



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA

**PESQUISA POR AGENTES ZOONÓTICOS EM TATUS (MAMMALIA:
CINGULATA) DA ESPÉCIE *EUPHRACTUS SEXCINCTUS* DA CAATINGA**

MOSSORÓ-RN

2021

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA

**PESQUISA POR AGENTES ZONÓTICOS EM TATUS (MAMMALIA:
CINGULATA) DA ESPÉCIE *EUPHRACTUS SEXCINCTUS* DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. PhD. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes - UFERSA

MOSSORÓ-RN

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

P48p PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA, ILANNA VANESSA.
PESQUISA POR AGENTES ZOONÓTICOS EM TATUS
(MAMMALIA: CINGULATA) DA ESPÉCIE EUPHRACTUS
SEXCINCTUS DA CAATINGA / ILANNA VANESSA PRISTO DE
MEDEIROS OLIVEIRA. - 2021.
51 f. : il.

Orientador: João Marcelo Azevedo de Paula
Antunes.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2021.

1. Zoonoses. 2. Tatu peba. 3. Nordeste. 4.
Brasil. I. Azevedo de Paula Antunes, João
Marcelo, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA

**PESQUISA POR AGENTES ZOONÓTICOS EM TATUS (MAMMALIA:
CINGULATA) DA ESPÉCIE *EUPHRACTUS SEXCINCTUS* DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

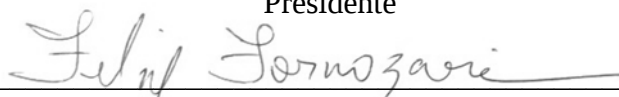
Orientador: Prof. PhD. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes – UFERSA

Defendida em: 29/09/2021

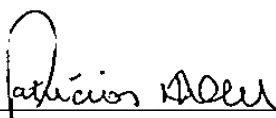
BANCA EXAMINADORA



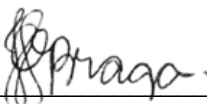
Prof. PhD. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes (UFERSA)
Presidente



Prof. PhD. Felipe Fornazari (UNESP/BOTUCATU)
Membro Examinador



Profa. PhD. Patrícia Duarte Dops (UFES/ES)
Membro Examinador



Prof. Dra. Juliana Fortes Vilarinho Braga (UFERSA)
Membro Examinador



Prof. Dr. Sc. Raimundo Alves Barrêto Júnior (UFERSA)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA nascida em Natal-RN, no dia 09/04/1987, filha de Ilo Sérgio Fernandes de Oliveira e Ana Zélia Prito de Medeiros Oliveira, concluiu o ensino fundamental e o médio no Colégio Nossa Senhora das Neves em Natal-RN. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2012.2. Concluiu o mestrado em Ciência Animal pela UFERSA em 2017. Em março de 2017 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, orientada pelo Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes. Durante o período de doutorado, desenvolveu trabalho com doenças infectocontagiosas em animais domésticos e silvestres.

Ao meu avô materno, Terci Severiano de Medeiros, que foi o maior exemplo de homem que meus olhos já viram e sempre me incentivou em tudo, principalmente nos estudos.

(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Pai Maior, em quem confio e acredito, e que me fez seguir até hoje, enfrentando os momentos difíceis e não me deixando desistir. Que colocou as pessoas certas no momento certo para que eu pudesse ter a força necessária e continuar a caminhada!

Ao meu orientador, Prof. PhD. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, que me deu oportunidades desde quando entrou na UFERSA e acreditou na minha capacidade. Não posso deixar de agradecer a paciência e calma dele, mesmo quando eu estava mesmo era precisando de uma “sacudida”. Nunca vou deixar de tentar fazer meu melhor pois sei que ainda não o fiz!

À toda equipe que me ajudou diretamente no experimento: Gabriela Hémylin, Giulia Santana, Ana Yamakawa, Mariana Nilsson, Artur Brilhante e Mariana Gava que me auxiliaram na execução do experimento e dos testes moleculares e sorológicos. Minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Hélio Langoni, pela parceria estabelecida para que eu pudesse concluir a parte experimental, cedendo gentilmente as instalações, materiais e pessoal do laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, situado no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da UNESP-Botucatu.

Ao Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas, por nos oferecer o laboratório de animais silvestres da UFERSA, o qual é coordenador, para que pudéssemos fazer a coleta de material e manipular os animais capturados.

