o isolamento Terciário da América do Sul.¹¹ De fato, esta ordem, permanecia ligeiramente diversa até a última extinção em massa que ocorreu há 10.000 anos.^{12,13}

Ações antrópicas sobre o ecossistema durante milhares de anos tem se intensificado abruptamente no último século, e desde então muitos xenarthras tem sofrido um crítico declínio populacional. Segundo Aguiar e Fonseca¹⁴, das 31 espécies existentes, 38% estão ameaçadas de extinção, e esta porcentagem é maior que outras ordens de mamíferos mais carismáticos como os carnívoros (27%) e os cetáceos (33%).¹⁵

Atualmente, os xenarthras são representados por cinco famílias, 14 gêneros e 31 espécies viventes, sendo sua maior diversidade concentrada na América do Sul.¹⁶⁻¹⁸ Conhecida até pouco tempo como Edentatas (animais desprovidos de dentes), esta superordem foi desmembrada em duas ordens: Cingulata (tatus) e Pilosa (tamanduás e preguiças).^{19,20}

A reclassificação desta superordem se deu inicialmente devido a outras características anatômicas peculiares dentre estas espécies. O termo “xenartra”, (*xenom* = estranho e *arthros* = articulação) agrupa estas espécies que apresentam em comum uma articulação diferenciada conhecida como “*processo xenartro*”, uma considerada secundária e de característica primitiva encontrada entre as vértebras lombares e a articulação do ísquio com a coluna espinhal.²¹

Além das suas particularidades anatômicas diferenciadas, este grupo de mamíferos é considerado muito especial por apresentar, uma baixa taxa metabólica e uma variável temperatura corpórea. Estas características estão relacionadas ao consumo de alimentos com baixo teor energético como formigas e/ou cupins, e podem ser adaptativas, o que lhes confere a capacidade de poder armazenar energia.²²

2.2 Ordem Cingulata

A ordem Cingulata consiste de apenas uma única família: Dasypodidae (tatus)²³ e vinte e uma espécies classificadas em nove gêneros.²⁴ A massa corpórea pode variar de 90 gramas para o pequeno tatu-peludo (*Chlamyphorus truncatus*) até 60 quilos como o tatu-canastra (*Priodontes maximus*), sendo estas espécies que mais fidelizam a linhagem dos xenartras. Os tatus são considerados um dos poucos grupos de mamíferos originalmente da América do Sul que com sucesso se distribuíram para América Central e do Norte durante o período Mioceno e Plioceno.²⁵

Como característica ecológica desta ordem, cada espécie cava sua toca com tamanho e forma peculiar.^{26,27} Já que a maioria destes animais são considerados exímios cavadores.²⁸ As tocas são utilizadas para dormir, abrigar os filhotes, escapar de predadores ou para a criação de um reservatório de insetos, pois muitas são escavadas dentro de formigueiros ou cupinzeiros.^{29,30} Contudo Grassé³¹ e Boily³² classificam estas espécies como homeotermos imperfeitos e a construção de estruturas para abrigo como buracos, pode ser uma consequência da capacidade termorregulatória limitada destes animais.³³⁻³⁵

2.3 Relação entre tatus e os patógenos

Os tatus são espécies que apresentam uma ampla variedade de interações com diversos agentes patogênicos e que aliada as suas características fisiológicas e ecológicas, contribuem para que se tornem potenciais hospedeiros apropriados de inúmeras doenças. Associado a sua baixa temperatura corpórea, seu frágil sistema imunológico e seu hábito de viver literalmente imerso no solo e matéria orgânica, além de compartilharem suas tocas³⁶, viverem sob condições bióticas e abióticas, e principalmente em regiões tropicais e subtropicais, favorecem uma intensa e dinâmica relação destas espécies com diversos vertebrados, grupos de patógenos e vetores.³⁷⁻⁴¹

Patógenos responsáveis por zoonoses significantes tem sido frequentemente associados aos tatus e a outros xenartras⁴². Além disso, em diversas regiões onde ocorrem, existe uma estreita relação com os seres humanos, através da caça para uso medicinal como adornos para confecção de artesanatos ou instrumentos musicais em países como Bolívia e Perú⁴³ e de maneira cultural a caça de subsistência e sua carne são fontes de alto valor proteico e paladar, mas a manipulação e o consumo de sua carne pode ser uma ameaça de impacto importante para a saúde pública.⁴⁴

Os tatus são considerados importantes reservatórios para protozoários como a *Leishmania spp*⁴⁵ e *Trypanossoma cruzi*.⁴⁶ Da mesma forma, e grau de importância para a saúde pública, o *Toxoplasma gondi*^{47,48}, e o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* também tem sido relatado em tatus.⁴⁹⁻⁵⁰

Em maior número, principalmente o tatu-galinha (*Dasyopus novemcinctus*), são descritos como espécies modelo para pesquisas em laboratórios e como principal mamífero reservatório para o *Mycobacterium leprae*, o agente etiológico da hanseníase.⁵¹

Segundo dados descritos pela agência Federal Americana de Programas e Serviços de Saúde e Controle de Doenças (Health Services and Mental Health Administration)⁵¹, os tatus-galinha oferecem diversas vantagens como animais modelos para pesquisa sobre os camundongos. A sua pele fina, baixo metabolismo e temperatura corpórea (32°C), são prontamente afetados pelo ambiente, criando condições ótimas para o crescimento do organismo. Possuem características reprodutivas únicas, como a capacidade de produzir quádruplos através de um fenômeno chamado de poliembrionia, onde cada gestação dá à luz a gêmeos idênticos e para pesquisa favorece a repetição de estudos em animais geneticamente idênticos. Com isso, pesquisadores podem realizar reprodução seletiva dos tatus e tentar produzir duas colônias de animais, uma com alta susceptibilidade, e outra resistente. Sua média de vida, de 12-15 anos, é considerado um tempo suficiente por exemplo, para contrair hanseníase, uma doença com longo e lento período de incubação e curso.⁵²

No entanto, pouco se conhece ou foram estudadas as formas de contato ou como estas espécies podem albergar, contrair, disseminar ou acabar sendo vítimas de patógenos causadores de morbidade ou mortalidade, principalmente nas espécies mais raras ou ameaçadas. E no ponto de vista epidemiológico, tais fatores podem se transformar em mais um risco potencial, e tornar sua população mais vulnerável. A elevada prevalência envolvendo a relação patógenos e tatus, destaca a importância do estudo das doenças para estas espécies, bem como, a compreensão do seu fundamental papel e dinâmica na saúde de seus ecossistemas.

3 PATÓGENOS ZONÓTICOS E SUA OCORRÊNCIA EM TATUS

3.1 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma antropozoonose que ocorre em distribuição mundial, sendo transmitida por um parasito celular obrigatório, o *Toxoplasma gondii*. O *Toxoplasma* é capaz de infectar diversas espécies de animais de “sangue quente”, incluindo aves, humanos, animais de criação e animais marinhos e que causa um grande impacto econômico para a saúde animal e saúde pública.⁵³

Este parasito é considerado amplamente prevalente e estima-se que 1 a 3 bilhões de pessoas estão infectados no mundo.⁵³ No Brasil, a prevalência de infecção por *T. gondii* em humanos é especialmente alta e pode chegar a 100% em algumas áreas e em média 60% das mulheres adultas já foram expostas a este protozoário.⁵⁴⁻⁵⁶

Felídeos geralmente são considerados fontes primárias de infecção e hospedeiros definitivos, adquirindo o protozoário através da ingestão de carne ou fezes contaminadas. Inúmeros hospedeiros intermediários podem disseminar a doença, ou o parasito entre eles, consumindo a carne de outros indivíduos infectados.⁵⁷

Animais e humanos tornam-se infectados após ingestão de cistos teciduais em carne crua ou malpassada, leite, ou ingestão de oocistos ambientais, frutas ou vegetais onde o felídeo defecou, como também através da água, pois o oocisto pode permanecer viável em ambiente por muitos meses.⁵⁸⁻⁶⁰

Em humanos, a infecção por *Toxoplasma* em pacientes imunocompetentes normalmente é assintomática, mas apresentam leves a moderados sinais de gripe ou febre e sinais de infecção inespecífica em 10-20% dos casos, sendo auto-limitante.⁶¹ Sintomas moderados podem não ser notados em uma significativa proporção dos casos restantes 80-90%. Porém para pacientes imunosuprimidos, a infecção pode acarretar em tratamento por toda a vida.⁶²

Na infecção aguda apresenta o mesmo risco para gestantes imunocompetentes, comparado a mulheres não grávidas. No entanto, se taquizoítas circulantes atravessarem a placenta, poderá resultar em infecção congênita podendo levar a graves consequências, até mesmo fatais para criança em gestação, dependendo do estágio de gravidez que ocorre, pode resultar em lesão oftálmica e envolvimento do sistema nervoso central.⁶³

A investigação para *T. gondii* sempre foi focada em animais domésticos que coabitaram ou são fontes de alimentação para humanos, sendo estes animais principais reservatórios para infecção.⁶⁴ Porém Sacks et al⁵⁹, relatou a ocorrência de toxoplasmose em caçadores que se alimentaram de carne crua de veados, com sinais clínicos como febre, leucopenia, e funções hepáticas anormais. Dois dos três pacientes descritos, apresentaram infiltração no tórax aos raios-x. No mesmo trabalho, o autor, também descreve um surto em cachorros de caça que se alimentaram de vísceras de animais selvagens.

Os animais selvagens apresentam importante participação na Toxoplasmose devido à alta susceptibilidade e mortalidade, como por exemplo os primatas neotropicais e os marsupiais australianos. Por outro lado, outros mamíferos selvagens podem carrear o parasito em seus tecidos por um longo período, apresentando então, um papel fundamental como reservatórios na cadeia alimentar das espécies carnívoras ou onívoras.⁶⁵

Segundo Forrester et al⁶⁶, os tatus da espécie *Zaedyus pichy*, demonstram a mesma vulnerabilidade para este parasito como os marsupiais australianos, nos quais apresentam uma baixa taxa de soroprevalência em razão de sua alta taxa de mortalidade devido a infecção primária.

Historicamente o *T. gondii* possui uma estreita relação com tatus selvagens⁶⁷, mas pouco se conhece sobre seu potencial risco como reservatórios. Em estudos conduzidos na Flórida, Estados Unidos, por Burridge et al⁶⁸, avaliando a prevalência de *Toxoplasma gondii* em tatus, foi identificado 12 de 63 indivíduos de tatu-galinha (*D. novemcinctus*), soropositivos através do método de hemaglutinação indireta. Já segundo Forrester et al⁶⁶, 19% das amostras de tatus na Flórida, EUA, foram positivos para *T. gondii*.

Na Argentina, Superina et al⁶⁹ avaliaram através do método de hemaglutinação, 24 indivíduos da espécie *Z. pichy* em vida livre e 11 provenientes de cativeiro. Todos apresentaram resultados negativos para anticorpos anti-*T.gondii*. Como também nenhum dos 150 indivíduos mortos avaliados por análises histopatológicas apresentaram resultados positivos.

Também na Argentina, província de La Pampa, Kin et al⁴⁸ relatam a presença de anticorpos anti-*T.gondii* em tatus da espécie *Chaetophractus villosus*. Amostras de soros de 150 indivíduos (70 machos e 80 fêmeas) foram coletadas e 27% ou 41 indivíduos apresentaram títulos anti-*T.gondii*.

No Gran Chaco Boliviano, Deem et al,⁷⁰ identificaram três de nove indivíduos de tatu-galinha (*D. novemcinctus*) que apresentaram anticorpos anti-*T.gondii* pelo teste de hemaglutinação indireta.

No Brasil, na região oeste do estado de São Paulo, município de Baurú, um estudo conduzido por Silva et al⁶⁴ avaliando a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais selvagens, sendo 15 tatus, 9 tatus-galinha (*D. novemcinctus*) e 6 tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*). Pela análise do soro pelo método de aglutinação direta (MAT), obteve-se a prevalência de 9/9 ou (100%) de indivíduos de tatus-galinha (*D. novemcinctus*) e 03/6 ou 50% de tatus-peba (*E. sexcinctus*). Apenas uma amostra de soro de *D. novemcinctus* e dois de *E. sexcinctus* apresentaram reação produzindo títulos iguais a 256, 512 e 512 respectivamente. *T. gondii* foi isolado em dois indivíduos de *E. sexcinctus*, um dos quais, apresentou resultado negativo para o anticorpos anti-*T.gondii*.

Na mesma região, da Silva et al⁷¹, avaliou a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* através de amostras de soro de 31 tatus-galinha (*D. novemcinctus*), 03 tatus-pebas (*E. sexcinctus*), 02 tatu-de-rabo-mole-grande (*Cabassous tatouay*) e 02 tatus-mulita (*Dasypus hybridus*) de vida livre, capturados no oeste do estado de São Paulo. De todos indivíduos analisados através do teste de aglutinação modificada (MAT-t), apenas 4/31 (12,90%) de *D. novemcinctus* foram positivos para *T. gondii*.

Em um estudo descrito por Vitalino et al⁷², identificaram e realizaram a técnica de caracterização genética por PCR de *T. gondii* com animais selvagens de vida livre em quatro diferentes regiões do país, nos quais 100% dos tatus, sendo 14 indivíduos de *D. novemcinctus* proveniente de Santarém (Pará) e 05 indivíduos de *E. sexcinctus* Uberlândia, (Minas Gerais) foram positivos para este protozoário.

3.2 *Trypanosoma cruzi*

A tripanossomíase ou Doença de Chagas (DC) é classificada como uma antroponose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e foi descrita em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas.⁷³

A doença humana encontra-se limitada ao Hemisfério Ocidental, com ampla distribuição em zonas rurais do México, da América Central e América do Sul. Na América Latina é considerada uma das mais importantes infecções parasitárias e que trouxe severas consequências para a saúde pública e economia nacional neste continente. Estima-se que mais de 12 milhões de pessoas albergam o protozoário no mundo hoje. Apresenta uma incidência anual de 8 casos a cada 100.000 habitantes, e mortalidade com taxas de aproximadamente 10.000 casos ao ano.^{74,75}

A Doença de Chagas constitui um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil. A incidência da endemia encontra-se condicionada ao nível econômico e social da região aos tipos precários de habitação do homem rural, às baixas condições de higiene de seus habitantes e em particular à existência de vetores domiciliados. Por outro lado, em 2006, o Brasil recebeu da OPA/OMS, a certificação da interrupção da transmissão vetorial domiciliar. E atualmente, os casos de transmissão de *T. cruzi* estão atribuídos apenas à exposição ao ciclo silvestre, principalmente pela via alimentar, por contaminação de alimentos por triatomíneos infectados.⁷⁶

Segundo o Ministério da Saúde⁷⁶, os estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio Grande do Sul, Sergipe, São Paulo e Tocantins) são considerados originalmente áreas de risco para a transmissão vetorial, onde a vigilância epidemiológica visa detectar a presença e prevenir a formação de colônias domiciliares do vetor; e na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima, Pará, parte do Tocantins, Maranhão e Mato Grosso) como vigilância centrada na detecção precoce de casos agudos.

Hoje são conhecidas 15 espécies de triatomíneos (insetos hematófagos) popularmente conhecidos como barbeiros ou bicudos, de importância epidemiológica e envolvendo espécies silvestres com altas taxas de infecção natural.⁷⁷ Uma das formas de transmissão do agente se dá através dos vetores, os insetos reduvídeos, principalmente dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, e neles multiplicam-se o *Trypanosoma*.⁷⁴

Sinais clínicos na fase aguda em humanos variam desde febre, cefaleia, edema facial, inflamação, parestesia lingual, vômito, hepatomegalia, esplenomegalia e dor abdominal. Os demais sinais, podem manifestar-se por mialgia, inapetência, edema de membros superiores, edema de membros inferiores, anasarca, dispneia, taquicardia, miocardite e derrame pericárdico, sendo que 100% dos pacientes apresentam edema facial, esplenomegalia e hepatomegalia.⁷⁴

A ausência de tratamento clínico, pode levar a infecção por *T.cruzi* à fase crônica e praticamente por toda vida. De grande importância clínica para a doença, durante a fase crônica, a parasitemia só é detectável por análise de cultura sanguínea ou xenodiagnóstico. Pode caracterizar-se por ser assintomática, mas a doença cardíaca torna-se comum. Aneurismas no ápice do ventrículo esquerdo são dados como sinais clássicos de cardiomiopatia causada por doença de Chagas. Megasíndromes como megaesôfago e megacólon podem ocorrer, como também, danos neurológicos podem ser considerados em pacientes desde a fase aguda.⁷⁵

A doença é uma zoonose complexa, tendo mamíferos como hospedeiros reservatórios naturais.⁷⁵ Mais de 200 espécies e subespécies de mamíferos e 120 espécies de triatomíneos são conhecidas por serem susceptíveis a infecção por *T. cruzi*.⁷⁸ Qualquer mamífero pode albergar o parasito, enquanto aves e répteis são refratários à infecção.⁷⁶

A Doença de Chagas, ocorre naturalmente em ambiente silvestre, onde *T. cruzi* interage com triatomíneos e mamíferos reservatórios, como marsupiais, roedores e tatus.⁷⁹⁻⁸¹ Pouco se conhece sobre a epidemiologia da doença de Chagas em tatus e seu papel na transmissão para infecções humanas.

O pesquisador Carlos Chagas descreveu pela primeira vez que tatus-galinha do gênero (*Dasyus novemcinctus*), seriam os principais reservatórios silvestres para *Trypanosoma cruzi*.⁴⁴ A partir desta descrição, diversos pesquisadores e estudos com tatus de vida livre no continente americano, relatam estas espécies como potenciais reservatórios para *Trypanosoma* spp⁸².

Infecções experimentais foram descritas por Sherlock et al⁸³, com animais apresentando sinais clínicos muito similares aos humanos. Em dois tatus (espécie não identificada), os autores descrevem que os animais apresentaram edema generalizado de todos os órgãos, inclusive insuficiência cardíaca congestiva e edema agudo de pulmão, após o quarto mês de inoculação. Relatam também que foi detectado a maior positividade dos triatomíneos utilizados para o xenodiagnóstico no período de um mês, e diminuiu consideravelmente de acordo com a evolução da doença até a morte espontânea. Os autores também relatam que a morte dos dois indivíduos inoculados ocorreram praticamente no mesmo período, dentro do 4º mês após inoculação.

Já Naiff e Barret et al⁸⁴, em estudo com infecção experimental em dois tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*), descrevem a parasitemia ocorrendo em até quatro dias após inoculação intradérmica e morte do indivíduo em 10 dias.

Nos Estados Unidos, o tatu-galinha (*D.novemcinctus*) é considerado reservatório natural para *T. cruzi*.⁸¹ Forrester et al⁶⁶, ressalta através de evidências sorológicas que 1,7% de tatus amostrados na Flórida, Estados Unidos, foram positivos para *T.cruzi* e 25% de amostras positivas procedentes de New Orleans.

Na Lousiana, EUA, Yaeger et al⁸⁵ realizaram um estudo com 80 tatus da espécie *D. novemcinctus*, e através de cultura de sangue, exame microscópico direto e o teste de aglutinação direta com soro destes indivíduos, 23 dos 80 animais analisados confirmaram a presença de anticorpos anti-*T.cruzi*.

Já em 1991, Barr et al⁸⁶ também estudando tatus-galinha, no sudoeste de Lousiana, avaliou 98 indivíduos, e apenas um apresentou resultado positivo através de hemocultura, mas ausente de lesões histopatológicas características de infecção por *T. cruzi*.

No Chaco Paraguai, Yeo et al⁸⁷ em estudo com tatus de vida livre, dos 38 indivíduos de tatus-galinha (*D. novemcinctus*) avaliados, 17 foram positivos, 4 de 23 tatus-peba (*E. sexcinctus*) e 1 de 28 *Chaetophractus* spp, também apresentaram resultados positivos, sendo apenas a espécie tatu-bola (*Tolypeutes matacus*), com 16 indivíduos capturados, foram negativos através da técnica de xenodiagnóstico e hemocultura.

Também no Paraguai, em comunidades locais próximo ao distrito de San Pedro, Fujita et al⁸⁸ pesquisaram *T. cruzi* em animais domésticos e selvagens, e dentre dois indivíduos de tatu-peba, um apresentou resultado positivo por hemocultura LIT (liver infusion triptose).

No Gran Chaco, Bolívia, Deem et al⁸⁹, utilizando o método de hemaglutinação, identificaram 2/9 indivíduos de tatus-galinha (*D. novemcinctus*) que apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi*.

Na Venezuela, Morocoima et al⁴⁶ analisaram e isolaram *T. cruzi* em seis indivíduos de *D. novemcinctus* pela técnica de observação direta em lâmina (esfregaço), coloração por Giemsa e xenodiagnóstico *T. cruzi*.

Na Argentina, província de Mendoza, Superina et al⁶⁹, estudaram e avaliaram através do método de hemaglutinação, 25 indivíduos da espécie *Zaedyus pichy* provenientes de vida livre, e apenas dois apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi*, com títulos de 1/16 e 1/64, respectivamente.

No Chaco Argentino, Orozco et al⁹⁰ obtiveram dentre 195 animais analisados através de xenodiagnóstico e kDNA = kinetoplast DNA; PCR (Polymerase Chain Reaction), 48% de tatus-galinha (*D. novemcinctus*) positivos para xenodiagnóstico e 56% para PCR, em tatus-bola (*T. matacus*) 12,5% para xenodiagnóstico e nenhum para PCR, em *Chaetophractus vellerosus*, 6,3% dos animais foram positivos para ambos os métodos, em tatus-peba (*E. sexcinctus*) nenhum animal foi detectado através de sorodiagnóstico, mas 20% apresentaram amostras positivas para PCR, e em um único indivíduo de *Chaetophractus villosus* apresentou resultado negativo para os métodos avaliados.

Também no Gran Chaco argentino, utilizando o método de xenodiagnóstico e PCR, Alvarado-Ortegui et al⁹¹ estudando quatro diferentes espécies de tatus, tatu-galinha (*D.novemcinctus*), *Chaetophractus villosus*, *Chaetophractus vellerosus* e o tatu-bola (*Tolypeutes matacus*) encontraram um total de 6/14 indivíduos positivos para *T. cruzi*.

Já no Brasil, Naiff e Barret⁸⁴ encontraram em um tatu-peba (*E. sexcinctus*) de vida livre procedente da Bahia, resultado positivo para *Trypanosoma cruzi* através da análise por método de cultura de sangue em meio NNN (Novy-Mc Neal-Nicole). No mesmo estudo, em 9 indivíduos de tatus-galinha procedentes do Pará foram isolados *T. cruzi* por hemocultura ou xenodiagnóstico.

Roque et al⁹², também analisando amostras de animais selvagens em áreas de surtos por *T. cruzi*, nas regiões do Pará, Santa Catarina e Ceará, isolaram *T. cruzi* em um indivíduo de tatu-galinha (*D. novemcinctus*) no município de Cachoeira do Arari, Pará.

Fernandes et al⁷⁹ não encontraram tatus infectados nos estados do Rio de Janeiro. Já no estado do Espírito Santo, Antunes et al⁹³ analisaram 61 indivíduos de *D. novemcinctus* de vida livre e 6,55% destes foram positivos para *T. cruzi* utilizando análise molecular – PCR.

Poucos estudos relatam a pesquisa de *T. cruzi* no estado do Mato-Grosso-Sul. No entanto, dentre os animais selvagens capturados em uma comunidade rural para avaliar a presença de *T.cruzi*, Cominetti e Andreotti⁹⁴, descrevem ter analisado em um único indivíduo de tatu-galinha (*D. novemcinctus*), resultado negativo para hemocultura pelo meio NNN (Novy-Mc Neal-Nicole).

Apenas Herrera et al⁹⁵ descrevem a captura de oito indivíduos de vida livre da espécie *E. sexcinctus* para detecção de *Trypanosoma evansi*, na região da Nhecolândia, Pantanal do Mato-Grosso-do-Sul e apenas um indivíduo foi positivo através dos métodos por microhematócrito e biologia molecular (PCR).

3.3 *Leishmania* spp

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica.⁹⁶

Aproximadamente 350 milhões de pessoas em 88 países pelo mundo já foram infectadas, 72 nos quais, são países em desenvolvimento. Acredita-se que em torno de 12 milhões de pessoas estão infectadas, com um a dois milhões de novos casos ocorrendo a cada ano.⁹⁷

O seu principal vetor é o “mosquito-palha”, um flebotomíneo pertencente ao gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotomidae) responsável pela transmissão do protozoário *Leishmania* spp (Trypanosomatidae).⁹⁸ Este parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear apresenta duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados.⁹⁶

Em humanos, a doença pode aparecer em três diferentes formas, cutânea, mucocutânea e visceral com uma grande variação de sinais clínicos. A leishmaniose cutânea é considerada a mais comum.⁹⁸

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades. A LTA possui ampla distribuição mundial e no Continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai.⁹⁶

Índices apontam que 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Peru, Arábia Saudita, Síria e Brasil.⁹⁷

Encontrada praticamente em todos os estados do Brasil, sua prevalência vem aumentando consideravelmente. É classificada como endêmica no estado do Paraná, com registro em 289 municípios de um total de 399.⁹⁷

No Brasil, as principais espécies de vetores envolvidas na transmissão da *Leishmania* cutânea são os mosquitos *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*.⁹⁶

Outra importante zoonose para saúde pública é a leishmaniose visceral, causada pela *L. (L) infantum* e considerada endêmica na América Latina.⁹⁸

Os cães são os principais reservatórios, particularmente em áreas urbanas⁹⁹. Normalmente transmitida pelas atividades hematófagas de mosquitos pertencentes ao gênero *Lutzomia* spp (Novo Mundo) e flebótomo (Velho Mundo).¹⁰⁰

Epidemiologicamente, as infecções em cães são mais prevalentes que em seres humanos, e há um elevado número de animais assintomáticos que albergam parasitos na derme.¹⁰¹ A L.V em cães é considerada uma doença crônica caracterizada pela emergência de inúmeros sinais clínicos como linfadenomegalia, dermatopatias¹⁰², hepatoesplenomegalia e onicogribose¹⁰³ e oftalmopatias.¹⁰⁴ O parasito eventualmente causa lesão no sistema reprodutivo do macho¹⁰⁵ e fêmeas¹⁰⁶. E pode ser detectado no sêmem¹⁰⁷ e placenta¹⁰⁸, respectivamente marcando a ocorrência de transmissão vertical e horizontal¹⁰¹.

Atualmente observa-se para a leishmaniose a existência de três perfis epidemiológicos: a) Rural ou periurbana – em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose); b) Ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo; (antropozoonose) c) Silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres).⁹⁶

Seus principais hospedeiros reservatórios são considerados animais domésticos (canídeos, felídeos e equídeos), os sinantrópicos (marsupiais), os selvagens (macacos) e ocasionalmente os humanos.⁹⁸

Com relação aos animais selvagens, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi definitivamente esclarecido. Dentre elas estão também classificadas diversas espécies de *Leishmania* com ampla distribuição e diferentes hospedeiros.⁹⁶

Descritas e associadas aos xenarthras estão a *L. (Viannia) shawi*, distribuída nas regiões nordeste e sudeste do Estado do Pará e região oeste do Maranhão. O parasito foi isolado de amostras de vísceras e pele de alguns mamíferos silvestres como: macacos (*Chiropotes satanas e Cebus apella*), quati (*Nasua nasua*) e preguiça (*Choloepus didactylus*). Como estes animais são predominantemente arbóreos, considera-se que o ciclo enzoótico ocorra neste ambiente, porém a transmissão para o homem ocorre no nível do solo.⁹⁶

A *Leishmania (Viannia) guyanensis*: Está limitada à região norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará), estendendo-se para as Guianas. Encontrado em áreas que não alagam no período de chuvas. O parasito foi isolado de mamíferos silvestres, principalmente em xenarthras, tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), e o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e em marsupiais como o gambá (*Didelphis albiventris*). Os vetores conhecidos são *L. umbratilis* (principal vetor) e *L. anduzei*.⁹⁶

A primeira espécie a apresentar uma relação direta e possível participação dos tatus no seu ciclo de transmissão, a *Leishmania (Viannia) naiffi* ocorre nos estados do Pará e Amazonas. Três espécies de flebotomíneos são responsáveis pela transmissão vetorial: *L. ayrozai*, *L. paraensis* e *L. squamiventris*. O parasito foi isolado e caracterizado em tatu-galinha (*D. novemcinctus*) e provavelmente apresenta uma distribuição geográfica bem mais ampla, se esta for concomitante com a desse hospedeiro.⁹⁶

Alguns vetores também foram descritos apresentando uma relação direta com tatus, como o *Lutzomia intermedia*, *L. migonei* sendo uns dos principais mosquitos primordialmente silvestres que sobrevivem a drásticas degradações florestais. Provevemente não é antropofílico, e mantém sua atração por animais selvagens, como demonstrado na utilização de tatus como “isca”¹⁰⁹⁻¹¹⁴, (apud Rangel et al¹¹²).

Já o vetor *Lutzomyia (Trichophoromyia) ubiquitalis* (Mangabeira, 1942), foi descrito quando o pesquisador estudava apenas os machos retirados de tocas de tatus-galinha (*D. novemcinctus*) (Xenarthra) e pacas *Agouti paca* (Rodentia) em Belém, PA. Foi a primeira espécie do subgênero *Trichophoromyia* caracterizada como vetor da *Leishmania*.¹¹⁵

O *Lutzomyia (Psychodopygus) ayrozai* é o vetor presuntivo para tatus hospedeiros. Infecções graves foram detectadas em *L. squamiventris*, um flebotomíneo comum a humanos no Amazonas e Pará. Contudo, este flebotomíneo não é altamente antropofílico, fato este que é provavelmente responsável por sua baixa taxa de infecção em humanos.¹¹⁶

Por muito tempo, os tatus tem sido suspeitos como fonte de infecção para *Leishmania* para humanos na América do Sul, principalmente em razão da literatura não científica que indicava uma marcante associação de flebotomíneos com estas espécies.¹¹⁷

Até o momento o tatu-galinha (*D. novemcinctus*) é considerado o único hospedeiro selvagem para *Leishmania* spp. Sua infecção geralmente ocorre em pele e vísceras aparentemente normais.¹¹⁶ Segundo Naiff et al¹¹⁸, tatus são considerados os principais reservatórios para *Leishmania* spp na Amazônia brasileira.

Poucos estudos envolvendo tatus e sua participação no ciclo de transmissão da *leishmania* foram realizados. No Brasil, Lainson et al,^{117,119,120} isolaram e caracterizaram *Leishmania* spp em tatus no Estado do Pará.

Também na região norte, Amazônia, Lainson et al¹¹⁷ analisaram 14 indivíduos de tatus-galinha através do método de cultura de sangue, e fragmentos de baço, fígado e pele em meio NNN (ágar-sangue). *L.brasiliensis* foi isolado de amostras de três indivíduos. Não houve isolamento de amostras de pele, mas quando inoculado em hamsters, desenvolveram lesões nodulares.

Leishmania (Viannia) naiffi também foi isolada por Lainson et al¹¹⁷ e Naiff et al¹¹⁸ em um total de 10 de 64 tatus-galinhas e em um tatu-de-quinze-quilos (*Dasyopus kappleri*), utilizando de técnicas de cultura com amostras de tecido como pele, fígado, baço, sangue e linfonodos subcutâneos.

Estudos mais recentes desenvolvidos por Richini-Pereira et al,¹²¹ analisaram através de técnica de biologia molecular (PCR) amostras de fígado, baço, pulmão, rins, coração, linfonodos mesentéricos e glândulas adrenais de animais selvagens atropelados em rodovias no estado de São Paulo, dentre eles, três tatus-galinha (*D. novemcinctus*), um tatuí (*D. septemcinctus*) e um tatu-peba (*E. sexcinctus*). Apenas na amostra de fígado do indivíduo de *D. septemcinctus* procedente da região de Botucatu foi isolado *Leishmania* spp.

3.4 *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), antigamente conhecida como Blastomicose sul-americana ou Moléstia de Lutz-Splendore Almeida.¹²² Apesar de considerada a micose sistêmica mais prevalente em áreas rurais da América do Sul,¹²³ dados epidemiológicos indicam uma abrangente distribuição geográfica de *P. brasiliensis* na América Central e do Sul, do México a Argentina.¹²⁴

A PCM, autóctone da América Latina, apresenta maior incidência no Brasil (80% dos casos), Argentina, Colômbia e Venezuela.¹²²

No Brasil é endêmica, tendo a maior concentração de casos reportados nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Tem sido relatada a ocorrência de casos em áreas de colonização mais recente submetidas a desmatamento, como em partes da Amazônia, atingindo áreas dos Estados do Maranhão, Tocantins, Pará, Mato Grosso Rondônia, Acre e Amazonas, onde a paracoccidioidomicose pode ser considerada uma micose sistêmica emergente.¹²²

PCM possui um impacto social significativo na maioria dos países latino-americanos. Em parte, por afetar principalmente trabalhadores rurais durante o período de atividade da sua vida. Não há medidas de controle. O tratamento é frequentemente difícil e prolongado. Pacientes periodicamente precisam de hospitalização o que eleva o custo do tratamento.¹²⁵

Estima-se que mais de 10 milhões de indivíduos tenham se infectado com *P. brasiliensis*, adquirido por inalação, no qual atinge o epitélio pulmonar e transforma-se em uma espécie de levedura parasitária.¹²⁴

A forma humana de (PCM) na qual a ocorrência da seqüela é outro fator importante, frequentemente causa disfunção pulmonar, sérias deformações dermatológicas e outras limitações.¹²⁵ Estas variações de manifestações clínicas podem ser brandas ou de formas assintomáticas, a severas doenças disseminadas muitas vezes fatais.¹²⁴

Duas formas distintas de PCM são observadas: Uma forma aguda, que ocorre em pessoas jovens de ambos os sexos e parece desenvolver mais rapidamente assim que ocorre a infecção primária. E uma forma crônica ou adulta observada principalmente no sexo masculino e caracterizada por um longo período de latência, que como descrito em alguns casos pode durar de 30 a 40 anos.¹²⁵

A primeira caracteriza-se por comprometimento pulmonar, lesões ulceradas de pele, mucosas (oral, nasal, gastrointestinal), linfadenopatia; na forma disseminada, pode acometer todas as vísceras, sendo frequentemente afetada a supra-renal. A segunda é rara e, quando ocorre, compromete o sistema fagocítico-mononuclear e leva à disfunção da medula óssea. Na cavidade oral, evidencia-se uma estomatite, com pontilhado hemorrágico fino, conhecida como “estomatite moriforme de Aguiar-Pupo”.¹²⁶

Acredita-se que o solo e as plantas sejam o habitat ideal para o *P. brasiliensis*¹²³ e o homem era tido como único hospedeiro animal até o recente reconhecimento de tatus naturalmente infectados por esse fungo em regiões endêmicas da micose.¹²²

Já foram descritas evidências de infecção natural para *P. brasiliensis* em alguns animais selvagens através de testes intradérmicos e sorodiagnóstico. Porém, apenas em amostras de vísceras de tatus que este patógeno pôde repetidamente ser isolado¹²⁷⁻¹²⁹ (apud Bagagli et al⁴⁰).

Existe uma estreita relação entre *P. brasiliensis* e os tatus, e ainda não se sabe completamente se esta é comensal ou parasitária. Em estudos sobre tatus-galinha (*D. novemcinctus*), o fungo foi identificado em animais jovens e adultos, de ambos os sexos, sem apresentação de sinais clínicos aparentes de PCM.¹³⁰ A prevalência de infecção por *P. brasiliensis* em tatus-galinha (*D. novemcinctus*) é alta. Dados publicados na literatura indicam que aproximadamente de 100 indivíduos examinados, 37% albergam o *P. brasiliensis* em seus órgãos. Em alguns municípios brasileiros localizados em áreas hiperendêmicas para PCM, o fungo foi isolado em 75-100% dos animais avaliados.⁵⁰

Associação entre *P. brasiliensis* e o tatu-galinha (*D.novemcinctus*) foi primeiramente observada em 1986 com animais provenientes da região Amazônica por Naiff et al.¹³¹ Foram isolados em 4 de 20 indivíduos de *D. novemcinctus* procedentes da região de Tucuruí, estado do Pará, utilizando o método de cultura, inoculação em hamster (via intradérmica e intraperitoneal) e confirmados através de exames histológicos.

Estudando 21 tatus de vida livre capturados na região de Ibiá, Minas Gerais, Silva-Vergara et al¹³² através do método de cultura, isolamento e detecção por PCR, apresentaram pela primeira vez a evidência da presença deste patógeno em pulmão de tatu-galinha (*D. novemcinctus*) com granuloma contendo células fúngicas, atribuídas ao *P. brasiliensis*. O que corrobora com estudos realizados por Bagagli et al⁴⁰, no qual descreve elementos fúngicos, compatíveis com *P. brasiliensis* observado em linfonodos, fígado e pulmões de alguns indivíduos de tatus estudados, e que podem indicar uma condição da PCM ativa em alguns deles.

Estudos realizados por Bagagli et al⁵⁰ analisaram em área considerada endêmica na região de Botucatu, estado de São Paulo, amostras de solo e de animais, onde conseguiu-se isolar *P. brasiliensis* em amostras de solo e em 10/15 indivíduos de tatu-galinha (*D. novemcinctus*) estudados.

Em outra área rural também considerada endêmica do estado do Espírito Santo, Fernandes et al¹³³ utilizaram a técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) contendo glicoproteína purificada gp43 e gp70 capaz de detectar e classificar anticorpos IgM e IgG para *P. brasiliensis*. Na análise, de 47 indivíduos de tatu-galinha (*D. novemcinctus*) de vida livre, anticorpos IgM para gp43 foram detectados em 7 indivíduos, (14,8%) e anticorpos IgG detectados em 20 indivíduos (42,5%). Anticorpos para gp70 foram detectados em 10 indivíduos (21,3%) e anticorpos IgG detectados em 18 (38,3%).

Richini-Pereira et al¹³⁴ descreveu a detecção de *P. brasiliensis* através de PCR em um estudo com xenarthras (tamanduás e tatus) em área endêmica na cidade de Botucatu, São Paulo, sendo (n=06) indivíduos procedentes de atropelamento, (n=08) naturalmente mortos, (n=09) que vieram à óbito em cativeiro e (n=02) capturados na natureza (n=02), sendo três espécies de tatus (*D. novemcinctus*, *E. sexcinctus* e *Cabassous* spp).

Dentre os vinte indivíduos de tatus analisados em diferentes amostras de tecido, sete (*D. novemcinctus*) foram positivos. E em um destes, a amostra de tecido foi isolado *P. brasiliensis* em meio de cultura.

Outras espécies de tatus também fizeram parte de pesquisas envolvendo o isolamento e detecção *P. brasiliensis*. Richini-Pereira et al¹³⁵ também identificaram este agente utilizando a técnica de Nested-PCR na espécie tatuí (*Dasyus septemcinctus*) na região de Botucatu, São Paulo,

Na mesma região endêmica de Botucatu, Bagagli e Simões¹³⁶, obtiveram resultados positivos com amostras de baço e fígado de *D. hybridus*, mas com resultados negativos para cultura e isolamento.

Foram realizadas algumas tentativas de isolamento de *P. brasiliensis* em outras quatro espécies de tatus; tatu-de-quinze-quilos (*D. kappleri*), tatu-peba (*E. sexcinctus*), tatu-mulita (*D. hybridus*) e o tatu-de-rabo-mole-grande (*Cabassous tatouay*), mas não obtiveram cultura com resultado positivo.⁴⁰

Além do Brasil, Corredor et al¹³⁷ também descreveram o isolamento de *P. brasiliensis* em tatus-galinha (*D. novemcinctus*) na Colômbia e a participação do tatu-de-rabo-mole (*Cabassous centralis*) como mais um hospedeiro para este patógeno.¹³⁸

Estudos envolvendo não apenas indivíduos de tatus foram realizados, mas pesquisadores como Tercarioli et al¹³⁹, descreveram também o isolamento deste patógeno em amostras de solo de tocas de tatus-galinha. Mais tarde, em outro estudo que corrobora com estes resultados, foi realizado por Arantes et al¹⁴⁰, no qual descreveram o isolamento através de cultura e detecção por PCR de *P. brasiliensis* em 5 de 6 (positividade de 83%) amostras de aerossol de tocas de tatus, e em um indivíduo de tatus-galinha (*D. novemcinctus*) no mesmo local de estudo.

3.5 *Mycobacterium leprae*

O *Mycobacterium leprae* é um parasita intracelular obrigatório, que infecta nervos periféricos, causando uma doença transmissível crônica, conhecida como Hanseníase. Considerada uma das mais antigas doenças que acomete o homem, as referências mais remotas datam de 600 a.C. e procedem da Ásia, que, juntamente com a África, são consideradas o berço da doença. Estima-se que mais de dois milhões de pessoas apresentam sequelas de hanseníase.¹⁴¹

Aproximadamente 90% dos casos no mundo estão concentrados em apenas seis países, Índia, Brasil, Nepal, Myanmar, Moçambique Madagascar.¹⁴² Globalmente, o Brasil é o segundo país com maior número de casos, depois da Índia.¹⁴³

No Brasil, no período de 2007 a 2014, uma média de 37.000 casos novos foram detectados a cada ano. As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são consideradas mais endêmicas, com áreas de importante manutenção da transmissão.¹⁴¹ Esta doença é temida devido aos danos causados por seus sinais clínicos como ausência de sensibilidade em mãos e pés, cegueira e face desfigurada.¹⁴⁴ Os sinais clínicos e deformidades causados pela hanseníase tornou esta doença ameaçadora e com estigma social encontrado até hoje.¹⁴⁵

Em seres humanos, possui uma capacidade de infectar um grande número de indivíduos, e ao mesmo tempo apresenta uma baixa patogenicidade. Esta característica está relacionada não apenas a funções intrínsecas do agente, mas também da sua relação com o hospedeiro e ao grau de endemicidade do meio.¹⁴¹

A hanseníase é transmitida principalmente pelas vias respiratórias superiores de pacientes multibacilares não tratados (virchowiano e dimorfo), sendo também, o trato respiratório a mais provável via de entrada do *M. leprae* no corpo. É uma doença de notificação compulsória em todo o território nacional e de investigação obrigatória.¹⁴¹ Lavania et al¹⁴⁵, acreditam que a transmissão do bacilo ocorra através de descarga nasal pela boca e em menor grau, pelo contato direto de uma pessoa infectada ao indivíduo susceptível. Porém na hanseníase os mecanismos de transmissão ainda não foram claramente estabelecidos.¹⁴¹

Apesar do ser humano ser a única fonte de infecção reconhecida, outras possíveis fontes de transmissão para *M.leprae* já foram previamente identificadas, como a água¹⁴⁶, solo¹⁴⁵, vegetação¹⁴⁷ e artrópodes (pulgas, besouros, mosquitos e moscas)¹⁴⁸ em áreas endêmicas, também em animais selvagens como macacos mangabeys, chimpanzés e tatus).^{149,150} Pesquisas evidenciam especificamente os tatus-galinha (*D. novemcinctus*), no qual demonstrou lesões características específicas para hanseníase, similares aos seres humanos.¹⁵⁰⁻¹⁵⁷

Em 1971, Kirchheimer e Storrs¹⁵⁸ infectaram tatus experimentalmente e em 1975 uma doença com características de hanseníase foi relatada por Walsh¹⁵⁹ em tatus galinha selvagens. No entanto, descobriu-se que a hanseníase poderia ser naturalmente adquirida em tatus selvagens, demonstrando que a doença não estava limitada apenas aos humanos, sugerindo que os tatus poderiam transmitir hanseníase.¹⁵⁹

A partir daí, começaram a investigar as possíveis origens de infecção destes animais, e publicaram várias pesquisas com resultados semelhantes à hanseníase em diferentes áreas geográficas dos Estados Unidos. Em 1971 e 1972 Kirchheimer e Storrs¹⁵¹ e Kirchheimer et al¹⁵², relataram pela primeira vez uma infecção e transmissão de hanseníase em tatus-galinha (*D.novemcinctus*) inoculados previamente com *M. leprae* humano. Análise histopatológica das lesões demonstraram ser similares à infecção de hanseníase em pacientes humanos.

No período de janeiro de 1974 a junho de 1978, já haviam sido examinados 396 tatus selvagens, onde 306 eram provenientes da Louisiana e o restante da Florida e Texas. Apenas um animal (0,3%) apresentou sinais clínicos de micobacteriose generalizada, e que foi confirmada por exames histopatológicos.¹⁶⁰

Walsh et al¹⁵⁹ relataram que 49 tatus foram capturados na Louisiana e diagnosticados com lesões idênticas à hanseníase experimental. No mesmo estado, Smith et al,¹⁶¹ descrevem uma prevalência de 10% (2/20) indivíduos de tatus-galinha, (*D.novemcinctus*) com infecção disseminada e lesões em posição inferior a carapaça dorsal, concluindo que carapaça poderia ter sido a porta de entrada para a infecção.

Através do mapeamento geográfico da região do Texas e Louisiana, Smith et al¹⁶¹ detectaram 4,66% de 451 tatus infectados na Costa do Golfo do Texas. As taxas de prevalência locais variaram de 1% a 15,4%.

A prevalência de 2% de 494 indivíduos foi reportada por Job et al¹⁶² em um estudo histopatológico com tatus-galinha atropelados em rodovias na Louisiana. Os mesmos autores¹⁶³, através de análises moleculares, descrevem a detecção de fragmentos de DNA de *M. leprae* em 53% em linfonodos inguinais de tatus selvagens procedentes da Louisiana. Ainda com populações de tatus selvagens do estado da Louisiana, Walsh et al¹⁶⁴ e Smith et al¹⁶⁵ também relataram índices de prevalência mais elevados entre 4 a 30%.

Também na Louisiana, análises histopatológicas, sorodiagnóstico e biologia molecular (PCR) realizados por Clark et al¹⁶⁶, revelaram achados idênticos aos humanos infectados por *M. leprae*, na espécie tatu-galinha (*D.novemcinctus*). Mais tarde, Paige et al⁸¹, encontraram uma prevalência de 19% em 415 tatus analisados durante um período de 4 anos na Louisiana.

Resultados negativos de animais analisados para *M. leprae* também foram relatados por Kirchheimer e Sanches¹⁶⁷ e Clark et al¹⁶⁶ nos estados da Louisiana e Texas, como também para Alabama, Flórida, Arkansas, Geórgia e Mississipi segundo Walsh et al¹⁶⁴, Howerth et al¹⁶⁹ e Kirchheimer e Sanches.¹⁶⁸

Desde a descoberta do glicolípido fenólico-I (PGL-I), um antígeno específico do *M. leprae*, a presença de anticorpos IgM anti-PGL-I em pacientes hansenianos e seus contatos, tem sido relatada por diversos autores como Truman et al¹⁷⁰, Stallknecht et al¹⁷¹, Duthie et al¹⁷², Truman et al¹⁷³.

Utilizando esta técnica, Truman et al¹⁷⁰ diagnosticaram uma prevalência de 15.8% (84/530) enquanto as análises histopatológicas detectaram (17/493) ou 3-4% de prevalência nos indivíduos de tatus-galinha (*D.novemcinctus*) analisados.

Em estudos mais recentes, com auxílio de biologia molecular (PCR), Loughry et al¹⁷⁴ analisaram 500 amostras de tatus-galinha (*D.novemcinctus*) de populações do Mississipi, Alabama e Georgia, nas quais a proporção de indivíduos infectados variou entre 0 e 10% e confirmaram a ocorrência em tatus provenientes do Texas e Flórida. Ainda segundo os autores, apesar de raro, indivíduos positivos foram identificados em regiões do Leste, onde previamente eram consideradas áreas sem histórico de infecção.