Aos meus pais, Ilo Sérgio e Ana Zélia, que me educaram e me mostraram os caminhos para que eu me tornasse o ser humano que sou hoje, que sempre acreditaram em mim mais que qualquer outra pessoa. Que sempre me apoiaram e me incentivaram nessa jornada tão longa em Mossoró, sendo sempre meu porto seguro e meu abrigo! Em momento algum da minha vida conseguirei ser grata o suficiente por tudo que fizeram, fazem e sei que ainda farão por mim!

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhadas e cunhado, que mesmo de longe e cada um do seu jeito me apoiaram e me incentivaram a chegar até aqui.

Ao meu marido, Felipe Pedro, que nunca me deixou desabar, aguentou a distância desde o começo, me aturou nos momentos mais estressantes, ouviu meus chiques e nunca deixou de

ser paciente, parceiro, amigo e amante. Saiba que sem seu apoio eu não teria conseguido. Muito obrigada!

À minha filha Ivy Beatriz, que ainda nem sabe falar, mas já me ensinou tanto e me fez renascer/reinventar em vários aspectos. Sendo um dos meus maiores motivos para não desistir!

À minha grande amiga, Regina Dias, pelas suas palavras sempre oportunas e claras, pela confiança e principalmente pela amizade. Por ter sido um dos meus pontos de apoio em Mossoró, onde eu estava longe da família e dos amigos. Por ter me auxiliado em TODOS os aspectos durante meu doutoramento e principalmente na reta final, onde mais me “desestruturei”. E também pelos carões e conselhos naqueles momentos “X” que me fizeram tomar decisões tão assertivas!

Aos demais amigos que tive a oportunidade de conhecer nessa jornada. Tanto os que apenas passaram quanto os que permaneceram. Que mesmo nem sempre estando diretamente ligados ao processo de doutoramento, ajudaram a deixar a caminhada mais suave, mais leve. Em especial à Gislayne Peixoto e à Viviane Rodolfo. Vocês foram fundamentais para que eu mantivesse minha “sanidade mental”!

Aos amigos que ficaram em Natal mas também foram muito importantes nesse processo, em especial à Camila Marinho que sempre tem uma palavra de acalanto!

À CAPES, que me proporcionou apoio financeiro para a realização do projeto durante todo o período do mestrado e do doutorado.

Aos animais de meu experimento (*in memoriam*), que literalmente deram a vida para que eu realizasse minha pesquisa. Buscamos demonstrar total respeito e carinho por cada um deles, zelando sempre pelo bem-estar independente das condições às quais eram expostos.

“Grandes batalhas só são dadas a grandes guerreiros”.

(Mahatma Gandhi)

PESQUISA POR AGENTES ZOONÓTICOS EM TATUS (MAMMALIA: CINGULATA) DA ESPÉCIE *EUPHRACTUS SEXCINCTUS* DA CAATINGA.

OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros. Pesquisa por agentes zoonóticos em tatus (Mammalia: Cingulata) da espécie *Euphractus sexcinctus* da Caatinga, 2021. 64f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Sanidade Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2021.

RESUMO: A participação dos tatus nos ciclos de enfermidades zoonóticas possivelmente atuando como agentes disseminadores dos patógenos vem sendo estudada há décadas. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a ocorrência de *Trypanossoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.* e *Leptospira spp.* em tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* capturados em regiões da caatinga no estado do Rio Grande do Norte, no nordeste do Brasil. Foram capturados 20 animais dessa espécie dos quais foram coletadas amostras de sangue total e de tecidos de rins, fígado, baço, coração e pulmão para realização de PCR, Hemocultura e Soroaglutinação microscópica. Para o *T. cruzi* foram utilizados a hemocultura e o PCR dos tecidos sanguíneo e cardíaco; para pesquisa do *T. gondii* foi realizado o teste molecular de PCR de baço, coração e pulmão; para identificação da *Leishmania spp.* fez-se PCR de baço e fígado e para investigação da infecção pela *Leptospira spp.*, realizou-se Soroaglutinação microscópica e qPCR. Todos os nossos resultados negativaram, exceto um animal que se mostrou positivo para a Doença de Chagas no PCR de sangue, não apresentando relevância estatística. A ausência da infecção pode indicar que o controle dos patógenos dentro dos ciclos urbanos e entre humanos influencia na ocorrência das doenças nos animais do ambiente silvestre da mesma região, o que também levanta a hipótese de haver uma relação direta entre as infecções humanas e de tatus.

Palavras-chave: Zoonoses. Tatu-peba. Nordeste. Brasil.

RESEARCH FOR ZOONOTIC AGENTS IN ARMADILLOS (MAMMALIA: CINGULATA) OF THE SPECIES *EUPHRACTUS SEXCINCTUS* FROM CAATINGA.

OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros. Pesquisa por agentes zoonóticos em tatus (Mammalia: Cingulata) da espécie *Euphractus sexcinctus* da Caatinga, 2021. 64f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Sanidade Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2021.

ABSTRACT: The participation of tuna in cycles of zoonotic diseases possibly acting as disseminators of pathogens has been studied for decades. The objective of this research was to evaluate the occurrence of *Trypanossoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.* and *Leptospira spp.* in tatus of the species *Euphractus sexcinctus* captured in caatinga regions in the state of Rio Grande do Norte, in northeastern Brazil. Twenty animals of this species were captured from which samples of whole blood and tissues of kidneys, liver, spleen, heart and lung were collected for PCR, Blood Culture and Microscopic Seraglutination. Blood culture and blood and cardiac tissue PCR were used for *T. cruzi*; for *T. gondii* research, the molecular PCR test of spleen, heart and lung was performed; identification of *Leishmania spp.* Spleen and liver PCR was performed and microscopic seraglutination and qPCR were performed for investigation of *Leptospira spp.* infection. All our results were negative, except for one animal that was positive for Chagas disease in blood PCR, with no statistical relevance. The absence of infection may indicate that the control of pathogens within urban and human cycles influences the occurrence of diseases in wild environment animals in the same region, which also raises the hypothesis that there is a direct relationship between human and tuna infections.

Keywords: Zoonosis. Six-banded armadillo. Northeast. Brazil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RFLP-PCR	Restriction Fragment Length Polymorphism
μL	Microlitro
μl	Microlitro
BD	Becton Dickinson
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMJH	Ellinghausen-McCullough- Johnson-Harris
G	Calibre de agulha
HC	Hemocultura
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
KCl	Cloreto de sódio
kg	Quilogramas
L.	Leishmania
LC	Leishmaniose Cultânea
LIT	Liver Infusion triptose
LV	Leishmaniose Visceral
M	Mol
MAT	Teste de Micro Aglutinação
mEq	Miliequivalente
mg	Miligrama
MgCl	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Militros
mm	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometro
NNN	Novy-McNeal-Nicolle
°C	Grau Celsius
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico

PL	Propidium iodide
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
qPCR	Quantitative em tempo real da reação em cadeia pela polemerase
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
SAM	Soroaglutinação Microscópica
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<i>Spp</i>	Espécies
SST	Solução Salina Tamponada
TcIII	Linhagem silvestre de Trypanosoma cruzi
Tris-HCl	Tris-Hydrochloride
UFERSA	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
USA	Estados Unidos da América
UV	Ultraviolet
UV	Ultraviolet

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igualdade
®	Marca registrada
X	Quantidade de vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 GERAL	3
2.2 ESPECÍFICOS	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 LEPTOSPIROSE	4
3.2 DOENÇA DE CHAGAS	5
3.4 TOXOPLASMOSE.....	5
3.5 LEISHMANIOSE	7
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 PrCÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	9
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	9
4.3 LOCAL DO ESTUDO	9
4.4 COLETA DE AMOSTRAS	9
4.5 DIAGNÓSTICO.....	10
4.5.1 Procedimento de biologia molecular.....	10
4.5.2 Toxoplasmoses.....	11
4.5.3 Leptospirose	12
4.5.4 Leishmaniose.....	13
4.5.5 Doença de Chagas.....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	18
APÊNDICE – A	23
APÊNDICE – B	30
ANEXO.....	36

1. INTRODUÇÃO

Existem 21 espécies de tatus incluídas na ordem Cingulata e na superordem Xenarthra e destas, 11 foram identificadas no Brasil (MEDRI et al., 2006). No Nordeste brasileiro, onde predomina o bioma caatinga, o *Euphractus sexcinctus*, conhecido popularmente como tatu-peba, é a espécie mais prevalente (REIS, 2006; MEDRI, 2008). Esses animais podem ser importantes na manutenção e transmissão de vários agentes infecciosos ao homem, atuando muitas vezes como hospedeiros e reservatórios, principalmente nas áreas rurais, como já confirmado na epidemiologia da Hanseníase (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015).