No entanto, estudos desenvolvidos por Skinsnes et al¹⁷⁵ com 233 tatus, sugeriram a possibilidade da doença na natureza ser procedente de tatus cobaias que escaparam, ou através da contaminação do ambiente por descarte impróprio de carcaças e outro material contaminado por pesquisadores do centro de pesquisa onde tatus foram mantidos para infecção experimental.

Já segundo Truman et al¹⁷⁶, afirmam que a aparente distribuição geográfica de infecção de tatus por *M. leprae*, alimenta continuamente a especulação que a hanseníase nos Estados Unidos tenham ocorrido por mecanismos naturais ou através de seu ambiente.

Truman et al¹⁷⁷, também descreveram que tatus selvagens na Louisiana naturalmente infectados com *M. leprae* albergavam o tipo 3 da cepa Europeia/Norte Africana (SNP). Tais resultados, reforçam a hipótese de que tatus poderiam ter uma participação na transmissão da hanseníase humana, mas este papel ainda é incerto.

Em outro estudo comparativo de amostras de pacientes humanos com hanseníase e tatus também portadores, Truman et al¹⁷⁸, concluiu que ambos albergavam a mesma estirpe de *M. leprae*.

Mais recente, uma cepa zoonótica que diferencia das encontradas no Texas e Louisiana foi identificada em 10 pacientes humanos e em diversos tatus do Sul da Flórida, onde os tatus foram considerados livres de infecção 20 anos atrás.¹⁷⁹ Os estudos utilizando sorodiagnósticos nos estados do Texas e Louisiana demonstraram que apesar dos tatus selvagens daquelas regiões tenham apresentado taxas elevadas de anticorpos anti-*Mycobacterium leprae*, ainda sim, foi baixa a prevalência da doença em humanos.¹⁸⁰

Enquanto a hanseníase sugere ser comum em tatus nos Estados Unidos, a doença recebe pouca atenção e informação disponível em outros países.¹⁴³ Apesar de poucos estudos, o *M. leprae* já foi descrito infectando tatus em uma ampla distribuição geográfica nas Américas. Casos naturais da ocorrência de hanseníase em tatus de vida livre estão relatados no México¹⁸⁰, Colômbia¹⁸¹, Argentina¹⁸² e Brasil.¹⁸³⁻¹⁸⁵

Na cidade do México, Amezcua et al¹⁸⁰, encontraram um indivíduo entre 96 tatus através da técnica de inoculação em camundongos, porém nenhum indivíduo apresentou sinais histopatológicos. Smith et al¹⁶⁵, demonstraram que a hanseníase foi altamente prevalente 21/451 indivíduos nos municípios ao longo da costa do Texas e estendendo-se pelo México. Os autores também destacam que os tatus foram uma fonte de transmissão em potencial para as pessoas nascidas no México.

Na ilha de Grenada, Caribe, não foi encontrada evidência de *M. leprae* entre os tatus da região¹⁷⁶.

No Brasil, Opromolla et al¹⁸⁶, descrevem *M. leprae* em indivíduos de tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) de vida livre procedentes de Belém, e em tatus-galinha (*D. novemcinctus*) e tatu-de-rabo-mole (*Cabassous spp*) procedentes de Bauru, São Paulo. Sendo que apenas dois animais da espécie tatu-galinha (*D. novemcinctus*) apresentaram reação à infecção experimental sistêmica, com a presença de nódulos após inoculação experimental com o *M. leprae*.

Em 2002 Deps et al¹⁸⁷, avaliaram 14 tatus da espécie *D. novemcinctus* em uma área rural de elevada endemicidade do Estado do Espírito Santo. Nenhum dos animais estudados apresentou lesões macroscópicas sugestivas de hanseníase, porém cinco indivíduos foram positivos na análise por PCR. Em outro estudo através de testes de hibridização de DNA, Deps et al¹⁸⁸, descrevem *M. leprae* em 12% de amostras de sangue e 53% de amostras de tecido de 53 tatus galinha selvagens no Espírito Santo.

Estudos mais recentes detectaram tatus infectados naturalmente por *M. leprae* em uma área considerada hiperendêmica no estado do Ceará, e não apenas na espécie *D. novemcinctus*, mas também em indivíduos de *Euphractus sexcinctus*.¹⁸³⁻¹⁸⁴

Em inquéritos epidemiológicos no sudoeste dos Estados Unidos e no Brasil, houve relatos do potencial fator da associação da ingestão de carne ou algum contato prévio com tatus e pacientes portadores de hanseníase, quando comparados com populações controle.^{183,189-194} Porém, em diversos estudos, não foi confirmada esta associação relacionada à exposição, contato com tatus, nem ao consumo de sua carne.^{195,196}

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de cinco patógenos zoonóticos de importância para saúde pública em tatus de vida livre, em uma área no Pantanal da Nhecolândia e de tatus atropelados em três principais rodovias federais no bioma Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul.

4.1 Objetivos específicos

- a) Monitorar e avaliar a prevalência dos patógenos zoonóticos em quatro espécies de tatus; tatu-canastra (*P. maximus*), tatu-peba (*E. sexcinctus*), tatu-galinha (*D. novemcinctus*) e o tatu-de-rabo-mole (*C. unicinctus*) do Pantanal da Nhecolândia através do método de sorodiagnóstico para *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, *Toxoplasma gondii* e pelo método de diagnóstico molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para os patógenos *Mycobacterium leprae* e *Leishmania* spp;
- b) Avaliar e monitorar a prevalência de patógenos zoonóticos em quatro espécies de tatus mortos atropelados em três principais rodovias federais do estado do Mato Grosso do Sul, através do método de diagnóstico molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); para *Leishmania* spp, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Mycobacterium leprae*;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de estudo – bioma Pantanal

No bioma Pantanal, o programa proposto para o estudo foi conduzido no Hotel Fazenda Baía das Pedras, uma área de 14.000ha localizada no município de Aquidauana, (21 K 0627555 UTM 7870292), sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato-Grosso do Sul, Brasil e que tem como principais atividades econômicas a pecuária extensiva e o turismo ecológico. Sua área e a distribuição espacial dos indivíduos capturados estão representados na Figura 1.

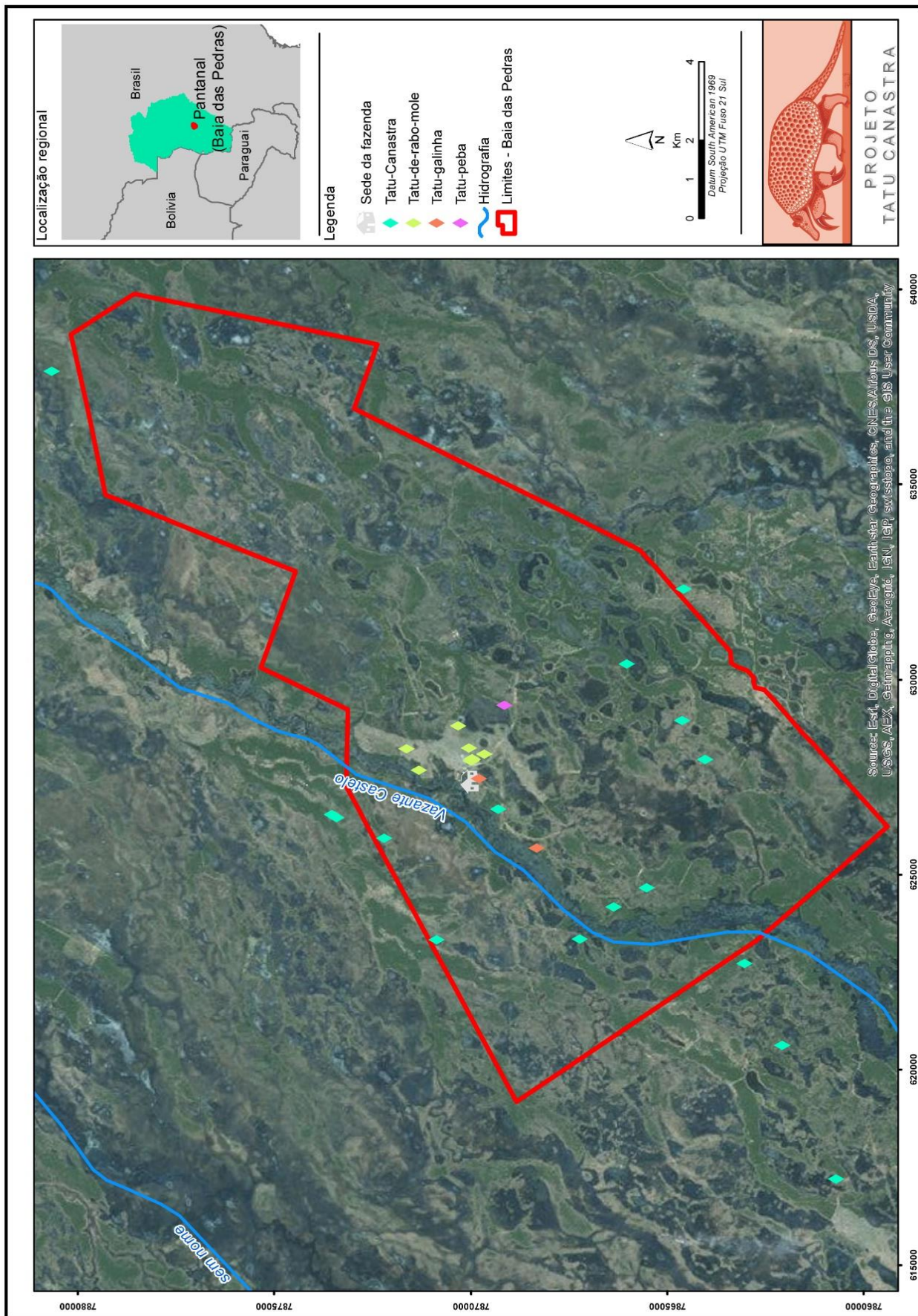


Figura 1 - Mapa da área de estudo e distribuição espacial dos indivíduos de tatus amostrados no Pantanal

5.2 Captura dos animais e colheita de amostras biológicas

Como parte integrante do projeto de pesquisa e conservação intitulado “Projeto Tatu-Canastra – Pantanal”, coordenado pelo Biólogo Arnaud J. L. Desbiez, o projeto apresenta como seu principal objetivo o levantamento de informações sobre a ecologia e história natural, análise e monitoramento das condições de saúde dos tatus desta região, em andamento desde 2011. O número amostral estimado para este estudo foi embasado nos resultados das atividades das campanhas de campo (duração de 15 dias por mês) realizadas previamente desde Maio de 2011. Um total de 43 indivíduos de vida livre foram capturados, sendo (16 *P. maximus*; 17 *E. sexcinctus*; 02 *D. novemcinctus* e 08 *C. unicinctus*) durante os meses de Junho de 2011 a Janeiro de 2015.

Para a colheita de material biológico no Pantanal, os animais foram contidos manualmente pelos técnicos para realização do procedimento de anestesia, sendo administrado com auxílio de uma seringa, a associação de fármacos anestésicos previamente estabelecida e extrapolada por alometria, dado pela combinação dos seguintes fármacos. Tartarato de Butorfanol (0,1 mg/kg) + Cloridrato de Detomidina (0,1 mg/kg) + Cloridrato de Midazolam (0,2 mg/kg) e suplementado com Cloridrato de Cetamina (10 mg/kg). A eleição deste protocolo justifica-se devido ao fato de ser passível de total reversão, através do uso de reversores específicos como; Naloxone (0,04 mg/kg) ou Naltrexone para reverter o Butorfanol, Ioimbina (0,125 mg/kg) para a Detomidina e o Flumazenil (0,01 mg/kg) para reverter o Midazolam.

Em todas as espécies capturadas, esta associação foi aplicada através da via intramuscular profunda na região dos quadríceps (entre os músculos semimembranoso e semitendinoso). Durante o manuseio, os animais tiveram os olhos umedecidos com pomada epitezam[®] para prevenir o ressecamento da córnea e utilizado vendas para redução de estímulos visuais.

Durante o procedimento anestésico, os animais permaneceram sob hidratação por infusão contínua pela via subcutânea com soro fisiológico (cloreto de sódio 0.9%), previamente calculado para a espécie e peso do animal capturado. O monitoramento dos parâmetros fisiológicos incluiu, ritmo e frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal e saturação de oxigênio através do uso do aparelho de oximetria de pulso (Nellcore®). Outros procedimentos realizados durante a imobilização incluem a colocação de radiotransmissores, microchip, pesagem, biometria, sexagem, colheita de sangue, amostras de fezes, swabs, coleta de ectoparasitos, biópsias de pele e avaliação clínica do estado geral do animal (presença de ferimentos, cicatrizes ou fraturas).

Amostras de sangue foram colhidas através de punção venosa da veia femoral com tubos a vácuo. O volume colhido consiste de um total de até 40 ml de sangue para indivíduos adultos de tatu-canastra, até 15 ml para o tatu-peba (*E. sexcinctus*) e tatu-galinha (*D. novemcinctus*) e 5 ml para os tatus-de-rabo-mole. O soro foi separado por centrifugação, dividido em alíquotas de 0,5 a 1 ml e, em seguida, congelados a 20°C negativo. Fragmentos de tecido (biópsia de orelha) com aproximadamente 1 cm, também foram colhidos e armazenadas em eppendorf com solução etanol 99% para detecção de *M. leprae* e *Leishmania* spp, através de biologia molecular, (PCR).

A equipe realizou um exame clínico minucioso sobre as condições gerais de saúde (como presença de alguma ferida ou lesão externa, cicatrizes, condições das patas, infestação de ectoparasitos), todas as informações foram descritas e armazenadas em fichas individuais (anexo) e identificadas para posterior análise em conjunto com os resultados dos exames colhidos do animal capturado.

Os protocolos anestésicos utilizados, seus efeitos, os parâmetros vitais, os dados e informações gerados durante a anestesia e recuperação, foram também cuidadosamente armazenados em fichas anestésicas individuais identificadas. Todas as informações são avaliadas continuamente pela equipe, de maneira a diminuir os potenciais efeitos adversos da anestesia e promover um melhor bem-estar aos animais capturados.

5.3 Marcação dos animais

Os indivíduos capturados em vida livre na fazenda Baía das Pedras foram marcados com microchips numerados e identificados individualmente a fim de distinguir os animais já previamente amostrados durante o período de estudo. Esta identificação também auxiliará no monitoramento e identificação em longo prazo dos animais amostrados de uma determinada população e mapeamento de sua distribuição.

5.4 Área de estudo – bioma Cerrado

5.5 Projeto Estradas – Levantamento de Animais Atropelados - Mato Grosso do Sul

Associado ao projeto de pesquisa realizado na Fazenda Baía das Pedras – Pantanal da Nhecolândia, com ecologia e epidemiologia de tatus em seu hábitat natural, ocorreu em paralelo entre os anos de 2013 e 2014, o projeto de pesquisa para avaliação da variabilidade genética com animais selvagens atropelados, coordenado pela Engenheira Florestal Patricia Medici e o Biólogo Arnaud J. L. Desbiez, em três principais rodovias federais do Mato Grosso do Sul, tendo como marco zero a cidade de Campo Grande. As estradas de eleição foram determinadas de acordo com o alto índice de atropelamento e diversidade de espécies selvagens.

Durante um ano, o projeto percorreu a cada quinze dias, três diferentes rodovias federais (BR 262, 163 e 267) que iniciam ou fazem parte do acesso à cidade de Campo Grande - MS, e que transcorrem o bioma Cerrado. Cada percurso obteve em média 600 km, percorridos de carro, a uma velocidade média de 60 km/hr, com dois observadores focados em cada lado da rodovia a procura de animais mortos atropelados. Foram colhidos material biológico de 10 indivíduos, entre Janeiro a Março de 2013, sendo apenas 07 destas viáveis para análise, 06 tatus-pebas (*Euphractus sexcinctus*) e 01 tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*).

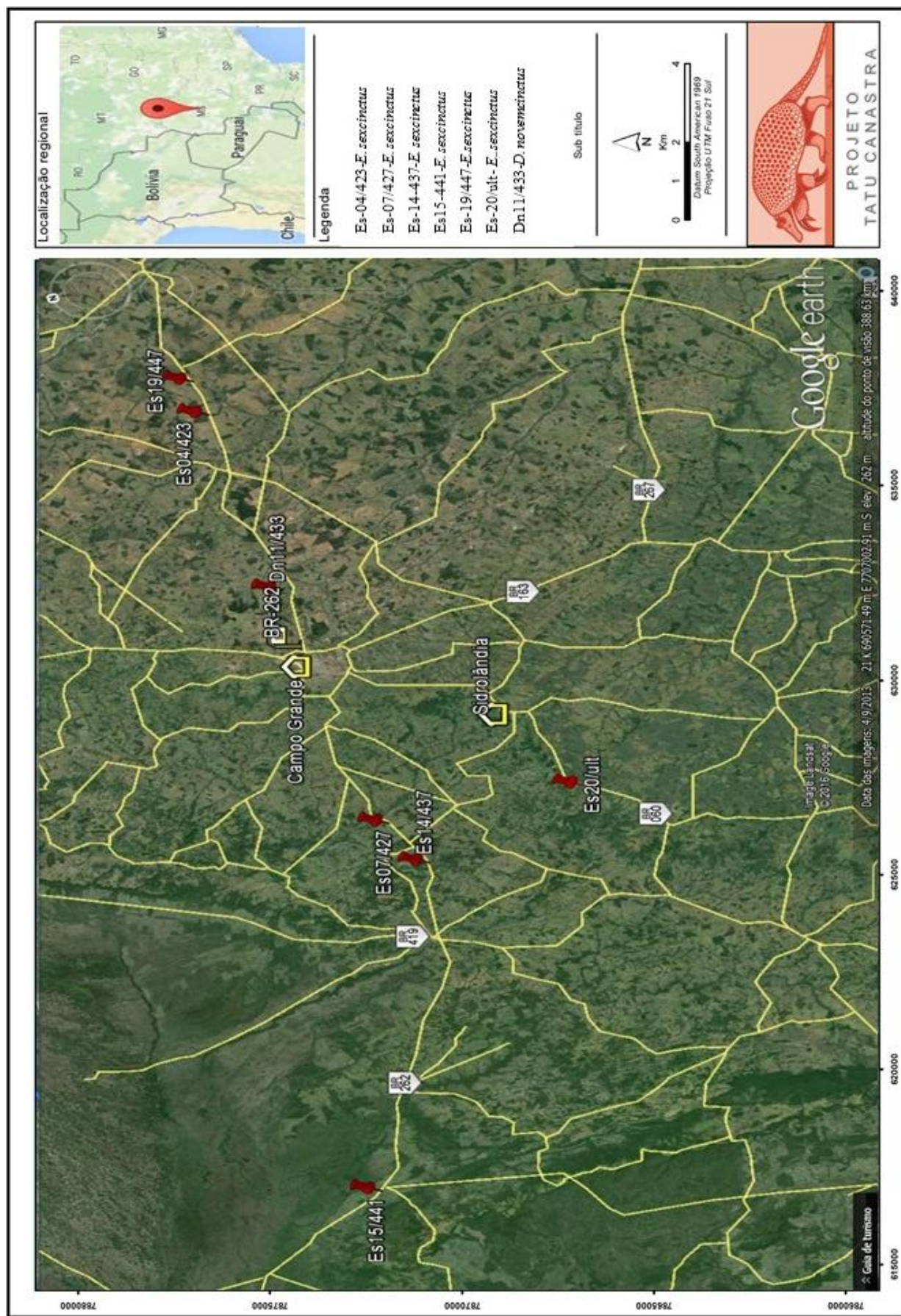


Figura 2 - Mapa da área de estudo e distribuição espacial dos indivíduos de tatus amostrados no Cerrado.

5.6 Colheita de material biológico – bioma Cerrado

Durante a colheita do material biológico, precauções assépticas foram tomadas a fim de evitar contaminação das amostras. Roupas, equipamentos de proteção individual (EPI's) e materiais estéreis foram de uso obrigatório para todos os membros da equipe.

A partir da identificação de indivíduos de tatus atropelados, fragmentos de tecido (amostras) foram obtidos apenas de animais mortos considerados recente (1-10 horas), e aparentemente com os órgãos íntegros, descartando os indivíduos em estágio avançado de autólise. Para este estudo, um conjunto de fragmentos (pulmão, fígado e baço) de 07 indivíduos 6 tatus-pebas e (*Euphractus sexcinctus*) e 1 tatu-galinha (*Dasybus novemcinctus*) foram colhidos fragmentos de tecido (biópsia) de orelha, fígado, baço e pulmão de aproximadamente 2 cm e armazenados em frascos com solução de etanol absoluto (99%) em frascos individuais para cada fragmento e indivíduo.

A posição geográfica de cada indivíduo encontrado foi armazenada em aparelho de GPS (Global Position System), e seus dados mantidos em fichas individuais para realização da necropsia no local.

5.7 Considerações éticas

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de ética e utilização de animais – CEUA do Instituto de Medicina Tropical – USP. E está sob licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade–SISBIO número 27587-6. Por este estudo ser parte integrante de um projeto de pesquisa e conservação destas espécies, nenhum animal foi submetido à eutanásia.

5.8 Análises laboratoriais

Neste capítulo serão descritos os métodos de diagnóstico e análises laboratoriais de eleição para este estudo e respectivos patógenos.

5.8.1 Teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Para detecção de anticorpos anti-*T.gondii* foi utilizado o teste de aglutinação modificada (MAT) de acordo com o protocolo descrito na literatura^{197,198} com pequenas modificações, realizado no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

A produção do antígeno foi desenvolvida através da infecção conjunta de *T. gondii* (taquizoítos da cepa RH) com células de sarcoma, a fim de aumentar a quantidade de parasitas recuperados por lavagem intraperitoneal. Após a filtração, a suspensão de *T. gondii* é diluída v/v em solução de formaldeído 6% (diluído em solução fisiológica 0,9%) *overnight* e mantida em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução é centrifugada 3 X a 600 g por 10 minutos e o sedimento ressuspenso em 50 ml de solução fisiológica 0,9% para remoção dos debris celulares e formaldeído. Em seguida, os parasitas são suspensos em tampão Borato pH 8,7 e ajustados para uma concentração final de 10^8 taquizoítos/ml.

Para padronização da concentração ideal de taquizoítos na suspensão parasitária do MAT, são testadas diluições seriadas na base 2, partindo de 1/5 até 1/20 de antígeno diluído em tampão Borato pH 8.2, contendo Azul de Evans, frente aos soros controle positivo e negativo nas diluições 1/16, 1/32 e 1/64 em tampão Borato pH 8.2. A reação é realizada em placas de 96 poços de fundo em “V”.

São adicionados na placa 25 µl das amostras de soro, nas diluições 1/16, 1/32 e 1/64 respectivamente seguidos de 25 µl de tampão Borato pH 8.2, contendo 0,2% de Azul de Evans e posteriormente 50 µl do antígeno nas diluições 1/5 até 1/20.

Em todas as placas, são testados como controle da reação, poços contendo tampão Borato pH 8.2, PBS e antígeno puro, que são ensaiados nas mesmas condições das demais amostras. São utilizadas como controles positivos amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii*. As placas são homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente *overnight*.

Após padronização inicial, a suspensão parasitária foi ajustada para a concentração ideal padronizada de antígeno e mantida a 4°C em tampão borato contendo Azul de Evans. A figura 2 mostra a padronização do antígeno de *T.gondii* para a reação do MAT. A melhor diluição do antígeno para a reação foi 1:10.

Após padronização da concentração antigênica, as amostras de soro de tatu foram ensaiadas de acordo com o protocolo a seguir: as amostras de soro foram diluídas 1:25 em PBS e, em seguida, foram adicionados 25µl de cada soro diluído para placas de 96 poços de fundo em “V”. Posteriormente, foram adicionados 25µl de 2-mercaptoetanol e 50µl do antígeno diluído em 1:10. As placas foram homogeneizadas e mantidas em câmara escura *overnight*.

5.8.2 Teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* foi utilizado o teste de hemaglutinação indireta, empregando-se o kit comercial Imuno-HAI – Chagas (Wama®), realizado no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Todas as amostras (n=43) foram ensaiadas de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras de soro foram diluídas em 1:32 em diluente com 2-mercaptoetanol fornecido pelo kit e, em seguida, foram adicionados 50µl de cada soro diluído em placas de microtitulação de fundo em “V”. Posteriormente, adicionou-se 25µl de suspensão de hemácias sensibilizadas com *T. cruzi*. Em todas as placas foram testados um soro controle positivo e um controle negativo, ambos, presentes no kit. As placas foram, então, homogeneizadas e mantidas em repouso por 1 hora.

A partir da leitura macroscópica do teste, interpretou-se como positivas, todas as reações que resultaram na formação de uma rede ou malha semi-transparente sobre o fundo das cavidades. Por outro lado, as reações foram consideradas negativas quando se formou um botão escuro, nítido, uniforme e sem halo reagente no fundo das cavidades. A titulação das amostras reagentes foi realizada diluindo-se as amostras na razão 2 a partir da diluição 1:32.

5.8.3 Teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leishmania (L.) infantum chagasi*

Para detecção de anticorpos anti-*Leishmania (L.) infantum chagasi* foi utilizado o teste de aglutinação modificada de acordo com o protocolo descrito também para detecção anti-*T.gondii*. As amostras foram submetidas para análise no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Para padronização dos ensaios foram utilizados soros de cães (*Canis lupus familiaris*) infectados com leishmaniose visceral como controle positivo e soro de cães saudáveis como controle negativo.

Para produção do antígeno são utilizados promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* cepa (MHOM/BR/1972/LD) mantidos *in vitro*. A suspensão de *L. (L.) infantum chagasi* foi diluída v/v em solução de formaldeído 6% (diluído em solução fisiológica 0,9%) e mantida *overnight* em temperatura ambiente. Posteriormente, essa solução é centrifugada 3 vezes a 600g por 10 minutos e o sedimento ressuspenso em 50 ml de solução fisiológica 0,9% para remoção do formaldeído. Em seguida, os parasitas são suspensos em tampão Borato pH 8,7 e ajustados para uma concentração final de 10^8 promastigotas/ml. Após padronização da concentração antigênica, as amostras de soro de tatu foram ensaiadas de acordo com o protocolo descrito para *T. gondii*.

5.8.4 Teste de diagnóstico molecular para detecção de *Leishmania* spp

Para detecção molecular, foi estabelecida inicialmente a extração do DNA em sala própria de extração de tecidos, isenta de produtos amplificados de PCR's e contaminantes, dentro de cabine de segurança com luz UV (DNA Workstation) do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Os fragmentos de tecido de pele, baço e fígado foram previamente reidratados (lavados três vezes com Água Mili-Q para retirada do etanol e submetidos à extração através do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA), seguindo instruções do fabricante. Por último, o DNA foi ressuscitado em 100 µL de solução de hidratação de DNA (DNA Rehydration Solution) e armazenado em freezer à -20°C até sua utilização. Em toda extração foram usados, um controle positivo e um controle negativo. O controle positivo da extração foi realizado com fragmentos de baço e fígado de hamsters provenientes do Biotério do Instituto Oswaldo Cruz previamente infectados com *Leishmania* spp.

O controle negativo da extração foi realizado com fragmentos de baço e fígado de hamsters sadios, provenientes do mesmo biotério. A amplificação do DNA foi realizada através do kit comercial PCR pureTaq Beads (illustra PureTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare), com iniciadores direcionados à região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania* spp. com 120 pares de bases (pb): (5'-GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3'), (5'(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3').

O kit consiste em grânulos liofilizados que contém os reagentes necessários para o MIX da PCR, bastando o acréscimo de água Milli Q e o par de iniciadores, com volume final de 25µl. A cada reação foram adicionados 2µl do DNA extraído das amostras a serem testadas. Como controle da reação foram utilizados os controles positivos e negativos da extração de DNA e a MIX da reação, que consiste nos reagentes da PCR sem o acréscimo da amostra de DNA.

As reações foram realizadas em Termociclador Eppendorf Nexus® (Eppendorf, Stevenage, Inglaterra), através das seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 60° por 1 minuto, seguido de extensão inicial a 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, os produtos da reação foram aplicados em mini-géis de poliacrilamida 8% em tampão TBE 1X, e submetidos a eletroforese a 110V por aproximadamente 50 min. Foram aplicados em cada poço de gel 7 µL de cada produto da PCR, incluindo o controle da MIX, os controles positivos e negativos da reação, e um padrão de peso molecular de 50 pb (Promega, Madison, EUA), diluídos em tampão de amostra (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol e 0,002% azul de bromofenol). Após a eletroforese os géis foram revelados por nitrato de prata utilizando o kit Silver Stain Plus® (Bio Rad, Hercules, EUA), para visualização das bandas.

5.8.5 Teste de diagnóstico molecular para detecção de *Paracoccidioides brasiliensis*

5.8.5.1 Extração de DNA

O DNA do fungo foi extraído de acordo com o protocolo estabelecido por Gräser et al,¹⁹⁹ e todas as amostras foram analisadas no laboratório do Instituto de Biociências, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista – Unesp.

5.8.5.2 Condições da PCR

Os primers ITS1/ITS4 e NLS1/NLS4 foram usados para amplificação das regiões ITS-5.8s-ITS2 e D1/D2 respectivamente. Todos os primers foram desenvolvidos pela IDT (Integrated DNA Technology). Para a reação de PCR em ambas as regiões os seguintes reagentes foram misturados e completados com água livre de nuclease (*nuclease free*) para um volume total de 25 μ l: 0.625 μ l para cada primer (0.5 pmol/ μ l concentração final), 0,5 μ l dNTPs (10mM), 5 μ l de 5X Phusion® GC buffer (1X de buffer contain 1.5mM de MgCl₂, 2,5 μ l DMSO 30%, 0,25 μ l Phusion DNA polymerase 2U/ μ l, Thermo Scientific) e 3 μ l de DNA modelo (400 ng/ μ l)

A análise por PCR foi realizada utilizando um termociclador Veriti (Applied Biosystems) em 98°C por 15 minutos, 35 ciclos em 98°C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, 72 °C por 10 min. Estas condições foram aplicadas para se obter as regiões dos produtos do PCR ITS1-5.8s-ITS2. Para os produtos de PCR das regiões D1/D2, as condições se mantiveram as mesmas, porém a temperatura de anelamento foi de 60 °C.

Os produtos de PCR foram detectados como uma banda única, de 600 pb (pares de base) para D1/D2 e 500 para 700 pb para ITS1-5.8-ITS2 por 1,5% de gel agarose em eletroforese e radiação Ultra-violeta – UV. Para estimar o comprimento do fragmento de DNA para cada região foi usado a régua Gene 1kb (Thermo Scientific®).

5.8.5.3 Purificação do DNA

A purificação do DNA foi realizada utilizando EXOSAP-IT (Affymetrix).

5.8.5.4 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento pelo método de Sanger's²⁰⁰ foi realizado em um analisador 3500 Applied Biosystem) de acordo com as instruções do fabricante. Edição de sequências, identificação das espécies e análise filogenética foi executada utilizando o software MEGA 6.0v. A identificação da espécie foi realizada através do BLASTn, uma ferramenta de análise da sequência do algoritmo da BLAST do Centro Nacional de Biotecnologia da Informação (NCBI).²⁰²

Cada sequência foi identificada da melhor referência de pontuação de Blast, com identidade de 98% comparado a sequência em questão. Adicionalmente, cada sequência da região ITS1-5.8s-ITS2 foi “blastada” utilizando as sequências ITS fornecidas por Graser et al²⁰¹ como sequência inquerida. Ambas regiões, ITS1-5.8s-ITS2 e D1/D2 foram usadas para identificação da espécie baseado também no critério de Graser et al²⁰¹ para a nomenclatura de espécies de dermatófitos.

Para análise filogenética, foi utilizada a sequência de alinhamento ITS1-5.8s-ITS2 (Clustal) para construir a árvore genealógica. A sequência que inclui a região exata ITS-5.8s-ITS2 para cada cepa foi obtido a zona de consenso inicial para ITS1 e a zona de consenso final para ITS2 na sequência da ATCC (American Type Culture Collection) ou da CBS (Central Bureau voor Schimmel cultures) depositadas no banco de genes.²⁰⁵

A análise filogenética baseada no método Neighbor-Joining (NJ)²⁰³ foi realizada aplicando os 3 parâmetros de Tamura. A reamostragem na inicialização foi feita para acessar os nódulos utilizando 1000 replicações com adições aleatórias.

5.8.5.6 Detecção molecular para *Mycobacterium leprae*

Os fragmentos foram armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo 500 µl de RNAlater e transportadas para análise no Laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias (Labmam/IOC/Fiocruz) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. As amostras foram estocadas a -20°C, até o momento do seu processamento.

5.8.5.7 Extração de DNA dos tecidos

O DNA foi extraído dos tecidos coletados, utilizando o kit comercial (DNeasy Tissue QIAGEN) de acordo com as orientações do fabricante (QIAGEN). O material obtido foi mantido a -20°C até ser submetido à PCR.

5.8.5.8 Detecção do DNA de *M. leprae*

Os níveis do gene RLEP em amostras de DNA de *M. leprae* foram determinados utilizando o sistema TaqMan® por qPCR. Para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade da qPCR, 0,5 ul do DNA purificado da cepa referência Thai-53 foi utilizada como controle positivo da reação e TaqMan® Mix Master 2X sem DNA para controle negativo. Às reações de qPCR, contendo TaqMan® Mix Master 2X, em um volume total de 12,5 ul foi adicionado 2 ul do DNA alvo, 100 nM da sonda para RLEP e 300 nM de cada primer. A mesma reação foi realizada individualmente para o DNA purificado de Thai-53.

As reações foram submetidas ao seguinte programa: a 50 °C por 2 min., 95 °C por 10 min. e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min. usando o Sistema Step One Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Uma curva de titulação padrão para o sistema RLEP qPCR foi gerada utilizando diluições de 10 vezes de DNA purificado do Thai-53 variando de 1ng a 10fg. Primers e sondas foram desenhados usando Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems), descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das sequências de primers e sonda do gene RLEP.

Alvo	Descrição	Primer	Sequência de Primers
RLEP		MLRLEP - F	5'- GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A - 3'
	Elemento repetitivo	MLRLEP - R	5'- CGC TAG AAG GTT GCC GTA T - 3'
		<i>MLRLEP probe</i>	5'- CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA - 3'

5.8.5.9 Genotipagem

A variabilidade genética dos isolados de *M. leprae* oriundos de amostras clínicas de pacientes hansenianos e tatus naturalmente infectados foi avaliada utilizando 17 repetições em *tandem* de número variável (VNTR's), 3 polimorfismos de base única (SNPs) para determinação dos quatro tipos (1-4) de *M. leprae* e 84 marcadores informativos para determinação dos 16 subtipos (1A-4P), bem como sequenciamento completo do genoma (WGS), quando necessário. O polimorfismo dos diferentes VNTR's foi determinado através de MLVA (Multiple-locus VNTR analysis) utilizando FLA (Fragment Length Analysis), os SNPs foram analisados através de PCR-RFLP e/ou sequenciamento.

Vale ressaltar, que quando o MLVA não fornece dados satisfatórios para determinar o número de cópias de VNTR ou houver existência de genótipos idênticos por MLVA, mas que não sejam explicados pelo contexto epidemiológico e geográfico, é realizado o sequenciamento completo do genoma (WGS) destes isolados, utilizando sequenciador de nova geração (HiSeq 2500, da Illumina, pertencente a plataforma de sequenciamento de alta vazão do IOC da Fiocruz).

5.8.6 MLVA (*Multiple-locus VNTR Analysis*)

Quatro reações contendo diferentes combinações de pares de iniciadores (PCR *multiplex*), marcados com fluorescência, foram conduzidas para amplificar as 17 repetições (micro- e minissatélites) usados como alvos deste estudo.

5.8.6.1 Análise do comprimento dos Fragmentos (Fragment Length Analysis)

O material amplificado foi diluído, combinado a 8.7µl de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) e 0,3µl do padrão de DNA LIZ-500 (Applied Biosystems) e submetido à análise de fragmentos através de eletroforese de capilar no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). O número de cópias de cada repetição foi determinado através da análise do comprimento dos fragmentos gerados utilizando o software gratuito Peak Scanner versão 1.0 (Applied Biosystems).

5.8.6.2 Análise dos eletroferogramas de sequenciamento

O número de cópias encontrado em cada locus foi introduzido no programa de computador Bionumerics (Applied Maths, Gent, Bélgica) em formato de tabela através de um protocolo chamado Open Database Connectivity (ODBC). Posteriormente, são criadas matrizes de similaridade, dendrogramas e árvores filogenéticas utilizando o índice de similaridade calculado pelo coeficiente categórico e os algoritmos Unweighted Pairgroup Arithmetic Averages (UPGMA), Neighbor-Joining (N-J) e Minimum Spanning Tree (MST) para criar árvores filogenéticas.

5.8.6.3 Análise de polimorfismos de base única SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”)

Para a amplificação dos SNPs nas posições de 14.676, 1.642.875 e 2.935.685 do genoma de *M. leprae*, foram utilizados três pares de iniciadores descritos por Sakamuri et al.²⁰⁴. O DNA de *M. leprae* foi amplificado por PCR utilizando o Kit da Invitrogen (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Após a primeira PCR para amplificação da região contendo polimorfismo na posição 2.935.685 do genoma de *M. leprae*, as amostras positivas foram digeridas com 5 U (unidades) da enzima de restrição BstUI por 1 hora a 60°C.

O material resultante da amplificação da região contendo polimorfismo na posição 14.676 do genoma de *M. leprae* foi digerido com 5 U da enzima de restrição SmlI por 1 hora a 55°C. O produto da digestão utilizando enzimas de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%.

O produto amplificado para detecção de polimorfismo na posição 1.642.875 foi purificado utilizando o QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o material foi submetido à reação de sequenciamento, precipitado e sequenciado através do sequenciador automático ABI 3730 (AppliedBiosystems).

A mudança de nucleotídeo na posição determinada foi analisada através do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 4.0.²⁰⁵ A determinação dos 16 subtipos (1A-4P) do bacilo foi realizada de acordo com o que foi descrito por Monot et al.²⁰⁶

6 RESULTADOS

6.1 Diagnósticos laboratoriais

6.2 Detecção de anticorpos *anti-Toxoplasma gondii*

Para o diagnóstico de anticorpos-*anti-Toxoplasma gondii*, foram analisadas 43 amostras individuais de soro. A frequência de tatus de vida livre positivos para a presença de anticorpos *anti-Toxoplasma gondii* foi de 13/43 ou 30,20%, $\pm 1,1\%$. As amostras positivas (Dn-01, Es-01, Es-03, Es-06, Es-07, Es-08, Cb-07, TC-02, TC-03, TC-04, TC-06, TC-07, TC-11), diluição e porcentagem de animais positivos estão descritos na Tabela 2. A distribuição espacial dos indivíduos está demonstrada na figura 3.

Tabela 2 - Lista das espécies de tatus de vida livre testados para anticorpos *anti-Toxoplasma gondii*, variação da titulação obtida, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie.

Espécie	Variação dos títulos	Positivos	Testados	%Positivos
<i>Dasybus novemcinctus</i>	1:100	01	02	50,00%
<i>Euphractus sexcinctus</i>	1:25/1:50	05	17	29,41%
<i>Cabassous unicinctus</i>	1:25	01	08	12,50%
<i>Priodontes maximus</i>	1:25/1:50/1:100	06	16	37,50%
<i>Total</i>		13	43	30,23%

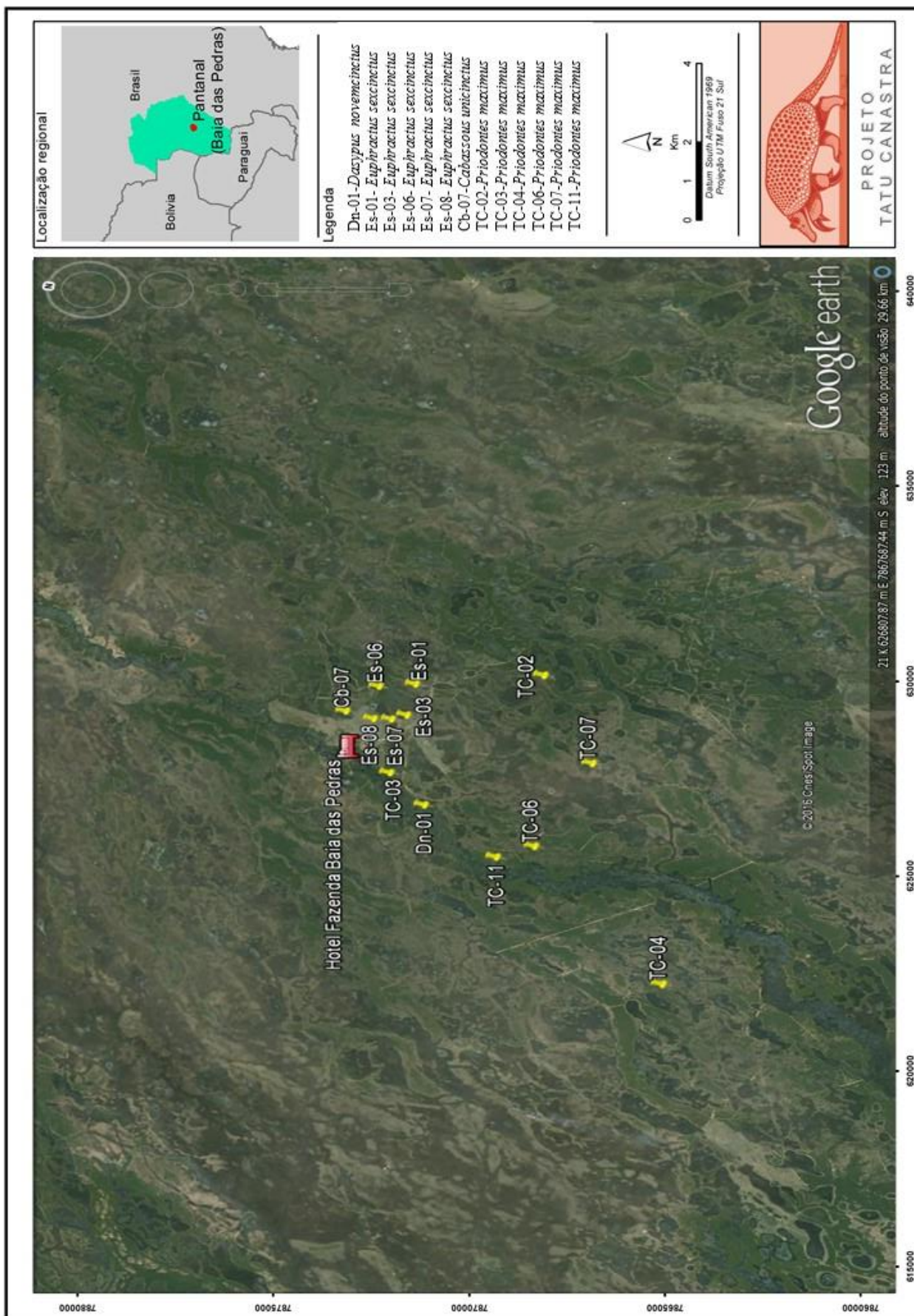


Figura 3 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus com anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

6.3 Detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Para o diagnóstico de anticorpos-anti-*Trypanosoma cruzi*, foram analisadas 43 amostras individuais de soro. A frequência de tatus de vida livre positivos para a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* foi de 1/43 ou 2,3%, \pm 0,3%. O resultado da amostra positiva (Dn02), diluição e a porcentagem de animais positivos estão descritos na Tabela 3 e sua distribuição espacial está demonstrada na figura 4.

Tabela 3- Lista das espécies de tatus de vida livre testados para a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, variação da titulação obtida, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie.

Espécie	Variação dos títulos	Positivos	Testados	%Positivos
<i>Dasypus novemcinctus</i>	1:32	01	02	50%
<i>Euphractus sexcinctus</i>		00	17	
<i>Cabassous unicinctus</i>		00	08	
<i>Priodontes maximus</i>		00	16	
<i>Total</i>		01	43	2,3%

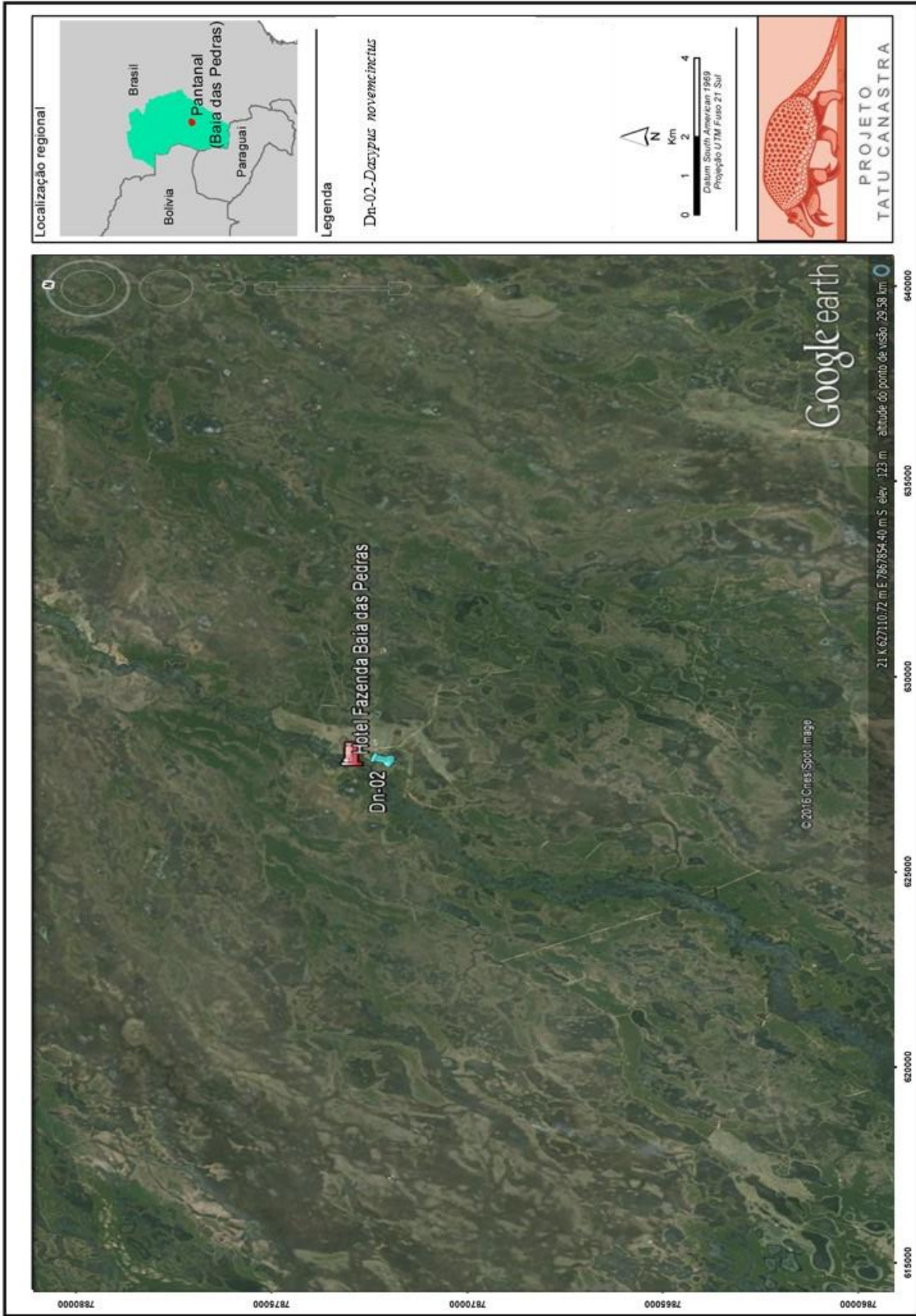


Figura 4 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus com anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*.