Sabe-se que as doenças infecciosas têm seu surgimento, em sua maioria, na relação entre animais, homens e meio ambiente, de modo que a maioria dos patógenos humanos são de origem animal (RAHMAN et al., 2020). No Brasil, tatus de vida livre já foram relacionados à toxoplasmose, leptospirose, leishmaniose e tripanossomíase (ou doença de Chagas) (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2008; LAINSON; SHAW, 2010; ARANTES et al., 2016). Essas zoonoses possuem transmissão direta e/ou indireta e a atuação dos tatus como disseminadores das mesmas pode ser justificada pela utilização cultural desses animais como alimento, em práticas medicinais e na confecção de peças de artesanato em diferentes regiões da América do Sul (CARDONA-CASTRO et al., 2009), inclusive as zonas rurais do nosso país, onde esses animais ainda representam uma fonte alimentar comum (YEO et al., 2005; DEPS et al., 2008, BRILHANTE et al., 2012; KERR et al., 2015; CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015; DOMOZYCH et al., 2016).

A toxoplasmose é uma antroponose distribuída mundialmente, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. A infecção pode afetar animais e seres humanos, ocorrendo após a ingestão de oocistos presentes no ambiente, alimentos contaminados com fezes de felinos infectados, ou após a ingestão de bradizoítos através dos cistos de hospedeiros intermediários cronicamente infectados. Nesse contexto, os tatus usados na alimentação humana podem indicar risco de contaminação aos que os consomem (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Alguns Dasypodídeos já foram detectados como reservatórios de *T. gondii*, estando entre eles as espécies *Priodontes maximus*, *Dasypus novemcinctus*, *E. sexcinctus* e *Chaetophractus villosus* (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015).

A leptospirose é uma doença encontrada em todo o mundo, causada por bactérias espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*, transmitida através do contato direto ou

indireto com a urina de animais infectados. No ciclo urbano, a contaminação é frequentemente associada às populações de roedores sinantrópicos, porém, pouco se sabe da epidemiologia dos reservatórios no ambiente não domiciliar (SILVA et al., 2008). O homem e todas as espécies de animais domésticos e silvestres se mostraram susceptíveis à infecção (OLIVEIRA; ARSKY; CALDAS, 2013), de modo que anticorpos de diferentes sorovares de *Leptospira* já foram encontrados em *E. sexcinctus* oriundos do Brasil (KIN et al., 2015).

A leishmaniose pode ser causada por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e constitui um grave problema de saúde pública mundial. São parasitas transmitidos por flebotomíneos que se infectaram durante repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos (ALVAR et al., 2012). Assim, as investigações sobre mamíferos selvagens são muito importantes, incluindo a avaliação da exposição desses animais para o vetor e o parasita (FUNASA, 2002; BRASIL, 2006).

Coura e Dias (2009), relatam em seu estudo que no ano de 1912, ao pesquisar o ciclo silvestre da tripanossomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi* (*T. cruzi*), Carlos Chagas observou que os tatus foram os primeiros mamíferos diagnosticados com a infecção. Desde então, relatos de tatus infectados, nas Américas, vêm sendo registrados (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009), tendo o *E. sexcinctus* como um dos hospedeiros identificados (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009; OROZCO et al., 2013; TELLERIA; TIBAYRENC, 2010; YEO et al., 2005), demonstrando que o conhecimento da dinâmica epidemiológica de *T. cruzi* nestes animais ainda é deficitário.