6.4 Detecção para anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Para o diagnóstico de anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, foram analisadas 43 amostras individuais de soro. A frequência de tatus de vida livre positivos para a presença de anticorpos anti- *Leishmania (L.) infantum chagasi* foi de 4/43 ou 9,3%, $\pm 0,6\%$. O resultado das amostras positivas (Dn01, DN 02, Es01, Cb07), as diluições e a porcentagem de amostras positivas estão descritas na Tabela 4. A distribuição espacial das amostras positivas está demonstrada na figura 5.

Tabela 4 - Lista das espécies de tatus de vida livre testados para a presença de anticorpos anti-*Leishmania (L) infantum chagasi*, variação da titulação obtida, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie.

Espécie	Varição dos títulos	Positivos	Testados	%Positivos
<i>Dasytus novemcinctus</i>	1:20	02	02	100%
<i>Euphractus sexcinctus</i>	1:20	01	17	5,8%
<i>Cabassous unicinctus</i>	1:20	01	08	1,2%
<i>Priodontes maximus</i>			16	
Total		04	43	9,3%

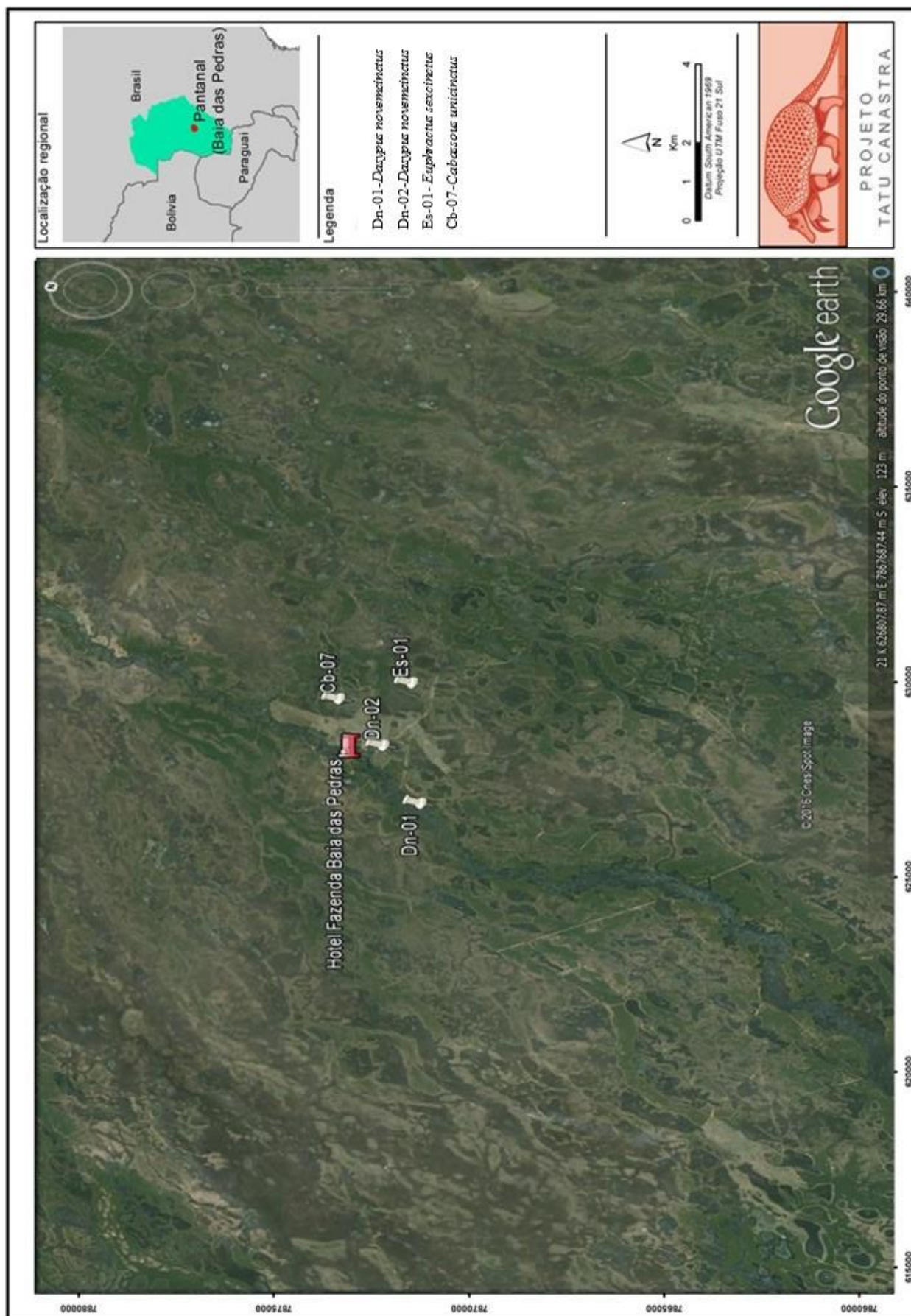


Figura 5 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatu com anticorpos anti-*Leishmania infantum chagasi*.

6.5 Detecção molecular (PCR) para *Leishmania* spp

Para a detecção de *Leishmania* spp, foram analisados um total de 50 amostras através de (PCR), sendo 43 amostras de fragmentos de orelha dos indivíduos provenientes do Pantanal e de 07 amostras do conjunto (pulmão, fígado e baço) de cada indivíduo do Cerrado. Como resultado, nenhuma amostra amplificou, sendo considerada todas negativas, conforme demonstrado na figura 6.

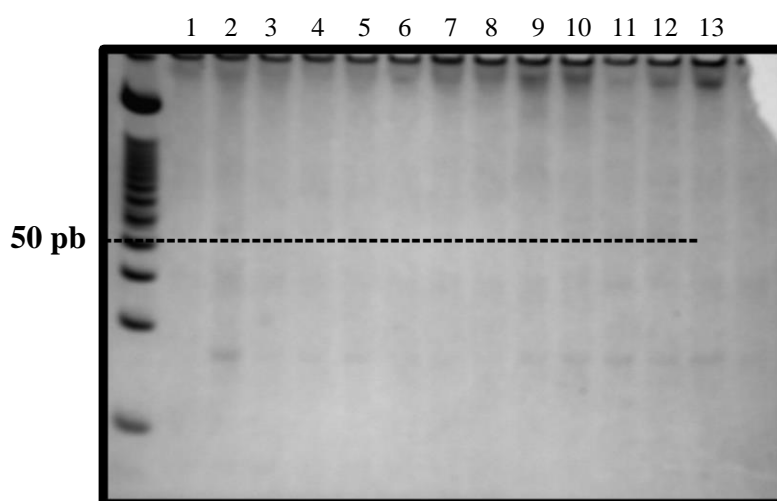


Figura 6 – Demonstração do resultado parcial da análise por PCR para *Leishmania* spp (amostras não amplificadas).

Tabela 5. Lista das espécies de tatus de vida livre (Pantanal) e mortos atropelados (Cerrado) testados para a detecção de *Leishmania* spp, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie.

Espécie	Testados Cerrado	Testados Pantanal	%Positivos
<i>Dasypus novemcinctus</i>	01	02	-
<i>Euphractus sexcinctus</i>	06	17	-
<i>Cabassous unicinctus</i>		08	-
<i>Priodontes maximus</i>		16	-
Total	07	43	0

6.6 Detecção molecular (PCR) para *Paracoccidioides brasiliensis*

Foram analisadas 07 amostras individuais de fragmentos de tecido (pulmão, baço e fígado). A frequência de tatus de vida livre positivos para detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* foi de 100%. Amostras positivas (Es04/423; Es07/427; Es14/437; Es15/441; Es19/447; Es20/Ult; Dn11/433, conforme figura 7. A distribuição espacial dos animais positivos está demonstrada na figura 8.

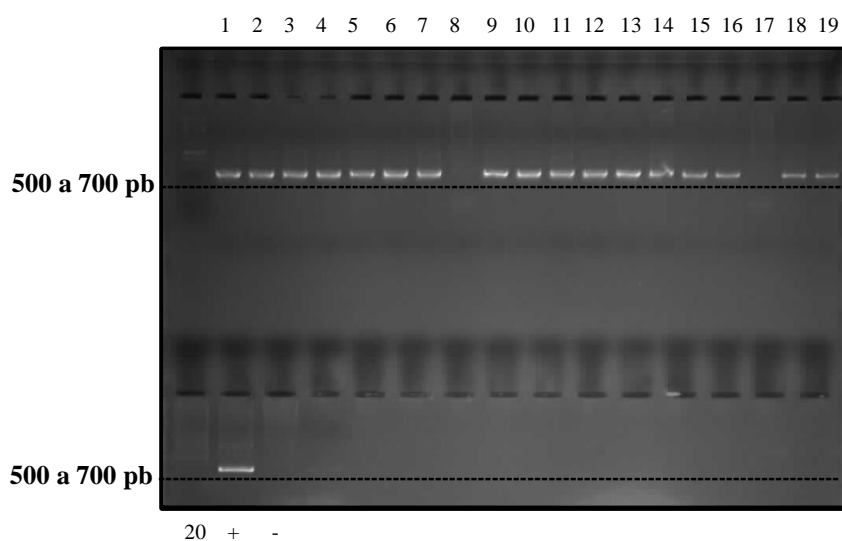


Figura 7 - Demonstração da análise do PCR para *Paracoccidioides brasiliensis*.

Grupo de três amostras para cada indivíduo (fígado, baço e pulmão).

Tabela 6. Lista das espécies de tatus de vida livre (Cerrado) mortos atropelados testados para a detecção de *Paracoccidioides brasiliensis*, número de indivíduos positivos, número de indivíduos testados e porcentagem de animais positivos por espécie.

Espécie	Positivos	Testados	%Positivos
<i>Dasypus novemcinctus</i>	01	01	100%
<i>Euphractus sexcinctus</i>	06	06	100%
<i>Cabassous unicinctus</i>			
<i>Priodontes maximus</i>			
Total	07	07	100%

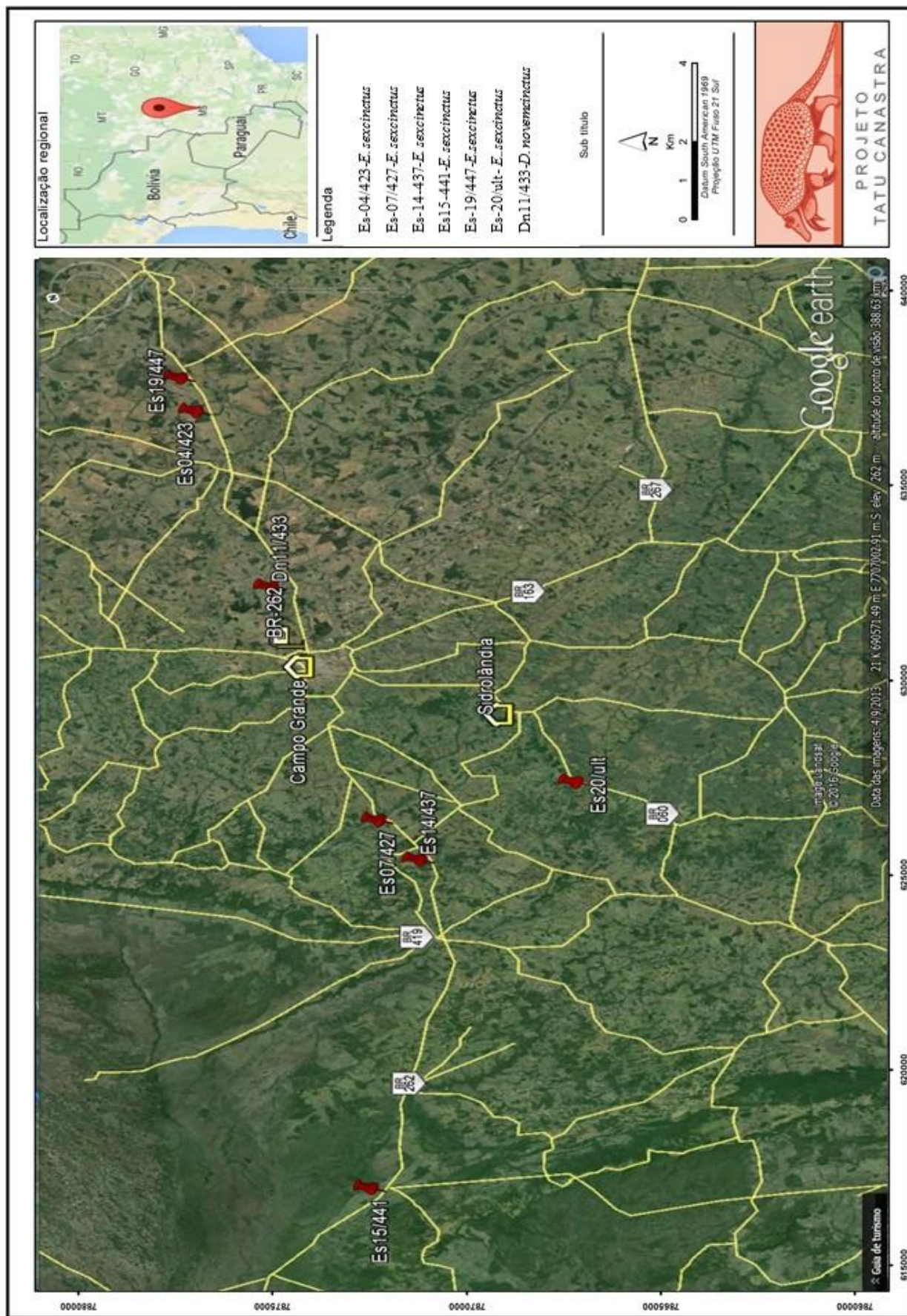


Figura 8 - Mapa de distribuição espacial dos indivíduos de tatus positivos para análise molecular por PCR para *P. brasiliensis*.

6.7 Detecção molecular (PCR) para *Mycobacterium leprae*

6.7.1 PCR em tempo real – alvo RLEP

A primeira análise foi realizada com o gene RLEP para todas as amostras (n=50) utilizando 10ul por reação. Como resultado: 08 amostras (Es14, TC04; TC14; Es14/437; Es07/427; Es15/441; Es20/448; Dn11/433), amplificaram, porém apenas Es14 e Es15/441 funcionaram em duplicata. As amostras analisadas apresentaram uma reação de amplificação, mas com ressalva para os valores de CT, considerados muito altos comparados aos padrões para esta análise (entre 12 e 16).

Tabela 7. Lista de amostras avaliadas e valores para CT (*quando reagiram em duplicata)

Amostra	Valores CT
* Es-14	37.65 e 37.12
TC-04	37.89
TC-14	39.05
Es-14/437	37.11
* Es15/441	35.86/36.3
Es-20/448	38.56
Dn11/433	36.92

Legenda: Es (*Euphractus sexcinctus*), TC (*Priodontes maximus*) e Dn (*Dasypus novemcinctus*).

6.7.2 PCR em tempo real – alvo RLEP

Baseado no resultado da análise anterior, foi realizada uma reanálise das amostras que possivelmente amplificaram (Es14, TC04; Es-15/441 e Dn11/433), mas neste teste, foram dispostas com diferentes concentrações (1:10, 2ul, 5ul e 10ul) e junto à reconstituição, foi aplicado DNA conhecido – (controle) para cada uma das concentrações avaliadas de maneira a avaliar os valores de CT e assim distinguir um possível artefato de técnica da análise anterior.

Como resultado, a amostra Es-15/441 na diluição 10ul e a amostra Dn-11/433 nas diluições 5ul e 10ul, mais uma vez demonstraram uma possível amplificação em duplicata, mas ainda mantiveram os valores de CT muito altos comparados as amostras controles com a mesmas diluições, como descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Demonstração das amostras analisadas em quatro diluições cada (1:10; 2, e 5 µl), seus valores de CT correspondentes e os valores de CT para o DNA conhecido.

Amostras	CT		CT amostras reconstituídas (NHDP- 63 1ng/ul)
	<i>*2 valores quando amostra funcionou em duplicata</i>		<i>*2 valores quando amostra funcionou em duplicata</i>
Es-14	01:10	35.91	15.96/15.65
	2ul	-	18.5/17.61
	5ul	-	22.62/22.51
	10ul	-	36.12/35.1
TC-04	01:10	-	16.01/15.92
	2ul	-	16.2/15.91
	5ul	36.96	16.72/16.74
	10ul	39.14	20.94/10.94
Es- 15/441	01:10	34.81	12.77/15.81
	2ul	34.72	13.2/14.55
	5ul	-	16.24/16.02
	10ul	24.59/37.12	16.54/16.17
Dn- 11/433	01:10	-	15.91/15.69
	2ul	33.95	15.75/15.92
	5ul	34.96/34.98	17.2/26.94
	10ul	37.78/34.9	16.51/14.58

6.7.3 PCR *multiplex* para amplificação de VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3)

Nesta análise as amostras que indicaram uma possível amplificação anteriormente para PCR em tempo real com o gene RLEP (Es-14, TC-04, Es-15/441, Dn-11/433), foram reavaliadas em diferentes concentrações (1:10 μ l, 2 μ l e 4 μ l), porém desta vez foi realizada uma reconstituição (aplicação de DNA conhecido) para cada uma das concentrações avaliadas.

As quatro amostras reavaliadas, Es-14 nas diluições (1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l), TC-04 (2 μ l, 4 μ l), Es-15 (1:10 μ l) e Dn-11/433 (1:10 μ l; 2 μ l e 4 μ l), amplificaram para diferentes diluições conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Demonstração das amostras analisadas (em três diluições) que amplificaram para esta combinação VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3). Não foi verificada inibição.

Amostra	Diluição amostras
Es-14	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l;
TC-04	2 μ l, 4 μ l
Es15/441	1:10 μ l
Dn11/433	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l

6.7.4 PCR *multiplex* para amplificação de VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3)

Uma nova reavaliação para a combinação #1 foi realizada, mas desta vez com todas as amostras (1-50) em diferentes concentrações (1:10 μ l, 2 μ l e 4 μ l). Resultado: Das 50 amostras analisadas, apenas três, Es-14 nas diluições (1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l), TC-16 (2 μ l; 4 μ l), Dn-11/433 (1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l) amplificaram para esta combinação, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Demonstração das amostras analisadas (em três diluições) que amplificaram para esta combinação VNTR's (combinação #1 – AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3). Não foi verificada inibição.

Amostra	Diluição amostras
Es-14	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l;
TC-16	2 μ l; 4 μ l
Dn-11/433	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l

6.7.5 PCR *multiplex* para todas as combinações: #1 (AC8b, GTA9, GGT, AT17 e 6-3), #2 (21-3, AC9, AT15 e AC8a), #3 (27-5, 6-7, TA18 e TTC) e #4 (18-8, 12-5, 23-3 e TA10)

Neste teste, as amostras que amplificaram na análise anterior (Es-14, TC-16 e Dn-11/433) foram avaliadas em diferentes concentrações (1:10 μ l, 2 μ l e 4 μ l) para todas as combinações VNTR's.

Tabela 11 – Demonstração das amostras analisadas (em três diluições) que amplificaram para todas as combinações VNTR's (combinação #1; #2; #3 e #4).

Amostra	Combinações	Diluição amostras
Es14	#1	2 μ l; 4 μ l
	#2	2 μ l; 4 μ l
	#3	2 μ l; 4 μ l
	#4	
Dn11/433	#1	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l
	#2	2 μ l; 4 μ l
	#3	2 μ l; 4 μ l
	#4	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l
TC-16	#1	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l
	#2	2 μ l; 4 μ l
	#3	1:10 μ l; 2 μ l; 4 μ l
	#4	2 μ l; 4 μ l

6.7.6 PCR convencional para amplificação de RLEP utilizando os primers RLEP2-1 (5'-atatcgatgcaggcgtgag-3') e RLEP2-2 (5'-ggatcatcgatgcactgttc-3') - 282-bp

Em uma tentativa final, foram selecionadas as amostras que em mais de um método amplificaram em diferentes combinações e diluições. Para esta análise, foi utilizado o método de PCR convencional para amplificação de RLEP com os primers RLEP2-1 (5'-atatcgatgcaggcgtgag-3') e RLEP2-2 (5'-ggatcatcgatgcactgttc-3') -- 282-bp.¹⁸⁷ Foram testados nesta reação duas concentrações para cada amostra (2µl e 5µ), junto ao controle positivo avaliado, NHDP63 (1ng). Amostras selecionadas para o teste foram: Es-14, TC-04, TC-16, Es-15/441 e Dn-11/433. Resultado: não houve amplificação das amostras em nenhuma diluição, conforme demonstrado a seguir na figura 09.

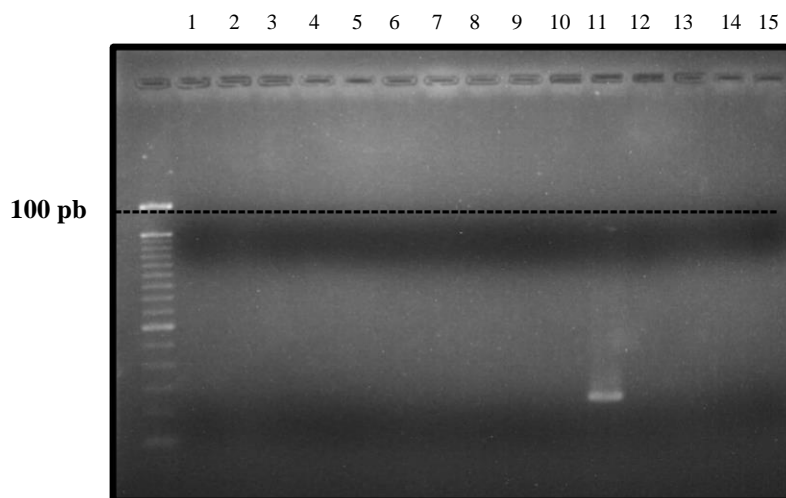


Figura 09 – Resultados da análise por PCR convencional, alvos RLEP 1 e 2. Amostra 1- Es-14 (5µl), 2- TC-04 (5µl), 3- TC-16 (5µl), 4- Es-15/441 (5µl), 5- Dn-11/433 (5µl), 6- Es-14 (2µl), 7- TC-04 (2µl), 8- TC-16 (2µl), 9- Es-15/441 (2µl), 10- Dn-11/433 (2µl), 11- Controle positivo (1ng), 12, 13, 14 e 15 – controle negativo (H₂O).

7 DISCUSSÃO

7.1 Exposição dos tatus ao *Toxoplasma gondii*

Os resultados obtidos das amostras de soros com anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, indicam que os tatus foram expostos a este patógeno em algum momento de suas vidas. Por ser uma análise sorológica, não se pode afirmar que os animais estão infectados, pois também não apresentaram sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose durante a captura e exame clínico.

Comparado aos resultados de outros estudos descritos com a utilização do MAT^{47,64} para análise e prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em tatus, este método demonstrou ser simples e eficaz para a detecção da existência da exposição de tatus a este parasito.

No entanto, a prevalência de 30,20%, apesar de não ser alta, chama atenção para a sua distribuição geográfica de ocorrência em áreas distintas. Considerando apenas indivíduos de tatus-canastras e suas áreas de vida em média de 13 a 18km² (Desbiez et al, dados não publicados), sugere-se que estes patógenos estão presentes na região estudada.

Apesar da prevalência de animais com anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* neste estudo estar abaixo de 50%, outros estudos avaliando a prevalência de *Toxoplasma gondii* em tatus através do método (MAT) realizados na Flórida por Burridge et al⁶⁸ e no Brasil pelos autores Silva et al⁶⁴; e Silva et al⁴⁷, obtiveram índices similares a este estudo.

A toxoplasmose é considerada uma doença comum em diversos mamíferos e praticamente letal em primatas do novo mundo. Segundo os autores Dubey et al⁵⁷, Walsh et al⁶⁰ e Kawazoe et al⁶¹, animais e humanos tornam-se infectados após a ingestão de oocistos presentes no ambiente, por intermédio de comida ou água contaminada com fezes de felídeos ou após a ingestão de cistos teciduais em carnes de animais cronicamente infectados.

Contudo, o uso de suas tocas por mais de 24 espécies de vertebrados, torna o tatu-canastra mais vulnerável pelo contato com diversos patógenos, pois além de sua toca, a areia depositada em frente à entrada é utilizada por diversas espécies de felídeos selvagens principalmente para defecar.²⁹ A exemplo da jaguatirica (*Leopardus pardalis*) descrita por Wang,²⁰⁷ apresenta uma participação ativa no ciclo da toxoplasmose em ambiente selvagem e suas fezes e a possível ingestão de oocistos pelos tatus no ambiente pode favorecer a infecção por *T.gondii*.

Itens alimentares para a maioria dos tatus, como os cupins e formigas são também considerados possíveis vetores mecânicos de patógenos presentes no solo e que podem tornar-se uma via de infecção importante para estas espécies.⁷¹

Em geral, tatus são considerados animais de hábitos solitários, porém espécies como os tatu-peba (*E. sexcinctus*) formam grandes colônias em épocas de reprodução, onde diversas tocas são construídas ao lado uma das outras e compartilhadas inúmeras vezes por diversos indivíduos diferentes.^{20,21} Tal interação, bem como o compartilhamento das tocas de tatus-canastras com outras espécies, corrobora com a hipótese descrita por Kluyster et al²⁰⁸, na qual suas tocas tornam-se potenciais fontes de transmissão destes e demais patógenos.

O tatu-peba (*E. sexcinctus*) é a única espécie dentre os tatus existentes considerados onívoros, ou seja, se alimentam de frutas, sementes, pequenos vertebrados e carniça. O fator de transmissão relacionado culturalmente ao consumo de sua carne crua ou mal cozida⁵⁹, aliado ao índice de prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos também para os tatus-pebas neste estudo, confirmam uma estreita relação dos hábitos alimentares destas espécies como uma potencial fonte de transmissão entre os tatus, outras espécies selvagens, domésticas e até o homem.

Este é o primeiro relato de tatus procedentes do Pantanal sul mato-grossense apresentando anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e também descreve o primeiro relato em espécies como o tatu-canastra (*P. maximus*) e o tatu-de-rabo-mole (*C. unicinctus*), o que indica um importante papel e participação destas espécies de mamíferos na cadeia epidemiológica da toxoplasmose no bioma estudado.

Apesar da existência de uma lei nacional de proibição e de instituições de proteção ao meio ambiente, a captura, manipulação, a caça de tatus selvagens e consequentemente a ingestão de sua carne, é relativamente frequente no Brasil^{183,189}. De acordo com este estudo, hábitos de vida e alimentares aliado a possibilidade deste patógeno estar no ambiente selvagem e em animais nos quais sua carne é apreciada, pode reforçar a hipótese de tornar os seres humanos parte deste ciclo de transmissão, e os tatus potenciais fontes de infecção para este agente quando sua carne é manipulada ou ingerida.

Baseados nos resultados deste estudo, e no ciclo de transmissão da toxoplasmose, sugere-se que o ser humano possa torna-se infectado através da ingestão da carne de tatus, e deve-se considerar o papel destas espécies relevante para a saúde pública como fontes de infecção deste parasito.

Os resultados também sugerem uma dispersão deste parasito na região estudada, e torna-se fundamental que estudos mais aprofundados a respeito do ciclo de transmissão do *Toxoplasma gondii* para outras espécies, bem como para o ser humano, sejam realizados para esclarecer o real papel dos tatus na cadeia epidemiológica no Pantanal.

7.2 Exposição dos tatus a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Algumas espécies domésticas como cães, cavalos, jumentos, gatos²⁰⁹, e espécies selvagens como roedores e gambás (*Didelphis* spp)²¹⁰ já foram descritas como reservatórios para *Leishmania* spp. No Brasil, apenas o tatu-galinha (*D.novemcinctus*) na região norte^{117,211} e oeste do estado de São Paulo¹²¹, foram descritos como potenciais reservatórios.

Os resultados obtidos das amostras analisadas para anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, indicaram uma prevalência de exposição de (9,3%). O baixo índice de prevalência, corrobora com outros estudos descritos por Lainson et al¹¹⁷ e Naiff et al¹¹⁸, significando portanto um dado relevante a ser investigado em tatus e que evidencia, além da exposição, uma possível relação frequente e esperada dos tatus em vida livre com este parasito.

No entanto, dentre as amostras analisadas dos animais que apresentaram anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, apenas é possível afirmar que em algum momento, ocorreu exposição e possível contato prévio dos tatus com o parasito no ambiente onde estão distribuídos.

De acordo com este estudo, os indivíduos que apresentaram anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, são espécies com hábitos diurnos ou crepusculares, como o tatu-galinha (*D. novemcinctus*), tatu-peba (*E. sexcinctus*) e o tatu-de-rabo-mole (*C. uncinatus*), hábito no qual, segundo Rotureau et al⁹⁸ condiz com o comportamento do vetor. Baseado nesta característica, pode-se afirmar, que tais espécies apresentam maior probabilidade de contato com o parasito, devido ao maior período de exposição aos vetores, principalmente quando aliado aos fatores; ocorrência do patógeno na região e competência vetorial.

Por outro lado, os resultados indicando que não houve exposição, apenas para os tatus-canastra, pode-se de certa maneira, sugerir que os hábitos de vida da espécie como período de atividade estritamente noturno e por passar $\frac{3}{4}$ do seu tempo dentro de tocas extensas e na grande maioria das vezes fechadas com areia²⁹, sugere que esta espécie apresente um período menor de exposição aos vetores e conseqüentemente uma menor chance de contato e exposição ao parasito.

Ao contrário do estudo descrito por Richini-Pereira et al¹²¹, todas as amostras analisadas para este estudo através da reação em cadeia de polimerase (PCR), foram negativas para *Leishmania* spp, o que corrobora que este agente não esteja presente ou que os tatus não estejam infectados. Diante destes dados, reforça-se o fato de que nenhum indivíduo quando capturado, apresentou sinais clínicos sugestivos de infecção por *Leishmania* spp.

Por outro lado, os fragmentos de tecido de orelha podem não ser considerados amostras ideais, e dificultar a detecção, caso o animal não esteja apresentando quadro de parasitemia intensa. Mais estudos devem ser realizados comparando diferentes amostras de tecido, e assim, comprovar a sensibilidade do método e o tipo de amostra ideal para detecção de *Leishmania* spp em tatus.

Pode-se valer também, a hipótese sugerida por Diniz et al²¹², na qual descreve que a baixa transmissão de *Leishmania* spp em determinada região, pode ser explicada devido a preferência do vetor por hospedeiros que como os tatus, possuem irrelevante ou nenhum papel como reservatórios em determinados ambientes.

Algumas espécies como o tatu-peba (*E. sexcinctus*) apresentam maior facilidade em frequentar ou adaptar-se a áreas periurbana, se sua participação no ciclo de transmissão da leishmaniose for confirmada, esta proximidade pode torná-lo espécie chave na disseminação deste patógeno aos humanos.

Além da possível participação dos tatus, a investigação de suas tocas revelam que inúmeros mosquitos vetores também as utilizam para se abrigarem e são encontrados ingurgitados de sangue, mas que normalmente são espécies não-antropofílicas, nas quais não se pode associar a Leishmaniose humana.¹¹⁴

A presença do parasito, a doença e seu vetor na região são condizentes com a distribuição geográfica considerada descrita para a prevalência do patógeno. Atualmente, considera-se que ele ocorra em todo o território nacional, abrangendo ainda outros países da América Latina, sendo sua fronteira ao sul na Argentina e ao norte, em Belize.²¹³⁻²¹⁴

Porém, até onde se sabe, não houve relatos de tatus que tenham sido expostos a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, ou que tenham tido uma possível participação no ciclo de transmissão da *Leishmania* spp no Pantanal. No entanto, este estudo também descreve pela primeira vez a exposição de tatus a este parasito no Pantanal.

Ao contrário dos dados obtidos para este estudo, segundo o Ministério da Saúde⁹⁶, dados epidemiológicos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se e abrangendo mais recentemente áreas próximas das que foram analisadas neste estudo, à exemplo de epidemias em humanos ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS) e Campo Grande (MS).

Devido ao baixo “n” amostral e resultado positivo em apenas dois indivíduos para anticorpos anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, o ciclo de transmissão da *Leishmania* spp e sua associação aos tatus como potenciais reservatórios ou fontes de transmissão, ainda são especulativos. Torna-se, portanto, necessário que mais estudos sejam realizados para elucidar o real papel dos tatus na transmissão deste parasito, seja no seu ciclo em ambiente selvagem ou periurbano.

7.3 Exposição dos tatus ao *Trypanosoma cruzi*

O único indivíduo que apresentou anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, sugere que este tenha em algum momento da sua vida sido exposto ao contato com o parasito. Paralelo a este estudo por sorodiagnóstico, análises por meios de cultura NNN (Novy-Mc Neal-Nicole) contendo infusão de triptose de fígado (LIT) com amostras de sangue total dos indivíduos capturados são encaminhadas desde o início do projeto (2011) ao laboratório de Tripanosomatídeos – Labtrip - FioCruz – Rio de Janeiro.

De todas as amostras de diferentes espécies (n=43), até o momento, apenas duas únicas amostras de indivíduos de tatu-galinha (*D. novemcinctus*), apresentaram crescimento e foi isolado o parasito *T. cruzi*. Dado que corrobora com resultado positivo para anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em um dos indivíduos de tatu-galinha analisado.

Apesar de todos os indivíduos demonstrarem boas condições de saúde e ausentes de sinais característicos de doenças quando capturados, o resultado positivo para cultura e isolamento de *T. cruzi*, sugere que o animal pudesse estar em possível parasitemia, e reforça o indício de considerar esta espécie relevante para a manutenção do parasita no ciclo selvagem.

O tatu-galinha (*D. novemcinctus*) foi a primeira espécie selvagem a ser descrita por Chagas⁴⁴ como reservatório para *T. cruzi*. No entanto, o resultado deste estudo envolvendo tatus de vida livre no Pantanal, evidencia a prevalência de anticorpos anti-*Trypanosoma*, o que destaca a possível ocorrência de uma maior susceptibilidade da espécie e/ou exposição ao parasito *T. cruzi*. Tal hipótese condiz com estudos publicados por Orozco et al⁹⁰, na qual cita uma maior prevalência de *T. cruzi* em tatus-galinhas comparado a outras espécies de tatus.

A participação de vetores e sua relação com tatus também é descrita por Lainson et al²¹⁵, que destaca a transmissão de *T. cruzi* associada a abrangência geográfica dos triatomíneos, sendo o ciclo selvagem ocasionado pela presença de triatomíneos em domicílios próximo à florestas, em consequência do rápido desenvolvimento da região.

Segundo Dias et al⁷⁸, cães domésticos são infectados por triatomíneos com cepas selvagens de *T. cruzi*. Diante desta afirmação, o cenário no Pantanal, onde ocorre além da atividade pecuária extensiva e a frequente interação de animais domésticos de criação e/ou de companhia com animais selvagens, aumentam a possibilidade de exposição deste patógenos para ambos os lados, diante do fato dos tatus também serem descritos como potenciais fontes de transmissão e reservatórios.

Segundo Herrera et al²¹⁶, os habitats distintos de algumas espécies como as tocas, associado a preferência do vetor *T. brasiliensis* por tocas de tatus²¹⁷, podem influenciar e indicar fatores ainda desconhecidos, que tornam os tatus espécies envolvidas diretamente no ciclo selvagem para transmissão de *T. cruzi*. O que corrobora com Rosypal et al²¹⁸, no qual destaca que os requisitos para a transmissão da doença de Chagas inclui um vetor reduvido competente, reservatórios selvagens ou domésticos e humano susceptível.

Esta hipótese é reforçada por Sarquis et al²¹⁷, sugerindo que estes vetores tem os tatus como fonte de alimentação de sangue preferencial a outros mamíferos no mesmo habitat, o que considera a participação destas espécies de fundamental importância no ciclo selvagem de *T. cruzi*.

D'Alessandro et al²¹⁹ cita os hábitos característicos dos tatus de se alimentarem de insetos (cupins e formigas) e conseqüentemente a ingestão acidental de barbeiros, como um dos principais fatores que contribuam com que estas espécies tenham uma participação ativa no ciclo de transmissão para *T. cruzi*. Da mesma forma, outras espécies selvagens devem ser também consideradas, especialmente os canídeos, como descrevem Rocha et al²²⁰ a respeito da raposinha do campo (*Lycalopex vetulus*). Além de apresentarem hábitos alimentares insetívoros, esta espécie utiliza tocas de tatu-canastra, e que tais características deste canídeo, as tornam junto aos tatus, potenciais participantes e responsáveis no ciclo de transmissão deste patógeno no ecossistema onde ocorram.

Herrera et al²¹⁶ identificaram outra espécie de *Trypanosoma (evansi)* em um tatu no pantanal, mas até o onde se sabe, este é o primeiro relato da prevalência e isolamento de *T. cruzi* em tatus nesta região.

Apesar de não apresentar registros de casos de Doença de Chagas aguda em humanos (2000 a 2013), segundo dados do Ministério da Saúde⁷⁷, o estado do Mato Grosso do Sul é considerado originalmente uma das regiões para o risco de transmissão vetorial, onde a atuação da vigilância visa detectar a presença e prevenir a formação de colônias domiciliares do vetor.

Devido à baixa prevalência de amostras positivas identificadas neste estudo, não se pode confirmar a real participação dos tatus na transmissão do *T. cruzi*. Segundo Dias et al⁷⁸ diversos mamíferos selvagens estão altamente expostos ao *T. cruzi* e apesar de ter sido descrito por Carlos Chagas desde 1912 como um parasito enzoótico, e seu ciclo associado a participação dos tatus⁸², ainda há diversas questões acerca da ecoepidemiologia do *T. cruzi* em ambientes selvagens.

Conforme descreve Herrera et al²¹⁶, a participação dos tatus neste ciclo torna-se conflituosa e complexa, e levanta questões a respeito da transmissão deste parasito. Porém destaca-se a importância de aprofundar o entendimento do ciclo selvagem para *T. cruzi* e todos componentes deste complexo sistema e os fatores ambientais que levam a casos humanos emergentes.

7.4 Exposição dos tatus ao *Paracoccidioides brasiliensis*

A detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em 100% dos indivíduos analisados, corrobora com o que foi descrito por Bagagli et al⁵⁰, e coloca os tatus como espécies relevantes no estudo do ciclo desta doença nos biomas onde ocorrem.

Muitos autores como Fernandes et al¹³³, Silva-Vergara et al¹³² Richini-Pereira et al¹³⁵ e Bagagli et al⁵⁰ já descreveram o isolamento e/ou detecção de *P. brasiliensis* com prevalência similar a obtida por este estudo (75-100%), porém descritos em tatus selvagens provenientes de áreas endêmicas. Ao contrário destes estudos, este é o primeiro relato de prevalência de 100% *P. brasiliensis* provenientes de uma região do Cerrado do Mato-Grosso-do-Sul, considerada área não-endêmica para este patógeno.

Bagagli e Simões¹³⁶ analisaram amostras de diferentes espécies de tatus como o tatu-de-quinze-quilos (*Dasybus kappleri*), tatu-peba (*E. sexcinctus*), tatu-mulita (*D. hybridus*) e o tatu-de-rabo-mole-grande (*Cabassous tatouay*), porém não obtiveram resultados positivos. Já Corredor et al,¹³⁸ isolaram este agente em tatu-de-rabo-mole (*C. centralis*), mas até então, nenhum estudo havia detectado ou relatado presença de *P. brasiliensis* na espécie tatu-peba (*E. sexcinctus*).

Apenas dois indivíduos não apresentaram amplificação em uma das suas amostras, sendo um fragmento de baço e outro indivíduo em um fragmento de fígado, com exceção destes dois, todas as amostras de inclusive de fragmento de pulmão foram positivas. Este dado condiz com estudo descrito por Bagagli et al⁴⁰, que após infecção (provavelmente por via aérea), o fungo viável produzido pela forma micelial, transforma-se em levedura nos pulmões e se dissemina sistematicamente no tatu hospedeiro, de certa forma similar ao que ocorre em humanos.

De acordo com Silva-Vergara et al¹³² e Bagagli e Simões¹³⁶, as características deste fungo em sobreviver longos períodos em solo, e por ser encontrado viável em tocas de tatus-galinha (*D. novemcinctus*), contribui para o aumento da possibilidade de exposição e inalação pelos tatus. Estes dados também condizem com Silva-Vergara et al¹³² que descrevem que infecção de *P. brasiliensis* em tatus, seja uma estratégia deste fungo em se manter viável no ambiente mais tempo.

No entanto, o isolamento frequente do fungo em linfonodos mesentéricos como também sua detecção nas fezes, sugere que infecções em tatus podem ocorrer por vias alternativas, como pelo trato gastrointestinal.²²¹

As amostras analisadas foram obtidas de animais atropelados, muitas vezes em condições inviáveis de avaliar seu estado de saúde, porém durante as necropsias, nenhum órgão apresentou sinais de infecção ou alterações por *P.brasiliensis*, como relatado por Bagagli et al⁵⁰ e Silva-Vergara et al¹³² e nenhum animal, (considerando as condições em que foram encontrados após o atropelamento), demonstrou sinais que estariam debilitados fisicamente.

Além do ser humano, os tatus também são considerados hospedeiros para *P. brasiliensis* em áreas endêmicas. Apesar da área de estudo não ser considerada área endêmica desta micose sistêmica¹²², dados exibidos nos mapas, demonstram a distância significativa entre os animais positivos em diferentes rodovias onde foram encontrados, o que pode sugerir que este fungo possua uma abrangência geográfica relevante e seja mais comum, (tanto em tatus, quanto no bioma amostrado) do que se conhece sobre ele. Este fato comprova-se diante do fato destas espécies (*D. novemcinctus* e *E. sexcinctus*) apresentarem sua área de vida relativamente pequena, quando comparado à outros mamíferos.³⁰ e que este patógenos não poderia ter sido carregado ou disseminado pelos indivíduos na área estudada.

Segundo Bagagli et al¹³⁰, considera-se também que, o índice de prevalência de infecção por *P.brasiliensis* demonstra ser maior em tatus do que em humanos, (10 casos para cada um milhão de habitantes) e a relação do contato com tatus, (o único animal em que a infecção por *P. brasiliensis* é relatada), é significativamente maior em comunidades humanas que apresentavam alto índice de infecção.⁴⁰

Resultados positivos de animais procedentes de áreas antropizadas e não endêmicas, podem contribuir para elucidar o motivo da ocorrência desta doença em pacientes humanos que não tiveram contato próximo com tatus ou conviveram em áreas rurais. Mais estudos com maior número amostral são necessários para elucidar a real participação dos tatus no ciclo da transmissão e ou como possíveis reservatórios do patógeno *P. brasiliensis*.

7.5 Exposição dos tatus ao *Mycobacterium leprae*

Dados obtidos através das metodologias descritas para detecção de *M. leprae* nos tatus analisados neste estudo, não indicaram a presença de *M. leprae* em nenhum dos indivíduos. Porém dados semelhantes descritos por Walsh et al¹⁶⁴, Kirchheimer e Sanches¹⁶⁸, Kirchheimer et al¹⁶⁰, Dhople et al²²², Howerth et al¹⁶⁹ e Clark et al¹⁶⁶ também não encontraram indícios de *M. leprae* em tatus selvagens.

Estudos realizados por Truman et al⁴², destacam a utilização do gene “RLEP” considerado um dos genes padrão para diagnóstico de *M. leprae*. Seu ciclo de repetição ocorre 20 vezes no genoma, e o descreve como um método com boa sensibilidade. Para garantir que não houve inibição do DNA, foram realizados diversos testes com controle de ampliações e diluições das amostras e assim não comprometer em nenhuma análise os resultados. Algumas amostras demonstraram resultados “positivos” aparentes, mas com baixa confiabilidade. Contudo, para os resultados deste estudo, não se pode afirmar a detecção de *M. leprae*.

Para confirmar a eficácia das análises e reforçar os resultados negativos, foram realizados testes para outros genes alvos como as (VNTR's). Da mesma forma, alguns resultados demonstraram ter amplificado na amostra, mas sem consistência, como por exemplo não ocorrendo em alíquotas duplicadas. Foi realizada uma completa investigação molecular, com até quatro combinações, mas não foi observado claramente a presença de *M. leprae* nas amostras, em que pudesse confirmar a amplificação da sequência e consequentemente resultados positivos para *M. leprae*.

Segundo Pedrini et al²²³, estudos de comparações genômicas mostram que o *M. leprae* apresenta características de um patógeno extremamente especializado e altamente dependente de hospedeiro. Tal característica confere a capacidade de codificar proteínas, sendo 27% destas representando “pseudo-genes”, podendo assim, muitas vezes, demonstrar-se “ausente” em detecções para *M. leprae*, e presentes em outros, como por exemplo o *M. tuberculosis*.

Entre todos animais analisados procedentes do Pantanal ou dos animais mortos atropelados provenientes do Cerrado, nenhum indivíduo apresentou lesões características ou compatíveis com sinais clínicos de hanseníase conforme descrito por Walsh et al¹⁶⁴.

Considerando dados obtidos por Truman et al⁴² nos Estados Unidos, a baixa prevalência em indivíduos analisados em outros estudos^{164,174,181,185,188} sugerem que a presença de *M. leprae* nestes animais esteja relacionada a ocorrência da doença em áreas endêmicas.

Truman et al¹⁷⁶, afirmam que a aparente distribuição geográfica de infecção de tatus por *M. leprae* alimenta continuamente a especulação que a hanseníase nos Estados Unidos tenham ocorrido por mecanismos naturais ou através de seu ambiente.

Alguns autores como Truman et al⁴², Deps et al¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, Frota et al¹⁸⁴ e Kerr et al,¹⁸³ sugerem que o tatu selvagem pode ser considerado um reservatório natural de *M. leprae*, porém segundo Monot et al²⁰⁶, tatus infectados no estado da Lousiana, Estados Unidos, possam ter sido contaminados por fontes humanas, e que condiz com afirmação descrita por Truman et al⁴², que tatus e humanos possuem a mesma estirpe para *M. leprae*.

Outro fato a considerar para este estudo e baseado em Shimit et al¹⁹⁶, não houve evidências que confirmam uma associação entre a hanseníase em seres humanos, e o contato com tatus nesta região, e sim, que a ocorrência deste patógeno ou doenças em seres humanos em determinadas áreas, pode estar relacionado a fatores como níveis socioeconômicos desfavoráveis e condições sanitárias precárias, características estas, que devem ser analisadas em conjunto com estudos futuros de estimativas de riscos.

Embora o Brasil possua uma considerável diversidade de biomas e 10 espécies de tatus, ainda é escasso estudos sobre a hanseníase com animais de vida livre em habitats relevantes para a biodiversidade como o Pantanal ou Cerrado.

Com base nas taxas de prevalência da doença nesta região⁷⁷ e nos resultados negativos para *M. leprae* nos animais amostrados, embora não sejam definitivos, o risco de existir hanseníase em tatus na área de estudo, provavelmente é baixo, pois de acordo com Pedrini et al²²³, resultados semelhantes foram obtidos por estudos realizados também no Pantanal da Nhecolândia.

Os mesmos autores também destacam que o *M. leprae* é um patógeno fundamentalmente antropofílico, e, contudo, os tatus destas regiões amostradas podem apresentar um papel pouco relevante ou nenhum como reservatórios naturais para este agente.

Considera-se também, necessário o desenvolvimento de mais estudos em outros biomas do Brasil e um maior número de amostras de diferentes espécies de tatus, possivelmente relacionando-os à fatores socioeconômicos, histórico de contato prévio destas com pacientes humanos portadores de hanseníase com a investigação do índice de prevalência e/o ocorrência deste patógeno em tatus de vida livre.

Contudo, estudos envolvendo *M. leprae* e tatus selvagens devem ser estimulados para esclarecer e compreender melhor a tipagem molecular do bacilo (padronização de análise como genotipagem para *M. leprae*) em tatus, a sua distribuição global e geográfica, a ocorrência de manifestações clínicas e histopatológicas nestas espécies e o papel delas na transmissão ou como reservatórios deste patógeno.

8 CONCLUSÃO

Como descrito neste estudo e em outros realizados em países do continente Americano, principalmente no Brasil, avaliou-se a prevalência de cinco patógenos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Mycobacterium leprae*) em tatus selvagens para tentar compreender melhor o envolvimento destas espécies na transmissão dos patógenos e sua participação na cadeia epidemiológica de cada doença.

Diante destes dados, podemos afirmar que os tatus foram expostos com exceção do *M. leprae*, aos patógenos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp* e *Paracoccidioides brasiliensis*) e que estes seguramente podem causar morbidade e mortalidade também em outras espécies, sejam elas domésticas, de criação, selvagens e até mesmo o homem. Isto demonstra a importância da realização destes estudos envolvendo os tatus, e o monitoramento da saúde destas espécies em longo prazo.

Avanços tecnológicos em análises laboratoriais, a exemplo das técnicas moleculares, tem se tornado fundamentais para o esclarecimento de questões que envolvam espécies selvagens como possíveis fontes de transmissão de patógenos zoonóticos. A exemplo disso, destaca-se o estudo realizado por Truman et al⁴², que descreve a mesma estirpe de *M.leprae* encontrada em pacientes com hanseníases e tatus procedentes de uma região em comum. Contudo, resultados de estudos moleculares nem sempre são definitivos, mas parte-se do princípio em mostrar consistência (repetições em análises) e que aliado aos achados clínicos e epidemiológicos, auxiliam a desenvolver indicadores e um argumento convincente da presença de determinado patógeno ou a participação das espécies no seu ciclo de transmissão.

Por outro lado, técnicas de diagnóstico como as análises sorológicas, tem desempenhado uma importante contribuição, principalmente no que diz respeito ao indicativo de anticorpos do indivíduo previamente exposto aos patógeno ao longo de sua vida, o que traz também como informação, a presença daquele agente no ambiente e a subjeção de que a população estudada e/ou outras espécies que compartilham este hábitat, também estejam ou corram o risco de serem expostas.

A desvantagem é que estas técnicas não avaliam ou indicam a presença do patógeno no início da infecção e podem sofrer influências de reações cruzadas entre as espécies ou serem inespecíficas, quando utilizado padrões humanos ou de animais domésticos para sua avaliação. Para a interpretação destas análises, sugere-se ter cautela na leitura de resultados e diluições para notas de cortes, quando extrapolado principalmente para animais selvagens.

No entanto, na grande maioria das vezes, estes métodos apresentam maior eficácia e contribuição diagnóstica, quando associados às análises complementares e outros exames como hemogramas, bioquímicos, técnicas moleculares, e exames clínicos minuciosos. Porém são necessários estudos que busquem elucidar e padronizar técnicas de diagnóstico laboratorial específicos para as espécies selvagens.

Características anatômicas, fisiológicas e ecológicas peculiares dos tatus, os tornaram uns dos poucos mamíferos, (além dos seres humanos) a apresentarem uma relação com patógenos que aumentam a possibilidade de se tornarem potenciais fontes de transmissão ou reservatórios.

Com isso, há décadas, muitos autores e estudos descrevem que inúmeros patógenos que produzem importantes doenças zoonóticas, tem sido frequentemente associado aos tatus e estes atuando como reservatórios. Entretanto, percebe-se que a maioria destes estudos, descrevem a utilização destas espécies principalmente como modelos de infecção experimental, ou animais capturados em áreas com intensa atividade antrópica e degradação ou principalmente durante investigação de doenças em áreas consideradas endêmicas.

Baseado em Roque et al²²⁴, um animal selvagem pode ser “incriminado” como reservatório, se participa ativamente na manutenção da população dos patógenos na natureza, e se houver participação de vetor, a observação deste se alimentando de sangue do hospedeiro, deve ser demonstrado. Porém, talvez o termo “hospedeiros acidentais” sugerido por Bagagli et al⁴⁰ aos tatus, seja mais apropriado.

Em se tratando de patógenos principalmente zoonóticos, sugere-se também a hipótese de que a via de transmissão possa ter ocorrido de maneira inversa, onde seres humanos em uma estreita relação de contato com este ambiente selvagem, esteja carreando estes agentes para espécies, que como os tatus, acabam sendo mais vulneráveis a patógenos humanos, as chamadas antropozoonoses.

Poucos estudos foram realizados documentando a investigação da prevalência de patógenos infecciosos em tatus em vida livre em áreas preservadas. Este tipo de análise, pode contribuir com estudos e geração de dados sobre indicação e prevenção de medidas de controle, distribuição geográfica de patógenos, mapeamento de área de risco e condições de saúde daquele hábitat, antes da ocupação ou degradação por ações antrópicas.

Um fato relevante a se considerar é que os tatus de maneira geral são espécies apreciadas para o consumo de sua carne e culturalmente ingerida na América Latina, (Bagagli et al⁴⁰ e Schmitt et al¹⁹⁶). Este fator cultural, contribui e potencializa a disseminação de patógenos entre o meio selvagem e periurbano, demonstrando claramente neste aspecto, que estas espécies podem (mais uma vez, através de ações antrópicas), se tornarem um fator de risco de transmissão de patógenos de caráter zoonótico.

Outro fato, é que de acordo com Tercarioli et al²²⁵, acredita-se que, o clima do bioma Pantanal possa influenciar a manutenção, disseminação e relação entre patógenos e seus hospedeiros o que corrobora com estudos publicados por Desbiez e Kluyber²⁹, no qual descrevem que a temperatura das tocas de tatus-canastra mantem-se estáveis durante o ano (24-26°C) independente da temperatura externa, e acredita-se que o mesmo ocorra para a umidade, o que transformaria estes ambientes propícios para manutenção, foco de reprodução e disseminação de patógenos quando compartilhada por entre as espécies.

Diante disso, e conforme descrito por alguns autores, o fungo como o *Paracoccidioides brasiliensis*, o protozoário *Toxoplasma gondii* e o bacilo *M.leprae*, podem estar presentes e sobreviverem por muito tempo no ambiente.^{42,146,226} No entanto, aliado a esta característica, reforça-se o conceito de medicina da conservação ou “One Health”, onde os tatus acabam tornando-se também, espécies modelos ideais para o entendimento dos elos da interação dos patógenos entre animal-homem-meio ambiente.

Não se pode desconsiderar que diversos vetores também apresentam a capacidade de invadir e se adaptarem a novos habitats após desflorestamento e estabilização de novas comunidades humanas. Sabe-se também que vetores se concentram em áreas superpovoadas e há um aumento da susceptibilidade e risco de transmissão de patógenos em regiões com precárias condições de higiene e abundante criação de animais domésticos.⁹⁷

Nos biomas Pantanal e Cerrado, não foram descritos surtos epidêmicos ou consideradas áreas endêmicas para doenças zoonóticas em seres humanos, o que pudesse sugerir também um baixo ou nenhum potencial da relação dos tatus com seres humanos ou de sua atuação como possíveis fontes de transmissão para estas zoonoses.

Todos os tatus capturados e examinados no Pantanal, bem como os indivíduos amostrados atropelados no Cerrado, não apresentaram sinais característicos de doenças, que de acordo com Bagagli et al¹³⁰, descreve que a resposta celular e o sistema imunológico dos tatus é fraco, sendo insuficiente causar doença ou sinais clínicos conforme observados em humanos.

Devido à dificuldade em observar a ocorrência ou índice significativo de mortalidade de tatus em vida livre, pois sua característica de permanecer em tocas associados a vegetação densa, não caberia aos tatus serem considerados espécies sentinelas para detecção de doenças ou surtos, mas sim de que estas espécies possam atuar como indicadores da saúde de um ambiente, pois seus aspectos ecológicos e fisiológicos, as tornam espécies ideais para estudos como alternativa de baixo custo, eficaz e representativa para a investigação e monitoramento da saúde (em áreas endêmicas ou não) em um ecossistema, com envolvimento ou não de ações antrópicas.

Tal conceito, diminuiria a “responsabilidade” e estigma atribuído aos tatus como reservatórios de patógenos zoonóticos e passariam assim, como os seres humanos serem consideradas “vítimas”⁴⁰, de patógenos zoonóticos e ao mesmo tempo espécies chaves para programas de educação e ações de conservação e saúde da fauna.

A relação entre estes fatores ainda não foi estudada em detalhes, ou investigada em monitoramentos em longo prazo na natureza. Porém, o programa de avaliação da saúde de tatus do Pantanal realizado pela equipe do Projeto Tatu-Canastra, monitora desde 2010 através de capturas e análise das amostras biológicas de indivíduos, a saúde destas populações. E através destes dados obtidos, será possível realizar um monitoramento em detalhes em longo prazo e identificar se a exposição ou infecção por tais patógenos, podem causar diminuição ou levar espécies ameaçadas como o tatu-canastra (*P. maximus*) à extinção nestes biomas.

Independente dos resultados, ações e medidas de controles preventivos de longo prazo, possam ser tomados de imediato por iniciativas públicas e/ou privadas, contribuindo com a diminuição ou eliminação de ocorrência da disseminação de patógenos ou ocasionamento de surtos em determinadas áreas que envolvam o contato prévio com tatus e ou outras espécies selvagens.

Como exemplo, ações de educação ambiental sobre proibição de caça e consumo de carne de animais selvagens previstos na lei de crimes ambientais, orientação em postos de saúde e hospitais, principalmente para trabalhadores e moradores de áreas rurais e o impedimento de degradação de áreas de preservação, evitando o contato ou aproximação com animais selvagens, patógenos e seus vetores com humanos.

9 EM SÍNTESE

Os tatus foram expostos aos patógenos *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmani infantum chagasi* e ao *Paracoccidioides brasiliensis*.

a) Este é o primeiro relato de exposição de tatus ao *Toxoplasma gondii* no Pantanal sul-mato-grossense. E o primeiro relato de exposição a este patógeno para as espécies tatu-canastra (*P. maximus*) e o tatu-de-rabo-mole (*C. unicinctus*);

b) Este é o primeiro relato de exposição de tatus a *Leishmania infantum chagasi* no Pantanal. E o primeiro relato de exposição a este patógeno para as espécies de tatu-peba (*E. sexcinctus*) e o tatu-de-rabo-mole (*C. unicinctus*);

c) Este é o primeiro relato de exposição de um tatu-galinha (*D. novemcinctus*) ao *Trypanosoma cruzi* no Pantanal;

d) Este é o primeiro relato de detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus no Cerrado do estado do Mato-Grosso-do-Sul. E o primeiro relato para este patógeno na espécie tatu-peba (*E. sexcinctus*);

e) Nenhum indivíduo foi exposto ao *Mycobacterium leprae* em ambos os biomas, Cerrado e Pantanal no estado do Mato-Grosso-do-Sul. O que no entanto, pode-se sugerir que em ambas as áreas estudadas, não ocorra este patógeno, apesar do estado do Mato-Grosso-do-Sul ser considerado a quarta maior prevalência de Hanseníase no país;

f) As condições ambientais das tocas de tatus, principalmente de tatu-canastra (*P. maximus*), contribuem na manutenção, crescimento e reprodução de patógenos como *Toxoplasma gondii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Mycobacterium leprae* e servem de abrigo para vetores de patógenos como o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp, e através destas condições, favorecem sua dispersão natural, nos animais (vertebrados ou invertebrados e próprios vetores), que compartilham estas tocas no ecossistema em que habitam;

g) Não foi possível afirmar se há uma relação entre o aumento da prevalência de patógenos com a ocorrência de áreas degradadas ou preservadas. Mais estudos em longo prazo são necessários para comparar esta relação;

h) Os tatus podem ser fontes de transmissão para patógenos zoonóticos, apenas quando considerada convivência próxima (animal mantido irregularmente em cativeiro, ou domicílio), manipulação ou ingestão de sua carne;

i) É importante que mais estudos sejam realizados para afirmar se tais patógenos, principalmente os zoonóticos, estão envolvidos na cadeia epidemiológica de transmissão, ou mantidos pelos tatus atuando como reservatórios, e assim potencialmente transmitidos a outras espécies, inclusive o homem;

j) Devido a suas características fisiológicas, ampla distribuição geográfica, relativo contato próximo a áreas antropizadas e sua principal característica de compartilhar suas tocas com outras espécies, tornam os tatus, espécies mais susceptíveis e devem rigorosamente serem investigadas, na dinâmica da evolução de patógenos relevantes para a saúde pública e principalmente no que se diz respeito às zoonoses;

k) Investigações utilizando tatus como indicadores da saúde ambiental, e a obtenção de dados sobre exposições prévias de tatus à agentes zoonóticos patogênicos, podem indicar de maneira eficaz; 1) Prevalência e/ou ocorrência de patógenos principalmente os zoonóticos, 2) Análise e mapeamento de áreas de risco (surto epidêmicos), 3) Contribuir para o desenvolvimento de medidas de controle e ações preventivas, 4) Monitoramento de doenças zoonóticas, e ações de estratégia de baixo custo não só em meio selvagem, como também em áreas onde haja desenvolvimento humano;

l) Agências governamentais do meio ambiente e de saúde, devem levar em consideração a exposição de tatus aos patógenos zoonóticos. Discussões entre pesquisadores e estas agências devem ser tomadas para que o desenvolvimento e planejamento de iniciativas de programas de educação sejam elaborados como medidas preventivas e de conservação em áreas eleitas como prioritárias.

REFERÊNCIAS

1. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006 Sep;22(9):439-45.
2. Soulé M. Foreword: giant moths and doing no harm. In: Aguirre A, Osfeld RS, Tabor GM, House C, editors. *Conservation medicine ecological health in practice.* New York: Oxford University Press; 2002. p.VII-IX.
3. Tabor GM. Defining conservation medicine. In: Aguirre AA, Osfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editors. *Conservation medicine ecological health in practice.* New York: Oxford University Press; 2002. p.8-16.
4. Friend, M. *Disease emergence and resurgence: The wildlife-human connection:* Reston: U.S. Geological Survey; 2006. 400 p.
5. Roque AL, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014 Aug 29;3(3):251-62.
6. Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mörner T, Tate CM. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Technol.* 2002;23(2):497–511.
7. Koch M. Wildlife, people, and development. *Trop Anim Heal Prod.* 1996;28:68–80.

8. Ostfeld RS, Meffe GK, Pearl MC. Conservation medicine: the birth of another crisis discipline. In: Aguirre AA, Ostfeld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC, editors. Conservation medicine ecological health in practice. New York: Oxford University Press; 2002. p. 407.
9. Rabinowitz PM, Scotch LM, Conti LA. Animal sentinels: using comparative medicine to move beyond the laboratory . *ILAR J.* 2010;51(3):262–7.
10. Vizcaíno FS, Loughry WJ. Xenarthran biology: past, present, and future. In: Vizcaíno, SF and Loughry WF, editors. The biology of the xenarthra. Gainesville University Press of 2008. p. 1–7.
11. Patterson B, Pascual R. The fossil mammal fauna of South America. In: Keast A, Erk FC, Glass B, editors. Evolution, mammals and southern continents. Albany: State University of New York Press; 1972. p. 247–309.
12. Lessa EP, Valkenburg V, Fariña RA. Testing hypotheses of differential mammalian extinctions subsequent to the great american biotic interchange. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* . 1997;135:157–62.
13. Delsuc F, Douzery JPE. Recent advances and future prospects in xenarthran molecular phylogenetics. In: Vizcaíno, SF and Loughry WF, editors. The biology of the xenarthra. Flórida: University Press of Florida; 2008. p. 11–2.
14. Aguiar JM, Fonseca GAB. conservation status of the xenarthra. In: Vizcaíno, SF and Loughry WF, editors. The biology of the xenarthras. Flórida: University Press of Florida; 2008. p. 215–32.

15. Mace G.M. and Balmford A. Patterns and processes in contemporary mammalian extinction. In: Entwistle A and Dunstone N editors. *Priorities for conservation of mammalian diversity: has the panda had its day?*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
16. Wetzel RM. Systematics, distribution, ecology and conservation of South American Edentates. In: Mares MA, Genoway HH, editors. *Mammalian biology in South America*. Pittsburgh: The University of Pittsburgh; 1982. p. 345–75.
17. Vizcaíno SF. Identificación específica de las “mulitas” género *Dasypus*. (Mammalia, Dasypodidae) del noroeste argentino. *Mastozool Neotrop.* 1995; 2(1):5-13.
18. Anderson RP and Handley Jr, CO. A new species of three-toed sloth (Mammalia: Xenarthra) from Panamá, with a review of the genus *Bradypus*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 2001; 114:1–33.
19. Gardner AL. Order xenarthra. In: Wilson DE and Reeder DM, editors. *Mammal species of the world, Second Edition*. Washington: Smithsonian Institution Press. 1993. p. 63-68.
20. Tomas WM, Campos Z, Desbiez, ALJ, Kluyber D, Borges, PAL and Mourão G. Mating behavior of the six-banded armadillo *euphractus sexcinctus* in the Pantanal wetland, Brazil. *Edentata*. 2013; 14(1):87-89.
21. Medri IM. Ordem Cingulata. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima Borges PA, editores. *Mamíferos do Brasil 2ªed.* Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2011. p.75–90.

22. Valdes E, Soto AB. Feeding and Nutrition of Anteaters. In: Miller RE, Fowler ME, editors. Fowlwer's zoo and wild animal medicine. St. Louis: Elsevier Saunders; 2012. p. 378–83.
23. Gray JE. On the natural arrangement of vertebrate animals. London M. Reposit.1821; 15(1): 296-310.
24. Wilson DE, Reeder DM. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2005. 2142 p.
25. Messias-Costa A, Beresca AM, Cassaro K, Diniz L de SM, Esbérard C. Order xenarthra (edentata) (sloths, armadillos, anteaters). In: Fowler ME, Cubas ZS, editors. Biology, medicine and surgery of South America wild animals. Ames: Iowa State University Press; 2001. p. 238–55.
26. Carter TS. The burrows of giant armadillo, *Priodontes maximus* (Edentata: Dasypodidae). Saugtierkindliche Mitteilungen. 1983; 31(1):47–53.
27. Emmons LH. Neotropical rainforest mammals: a field guide. 2nd ed. Chicago: University of Chicago Press; 1990. 281 p.
28. Mcdonough CM, Loughry WJ. Armadillos. In: Macdonald D, editor. The new encyclopedia of mammals. Oxford: Oxford University Press; 2001. p. 796–9.
29. Desbiez, ALJ, Kluyber D. The role of giant armadillos (*Priodontes maximus*) as physical ecosystem engineers. Biotropica. 2013; 45: 537–40.

30. Mcdonough CM, Loughry WJ. Armadillos (Dasypodidae). In: Hutchins M, editor. Grzimek's animal life encyclopedia. Farmington Hill: Gale Group; 2003. p.181–92.
31. Grassé PP. Order des Edentes (Edentata Cuvier, 1798; Edentati Vicq D'Azyr, 1792; Bruta Linné, 1758 p.p), formes actuelles. In: Grassé PP, editor. Traité de zoologie, anatomie systematique, biologie, Mammiferes. Paris: Masson et Cie. Editeurs, Libraries de L'academie de Medicine; 1955. p. 1182–246.
32. Boily P. Individual variation in metabolic traits of wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and the aerobic capacity model for the evolution of endothermy. *J Exp Biol* . 2002;205(32):7–14.
33. McNab BK. Energetics and the Limits to a Temperate Distribution in Armadillos. *J Mammal*. 1980;61(4):606–27.
34. McNab BK. Energetics, population biology, and distribution of xenarthrans, living and extinct. In: Montgomery GG. editor. The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas. Washington. Smithsonian Institution Press. 1985. p. 219-232
35. Abba AM. Ecology and Conservation of Three species of armadillos in the Pampas region, Argentina. In: Vizcaíno, SF and Loughry WF, editors. The Biology of the Xenarthras. Flórida: University Press of Florida; 2008. p. 300–5.
36. Taber FW. Contribution on the life history and ecology of the nine-banded armadillo. *J Mammal*. 1945;26:211–26.

37. Talmage R V, Buchanan GD. The armadillo *Dasypus novemcinctus*—a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. Rice Inst Pam Houst. 1954;41:1–135.
38. Storrs EE, Walsh GP, Burchfield HP, Binford CH. Leprosy in the armadillo: New model for biomedical research. Science. 1974;183(4127):851–2.
39. Ulrich M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasypus sabanicola*. Clin Exp Immunol. 1976;25:170–6.
40. Bagagli E, Bosco SM. Armadillos and dimorphic pathogenic fungi. In: Vizcaíno SF, Loughry WJ, editors. The Biology of Xenarthra. Flórida: University Press of Florida; 2008. p. 103–10.
41. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases commom to man and animals. 3rd ed. Washington Panamerican Health Organization; 2003.
42. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. N Engl J Med. 2011;364(17):1626–33.
43. Richini-Pereira VB, Bosco SM, Theodoro RC, Barrozo L, Pedrini SC, Rosa PS, et al. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. BMC Res Notes. 2009;2:228.

44. Chagas C. Sobre un trypanosomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. 1811: possibilidade do ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Bras Med. 1912; 305-306.
45. Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73(2):239-42 .
46. Morocoima A, Carrasco HJ, Boadas J, Chique JD, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi* III from armadillos (*Dasypus novemcinctus novemcinctus*) from Northeastern Venezuela and its biological behavior in murine model. Risk of emergency of Chagas' disease. Exp Parasitol. 2012;132(3):341–7.
47. Silva RC, Zetun CB, Bosco SMG, Bagagli E, Rosa PS, Langoni H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira spp.* infection in free-ranging armadillos. Vet Parasitol. 2008;157:291–3.
48. Kin MS, Fort M, Giménez HD, Casanave EB. First record of *Toxoplasma gondii* in *Chaetophractus villosus* in Argentina. Acta Parasitol. 2014;60(1):134–7.
49. Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1998-1999;144(3):131-3.
50. Bagagli E, Franco M, Bosco Sde M, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. Med Mycol. 2003 Jun;41(3):217-23

51. Armadillo may aid leprosy research. HSMHA Health Rep. 1971 Nov;86(11):963-5.
52. Balamayooran G, Pena M, Sharma R, Truman RW. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. Clin Dermatol. 2015 Jan-Feb;33(1):108-15
53. Webster JP. Review of "Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)" by J.P. Dubey. Parasit and Vectors. 2010;3:112.
54. da Silva AV, de Moraes Gimenes Bosco S, Langoni H, Bagagli E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. Vet Parasitol. 2006 Jan 15;135(1):81-3
55. Sobral CA, Amendoeira MR, Teva A, Patel BN, Klein CH. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jan;72(1):37-41.
56. de Quadros RM, da Rocha GC, Romagna G, de Oliveira JP, Ribeiro DM, Marques SM. *Toxoplasma gondii* seropositivity and risk factors in pregnant women followed up by the Family Health Strategy. Rev Soc Bras Med Trop. 2015 May-Jun;48(3):338-42
57. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press; 1988. 220 p.

58. de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):326-9.
59. Sacks JJ, Delgado DG, Lobel HO, Parker RL. Toxoplasmosis infection associated with eating undercooked venison. *Am J Epidemiol*. 1983;118(6):832-8.
60. Walsh CP, Hammond SE, Zajac AM, Lindsay DS. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. *J Eukaryot Microbiol*. 1999;46(5):73S-74S.
61. Kawazoe U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM, editores. *Parasitologia Humana*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2000. p. 147–56.
62. Krick JA, Remington JS. Toxoplasmosis in the adult--an overview. *N Engl J Med*. 1978 Mar 9;298(10):550-3.
63. Sogorb F, Jamra LF, Guimaraes EC. Toxoplasmosis in animals of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1977;19(3):191–4.
64. Silva AV, Bosco MG, Langoni H, Bagagli E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasyurus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Vet Parasitol*. 2006;135(1):81–3.

65. Cañón-Franco WA, Araújo FA, López-Orozco N, Jardim MM, Keid LB, Dalla-Rosa C, et al. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Vet Parasitol.* 2013 Nov 8;197(3-4):462-9.
66. Forrester DJ. Armadillos. in: *Parasites and diseases of wild mammals in Florida* In: Forrester DJ, editor. Gainesville: University Press of Florida; 1992. p. 34–42.
67. Loughry WL, McDonough CM. Protozoans. In: Press O, editor. *The nine banded armadillo: a natural history.* Norman: University of Oklahoma Press; 2008.
68. Burrige MJ, Bigler WJ, Forrester DJ, Hennemann JM. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. *J Am Vet Assoc.* 1979;175(9):964–7.
69. Superina M, Garner MM, Aguilar RF. Health evaluation of free-ranging and captive pichis (*Zaedyus pichiy*) Mammalia, Dasypodidae), in Mendoza Province, Argentina. *J Wildlife Dis.* 2009;45(1):174–83.
70. Deem SL, Noss AJ, Fiorello C V, Manharth AL, Robbins RG, Karesh WB. Health assessment of free-ranging three-banded (*Tolypeutes matacus*) and nine-banded (*Dasypus novemcinctus*) armadillos in the Gran Chaco, Bolivia. *J Zoo Wildl Med.* 2009;40(2):245–56.
71. da Silva RC, Zetun CB, Bosco Sde M, Bagagli E, Rosa PS, Langoni H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. *Vet Parasitol.* 2008 Nov 7;157(3-4):291-3.

72. Vitaliano SN, Soares HS, Minervino AH, Santos AL, Werther K, Marvulo MF, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. *Int Assoc Parasitol Parasites Wildl.* 2014;3(3):276–83.

73. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. *Biomedica.*

74. Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ Br Med J.* 2003;326(7404):1444–8.

75. Coura JR. The discovery of chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013 Jul-Aug;46(4):389-90.

76. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiol.* 2015; 46 (21): 1-9.

77. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

78. Dias JC. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, editores. *Epidemiologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 48–74.

79. Fernandes O, Mangia RH, Lisboa C V, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 1999;118 Pt 2:161–6.
80. Coura JR. The discovery of Chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(4), 389-390.
81. Paige CF, Scholl DT, Truman RW. Prevalence and incidence density of *Mycobacterium leprae* and *Trypanosoma cruzi* infections within a population of wild nine-banded armadillos. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(5):528-32
82. Jansen AM, Roque ALR. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: Telleria J, Tibayrenc M editors. *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*. London: Elsevier; 2010; p. 249-64.
83. Sherlock IA, Almeida SP. Diferença de susceptibilidade à infecção com *T. cruzi* entre espécie de triatomíneos alimentados em cão, tatu e camundongo infectados. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1973;7(2):87–98.
84. Barrett TV, Naiff RD. Trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum* from armadillos (*Xenarthra*: *Dasypodidae*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1990; 85(4): 407-411.
85. Yaeger RG. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in armadillos collected at a site near New Orleans, Louisiana. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 38(2):323–6.

86. Barr SC, Brown CC, Dennis VA, Klei TR. The lesions and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums and armadillos from southern Louisiana. *J Parasitol.* 1991;77(4):624–7.
87. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005;35(2):225–33.
88. Fujita O, Sanabria L, Inchausti A, De Arias AR, Tomizawa Y, Oku Y. Animal reservoirs for *Trypanosoma cruzi* infection in an endemic area in Paraguay. *J Vet Med Sci.* 1994;56(2):305–8.
89. Deem SL, Noss AJ, Fiorello C V, Manharth AL, Robbins RG, Karesh WB. Health assesment of free-ranging three-banded (*Tolypeutes matacus*) and nine-banded (*Dasybus novemcinctus*) armadillos in the Gran Chaco, Bolivia. *J Zoo Wildl Med.* 2009;40(2):245–56.
90. Orozco MM, Enriquez GF, Alvarado-Otegui JA, Cardinal M V, Schijman AG, Kitron U, et al. New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(5):872–82.
91. Alvarado-Otegui JA, Ceballos LA, Orozco MM, Enriquez GF, Cardinal M V, Cura C, et al. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta Trop.* 2012;124(1):79–86.

92. Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PSD, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;79(5):742–9.
93. Antunes JM, Demoner LC, Martins IV, Zanini MS, Deps P. *Trypanosoma cruzi* infection in nine-banded armadillos from Espírito Santo state, Brazil. *Rev Cient Eletr Med Veter.* Ano XI. 2013;11(20): p.1.
94. Cominetti M, Andreotti R. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(5):576–81.
95. Herrera HM, Davila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitology.* 2004;125:263–75.
96. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2007. p.15-17.
97. Membrive NA, Rodrigues G, Gualda KP, Bernal MV, Oliveira DM, Lonardoni MV, et al. Environmental and animal characteristics as factors associated with american cutaneous leishmaniasis in rural locations with presence of dogs, Brazil. *PLoS One.* 2012;7(11):e47050.
98. Rotureau B. Ecology of *Leishmania* species in the Guianan Ecoregion Complex. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(1):81–96.

99. Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AC, Bueno R, Guerra RM, Abreu-Silva AL, et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Dev Ctries*. 2008 Feb 1;2(1):24-33.
100. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.
101. Bonates A. Leishmaniose visceral (calazar). *Vet News*. 2003;10(61):4-5.
102. Solano-Gallego L. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009;165:1-18.
103. Albuquerque AR, Aragão FR, Faustino MAG, Gomes YM, Lira RA, Nakasawa M, et al. Aspectos clínicos de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* na Região Metropolitana do Recife. *Clínica Veterinária*. 2007;71:78-80.
104. Brito FLC, Alves LC, Maia FCL, Santos ESC, Laus JL, Meunier IMJ.. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2006;58(5):768-75.
105. Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, Carlus M, Fontbonne A. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *J Small Anim Pract*. 2012 Jul;53(7):419-22.

106. Oliveira VV. Avaliação das lesões inflamatórias e da carga parasitária em órgãos do sistema genital masculino e feminino de cães com infecção natural por *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908). (dissertação) Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2013.

107. Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol.* 2005 Sep;42(5):650-8

108. Dubey JP, Rosypal AC, Pierce V, Scheinberg SN, Lindsay DS. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Oct 15;227(8):1266-9.

109. Barretto MP. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do estado de São Paulo (Ditera: Psychodidae). (Tese de livre docência), São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;1943.

110. Forattini OP. Entomologia médica: Psychodidae, Phlebotominae, leishmanioses, bartonelose. São Paulo: Edgard Blücher; 1973.

111. Araújo Filho NA. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Ilha Grande.[tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1979.

112. Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Barbosa AF, Andrade CA. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz e Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81:431-8.

113. Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready PD, Azevedo ACR, Papavero N. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89:202.
114. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:937–54.
115. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley & Wilson's microbiology and microbial infectious diseases. 9th Ed. London: Arnold; 1998. p. 241-66.
116. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amaz Saúde. 2010;1:13–32.
117. Lainson R, Shaw JJ, Ward RD, Ready PD, Naiff RD. Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73(2):239-42.
118. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, Mem do Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86 (3): 317-21.

119. Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles GA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of “pian-bois.” *Trans R Soc Trop Med.* 1981;75:530–6.
120. Lainson R, Shaw JJ, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVII Enzymic characterization of a *Leishmania* from the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Edentata), from Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76:810–1.
121. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania spp.* in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014;16:20–7.
122. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Proposta de vigilância Epidemiológica da Paracoccidiodomicose. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
123. Costa PF, Fernandes GF, dos Santos PO, Amaral CC, Camargo ZP. Characteristics of environmental *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia.* 2010 Jan;169(1):37-46.
124. Nascimento É, Martinez R, Rodrigues Lopes A, de Souza Bernardes LA, Pomponio Barco C, Goldman MHS et al. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42(11):5007-5014.

125. Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 131- 50.
126. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias. 5ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
127. Costa EO, Diniz LSM, Fava-Netto C. The prevalence of positive intradermal reactions to paracoccidioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. *Vet Res Commun.* 1995;19:127–30.
128. Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol.* 1995 Jan-Feb;33(1):39-42.
129. Ono AM. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol.* 2001;39:277–82.
130. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Apr;58(4):505-12.
131. Naiff RD, Ferreira LGL, Barret TV, Naiff, MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1986; 28:19-27.

132. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MH, Maffei CM, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol.* 2000;38(3):193–9.
133. Fernandes GF, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol.* 2004;42(4):363–8.
134. Richini-Pereira VB, Bosco SM, Theodoro RC, Barrozo L, Pedrini SC, Rosa PS, et al. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC Res Notes.* 2009;2:228.
135. Richini-Pereira VB, Bosco Sde M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol.* 2008;46(1):35–40.
136. Bagagli E, Simões LB. New strategies and opportunities for the ecoepidemiological study of *Paracoccidioides brasiliensis*: sentinel animal, molecular biology and geoprocessing. *Rev Instuto Med Trop São Paulo.* 2005;47(14):16.
137. Corredor GG, Castano JH, Peralta LA, Diez S, Arango M, McEwen J, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 1999;16(4):216–20.

138. Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol.* 2005;43(3):275–80.
139. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SD, Macoris SA da G, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007;7(1):92.
140. Arantes TD, Theodoro RC, Da Graca Macoris SA, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides spp.* in environmental aerosol samples. *Med Mycol.* 2013;51(1):83–92.
141. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Plano Integrado de Ações Estratégicas de Eliminação da Hanseníase, Esquistossomose e Oncocercose como Problema de Saúde Pública, Tracoma como causa de Cegueira e Controle das Geohelmintíases. Brasília. Ministério da Saúde; 2013.
142. Araújo, MG. Hanseníase no Brasil. *Rev da Soc Bras de Med Trop.* 2003; 36(3), 373-382.
143. Antunes JM, Zanini MS, Demoner LC, Deps PD. Diagnóstico de *Mycobacterium leprae* em tatus (*Dasypus novemcinctus*) e sua correlação com a proximidade das fontes de água do distrito de Rive, Espírito Santo- Brasil. *Vet e Zootec.* 2009;16(4):642–9.

144. Nsagha DS, Bamgboye EA, Assob JC, Njunda AL, Kamga HL, Tabah EN, et al. Elimination of leprosy as a public health problem by 2000 AD: an epidemiological perspective. *Pan Afr Med J.* 2011;9(1).
145. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol.* 2008;8(5):627–31.
146. Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr.* 1998;71(1):61–7.
147. Kazda J. Occurrence of non-cultivable acid-fast bacilli in the environment and their relationship to *M. leprae*. *Lepr Rev.* 1981;52:85–91.
148. Blake L, West B, Lary C, Fowler M, Todd J. Earthworms near leprosy patients' homes are negative for acid-fast bacilli by fite stain, providing no link between leprosy armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and human leprosy. *Am Int J.* 1989;17(1):105–10.
149. Meyers WM, Gormus BJ, Walsh GP. Nonhuman sources of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1992; 60: 477–480.
150. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *J Leukoc Biol.* 1986;40(5):645–56.

151. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lep*. 1971; 39:693-702.

152. Kirchheimer WF, Storrs EE, Binford CH. Attempts to establish the armadillo as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post mortem findings in lepromatoid leprosy in the armadillo. *Int J Lep*. 1972; 40: 229-42.

153. Job CK, Sanchez RM, McCormick GT, Hastings RC. First lesion in experimental armadillo leprosy. *Indian J Lepr*. 1985;57(1):71-7.

154. Binford CH, Storrs EE, Walsh GP. Disseminated infection in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) resulting from inoculation with *M. leprae*. Observations made on 15 animals studied at autopsy . Vol. 44 , *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1976; 44:80-3.

155. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):338-81.

156. Hobbs HE, Harman DJ, Rees JW, McDougall AC. Ocular histopathology in animals experimentally infected with *Mycobacterium leprae* and *M. lepraemurium*. 1. *Mycobacterium leprae* and *M. lepraemurium* infections in the mouse. 2. *Mycobacterium leprae* infections in the 9-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* L.). *Br J Ophthalmol*. 1978 Aug;62(8):516-24

157. Malaty R, Beuerman RW, Pedroza L. Ocular leprosy in nine-banded armadillos following intrastromal inoculation. *Int J Lepr Other Mycobact* 1990;58(3):554-9.

158. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971 Jul-Sep;39(3):693-702.
159. Walsh GP, Storrs EE, Burchfield HP, Cotrell EH, Vidrine MF, Binford CH. Leprosy-like disease occurring naturally in armadillos. *J Reticuloendothel Soc.* 1975;18(6):347–51.
160. Kirchheimer WF. Examination of north american armadillos for mycobacteriosis – a further report. *Indian J Lepr.* 1979;51:60–4.
161. Smith JH, Folse DS, Long EG, Christie ID, Crouse DR, Tewes ME, et al. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) of the Texas Gulf Coast. *J Reticuloendothel Soc.* 1983; 34(2): 75-88.
162. Job CK, Harris EB, Allen JL, Hastings RC. A random survey of leprosy in wild nine-banded armadillos in Louisiana. *Int J Lepr.* 1986;54:453–7.
163. Job CK. Nine-banded armadillo and leprosy research. *Indian J Pathol Microbiol.* 2003;46(4):541–50.
164. Walsh GP, Storrs EE, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy-like disease in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): recent epizootiologic findings. *J Reticuloendothel Soc* 1977; 22:363-7.

165. Smith, JH, File SK, Nagy BA, Folse DS, Buckner JA, Webb LJ, et al. Leprosy-like disease of wild armadillos in French Acadiana, Louisiana. *J Reticuloendothel Soc.* 1978;(24):705–19.
166. Clark KA, Kim SH, Boening LF, Taylor MJ, Betz TG, McCasland F V. Leprosy in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from Texas. *J Wildl Dis.* 1987;23(2):220.
167. Kirchheimer WF, Sanchez RM. Quantitative aspects of leprosy in armadillos. *Lepr India.* 1977;49(1):48–53.
168. Kirchheimer WF, Sanchez RM. Quantitative aspects of leprosy in armadillos. *Lepr India.* 1977 Jan;49(1):48-53.
169. Howerth EW, Stallknecht DE, Davidson WR, Wentworth EJ. Survey for leprosy in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the southeastern United States. *J Wildl Dis.* 1990;26(1):112–5.
170. Truman RW, Kumaresan JA, McDonough CM, Job CK, Hastings RC. Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. *Epidemiol Infect.* 1991;106(3):549–60.
171. Stallknecht DE, Truman RW, Hugh-Jones ME, Job CK. Surveillance for naturally acquired leprosy in a nine-banded armadillo population. *J Wildl Dis* 23(2): 308-10.
172. Duthie MS, Truman RW, Goto W, Donnell J, Hay MN, et al. Insight toward early diagnosis of leprosy through analysis of the developing antibody responses of *Mycobacterium leprae* - Infected armadillos. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(2):254.

173. Truman RW, Morales MJ, Shannon EJ, Hastings RC. Evaluation of monitoring antibodies to PGL-I in armadillos experimentally infected with *M. leprae*. *Int J Lepr*. 1986;54(4):556–9.
174. Loughry WJ, Truman RW, McDonough CM, Tilak M-K, Garnier S, Delsuc F. Is leprosy spreading among nine-banded armadillos in the Southeastern United States? *J Wildl Dis*. 2009;45(1):144–52.
175. Skinsnes OK. The Weddell theory on the pathogenesis of leprosy. *Int J Lepr*. 1976; 34:54–6.
176. Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev*. 2005;76(3):198.
177. Truman R, Fine PE. 'Environmental' sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. *Lepr Rev*. 2010 Jun;81(2):89-95.
178. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med*. 2011 Apr 28;364(17):1626-33
179. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. 2013;6(1):19–24.
180. Amezcua ME, Escobar-Guitierrez A, Storrs EE, Dhople AM, Burchfield HP. Wild Mexican armadillo with leprosy-like infection (letter). *Int J of Lepr and Other Mycobact Dis*. 1984; 52(2): 254-5.

181. Cardona-Castro N, Beltran JC, Ortiz-Bernal A, Vissa V. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia. *Lepr Rev.* 2009;80(4):424–31.
182. Zumarraga MJ, Resoagli EH, Cicuta ME, Martinez AR, de Rott MIO, de Millan SG, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001;69(1):21–5.
183. Kerr L, Kendall C, Sousa CA, Frota CC, Graham J, Rodrigues L, et al. Human-armadillo interaction in Ceará, Brazil: Potential for transmission of *Mycobacterium leprae*. *Acta Trop.* 2015;74(9):152–74.
184. Frota CC, Costa Lima LN, Rocha AS, Suffys PN, Rolim BN, Rodrigues LC, et al. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(I):209–13.
185. Deps PD, Antunes JMA de P, Tomimori-Yamashita J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML Flow test. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:86–7.
186. Opromolla, DV, Arruda OS, Fleury RN. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae*. *Hansen Int.* 1980;5(1):28–36.
187. Deps PD, Santos AR, Yamashita-Tomimori J. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo: preliminary results. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2002;70(1):34–5.

188. Deps R, Rezende AS; Tomimori JY. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood and skin from nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): Preliminary results. *International Journal of Leprosy and other Mycol Dis.* 2002; 70 (1): 34-35.

189. Deps PD, Alves BL, Gripp CG, Aragao RL, Guedes B, Filho JB, et al. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(4):338–42.

190. Abide JM, Webb RM, Jones HL, Young L. Three indigenous cases of leprosy in the Mississippi delta. *South Med J.* 2008;101(6):635–8.

191. Lane JE, Walsh DS, Meyers WM, Klassen-Fischer MK, Kent DE, Cohen DJ. Borderline tuberculoid leprosy in a woman from the state of Georgia with armadillo exposure. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(4):714–6.

192. Thomas DA, Mines JS, Thomas DC, Mack TM, Rea TH. Armadillo exposure among Mexican-born patients with lepromatous leprosy. *J Infect Dis.* 1987;156(6):990–2.

193. Lumpkin LR, Cox GF, Wolf JE. Leprosy in armadillo handlers. *J Am Acad Dermatol.* 1984;10(6):1073.

194. Deps PD, Faria LV, Gonçalves VC, Silva DA, Ventura CG, Zandonade E. Aspectos epidemiológicos da transmissão da hanseníase em relação a exposição ao tatu. *Hansen Int.* 2003;28(2):138–44.

195. Clark BM, Murray CK, Horvath LL, Deye GA, Rasnake MS, Longfield RN. Case-control Study of Armadillo Contact and Hansen's Disease. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78(6):962–7.
196. Schmitt JV, Dechandt IT, Dopke G, Ribas ML, Cerci FB, Viesi JMZ, et al. Armadillo meat intake was not associated with leprosy in a case control study, Curitiba (Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:857–62.
197. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):562–8.
198. Silva AF, Oliveira FC, Leite JS, Mello MF V, Brandão FZ, Leite RI, et al. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Vet Parasitol*. 2013;191(3-4):347–52.
199. Graser Y, el Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol*. 1998 Apr;138(4):576–82.
200. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441–8.
201. Graser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia*. 2008;166(5-6):239–56.

202. National Center for Biotechnology Information. GenBank. [cited 2015 sep 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.

203. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406–25.

204. Sakamuri RM, Harrison J, Gelber R, Saunderson P, Brennan PJ, Balagon M, et al. A continuation: study and characterisation of *Mycobacterium leprae* short tandem repeat genotypes and transmission of leprosy in Cebu, Philippines. *Lepr Rev.* 2009 Sep;80(3):272–9.

205. Kumar S, Tamura K, Nei M. Mega - Molecular Evolutionary Genetic Analysis. [cited 2015 Oct 5]. Available from: <http://www.megasoftware.net/>.

206. Monot M, Honore N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet.* 2009 Dec;41(12):1282–9.

207. Wang E. Diets of ocelots (*Leopardus pardalis*), margays (*Leopardus wiedii*), and oncillas (*Leopardus tigrinus*) in the Atlantic rainforest in southeast Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ.* 2002;37:207–12.

208. Kluyber D, Desbiez AL. Tocas de tatu-canastra e seu potencial para a transmissão de patógenos. In: Anais da 1º Reunião da Sessão WDA da América Latina, 2013. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2013.

209. Basano SD, Camargo LM. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev Bras de Epidemiol*. 2004;7(3):328-37.
210. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology*. 10th ed. London: Hodder Arnold ASM Press; 2005. p. 313-49.
211. Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp a parasite of the armadillo *Dasypus novemcinctus (L.)* in Amazon Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64:3–9.
212. Diniz MM, Ovallos FG, de Castro Gomes CM, de Oliveira Lavitschka C, Bianchi Galati EA Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasit Vectors* 2014; 7:139.
213. Dias ES, França-Silva JC, Silva JC, Monteiro EM, Gonçalves CM, Barata RA. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de um foco de leishmaniose tegumentar no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:1–4.
214. Gontijo B, Carvalho ML. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(1):71–80.
215. Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC. Chagas's Disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73(2):193-204.

216. Herrera HM, Davila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004;125(3-4):263–75.
217. Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, G de OT, Lima MM. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J Vector Ecol.* 2010;35(2):385–94.
218. Rosypal AC, Hill R, Lewis S, Barr SC, Valadas S, Gennari SM, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in dogs experimentally infected with isolates obtained from opossums (*Didelphis virginiana*), armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and dogs (*Canis familiaris*). *J Parasitol.* 2011 Feb;97(1):140–3.
219. D'Alessandro A, Barreto P, Saravia N, Barreto S. Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the Oriental Plains of Colombia. *Am J Trop Med.* 1984;33(6):1084–95.
220. Rocha FL, Roque ALR, de Lima JS, Cheida CC, Lemos FG, de Azevedo FC, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain. 2013;8(7):e67463.
221. Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SM, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: Phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):197–207.
222. Dhople AM. Armadillo as a model for studying chemotherapy of Leprosy. *Indian J Lepr.* 1986;58(1):19–28.

223. Pedrini SC. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* e outras micobactérias em Tatus Selvagens. [Tese]. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista; 2006.

224. Roque AL, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania species* in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014;3(3):251–62.

225. Tercarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007;7:92.

226. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol*. 2008;8(5):627–31.

ANEXO



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: 27587-4	Data da Emissão: 07/05/2013 18:23	Data para Revalidação*: 06/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, 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: ARNAUD LEONARD JEAN DESBIEZ	CPF: 731.965.681-72
Título do Projeto: Projeto de Pesquisa e Conservação do Tatu-Canastra no Pantanal	
Nome da Instituição: IPÊ- INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS	CNPJ: 66.831.223/0001-09

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Capturas (varias campanhas/ano)	05/2011	05/2014
2	Coleta de Materiais Biológicos	05/2011	05/2014
3	Monitoramento (Telemetria GPS/VHF)	05/2011	12/2014
4	Análise de Materiais Biológicos	05/2011	12/2014

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 exime 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 IBAMA nº 154/2007 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 www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
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 estorço 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 www.mma.gov.br/cgen .
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.
9	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Outras ressalvas

1	E obrigatório o acompanhamento de veterinário legalmente habilitado e devidamente capacitado durante todos os procedimentos das contênges químicas dos espécimes a serem estudadas.
2	O pesquisador estrangeiro ARNAUD LEONARD JEAN DESBIEZ possui vínculo empregatício efetivo com Instituição científica brasileira. Dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Emilia Patricia Medici	Consultoria Técnica	177.641.688-07	212733126 SSP-GP-GP	Brasileira
2	Danilo Kluyber de Souza	Veterinário Responsável	221.814.338-01	290160522 SSP-GP	Brasileira
3	PAULO ROGERIO MANGINI (CRMV-PR - 3347)	Consultoria Veterinária	720.944.949-34	3.892.220.0 SSP-PR-PR	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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).

Código de autenticação: 21883667