Dessa forma, o presente trabalho buscou determinar a ocorrência dos principais agentes zoonóticos (*T. gondii*, *Leptospira* spp., *Leishmania* spp. e *T. cruzi*) circulantes entre as populações de tatus e humanos, utilizando métodos diretos e indiretos de diagnóstico, além de fornecer informações sobre seus genótipos, com intuito de elucidar o papel epidemiológico dos tatus da espécie *E. sexcinctus* nessas doenças no semi-árido do estado do Rio Grande do Norte.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Obter esclarecimentos sobre a infecção natural, cadeia epidemiológica e potencial zoonótico da Leptospirose, Doença de Chagas, Toxoplasmose e Leishmaniose em tatus de vida livre mais prevalentes (*Euphractus sexcinctus*) na Caatinga, da região central do estado do Rio Grande do Norte, através de testes sorológicos e de biologia molecular.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Obter isolados de *Leptospira* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp. oriundos de tatus da espécie *E. sexcinctus*;
- b) Obter soroprevalência e genotipagem dos isolados de *T. gondii* e *T. cruzi* provenientes de tatus da espécie *E. sexcinctus* naturalmente infectados pertencentes à região do semi-árido da Caatinga do estado do Rio Grande do Norte
- c) Determinar genotipagem dos isolados de *T. gondii* e *T. cruzi* provenientes de tatus da espécie *E. sexcinctus* naturalmente infectados pertencentes à região do semi-árido da Caatinga do estado do Rio Grande do Norte, utilizando análise de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR) para a determinação de genótipo de *T. gondii* e *T. cruzi*;
- d) Determinar a presença de *Leishmania infantum* (L.) e outras espécies de *Leishmania* através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em tatus da espécie *E. sexcinctus* naturalmente infectados;
- e) Estabelecer a soroepidemiologia de *Leptospira* spp. e identificar os sorovares mais prevalentes usando o Teste de Micro Aglutinação (MAT) e confirmação com PCR em tatus da espécie *E. sexcinctus* naturalmente infectados;
- f) Criar um banco de genótipos dos agentes zoonóticos provenientes da espécie de tatu que será avaliada e estabelecer relações filogenéticas com os que já se encontram disponíveis na literatura.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é considerada a zoonose mais disseminada no mundo e apresenta consequências para saúde humana e animal (HAAKE et al., 2015). Causada por bactérias espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*, ela é transmitida pelo contato direto ou indireto com urina de animais infectados (SILVA et al., 2008). Em humanos, a leptospirose pode causar desde infecção leve até casos mais graves, podendo evoluir para óbito (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Os animais selvagens e domésticos são fontes de infecção para seres humanos. Alguns deles são hospedeiros acidentais, tais como bovinos, suínos, cavalos e animais de companhia, e atuam como reservatórios para mais de 250 sorotipos conhecidos de *Leptospira* (ASSENGA et al., 2015).

A fauna brasileira é muito rica e o conhecimento sobre sua participação na epidemiologia da leptospirose é pouco descrita (FORNAZARI; LANGONI, 2014). Porém, sabe-se que anticorpos de diferentes sorovares de *Leptospira* (Hebdomadis, Grippotyphosa e Cynopteri, Canicola, Castellonis, Icterohemorrhagiae, Hardjo) já foram encontrados em espécimes de *D. novemcinctus* e *E. sexcinctus* oriundos do Brasil, e *Chaetophractus villosus* na Argentina (LINS et al., 1984; KIN et al., 2015). Ainda no mesmo estudo (FORNAZARI; LANGONI, 2014), foi relatado que as *Leptospiras* são eliminadas principalmente na urina, contaminando água, alimentos e solo. Num estudo realizado por Fornazzari et al. (2018), foram feitos testes de quantitativo em tempo real de PCR (qPCR) e MAT em 16 espécies de animais silvestres e apenas um tatu, da espécie *D. novemcinctus*, apresentou positividade.

A soroprevalência de leptospirosas em animais saudáveis é um achado importante, sugerindo níveis de exposição local, que podem ser causa significativa de exposição para outros animais e da infecção e aumento do risco para seres humanos (VRIES et al., 2014). Assenga et al. (2015), em estudo realizado na Tanzânia, identificaram sorogrupos de leptospirosas similares em humanos, ruminantes domésticos, animais selvagens e roedores que compartilhavam o mesmo ecossistema. Isso pode ser atribuído à intensa sobreposição destas espécies, manuseio de carne de animais selvagens e fatores sazonais, como seca e inundações. Diante desses achados, os autores ressaltaram que a interação desses seres vivos é um alerta à saúde pública quando se considera a transmissibilidade entre eles, fato que

pode também auxiliar no planejamento e controle da transmissão no âmbito doméstico (ASSENGA et al., 2015).

3.2 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas possui três ciclos distintos de transmissão (doméstico, peridoméstico e silvestre) (ALVARADO-OTEGUI et al., 2012) que podem acontecer simultaneamente numa mesma região, sendo caracterizados por diferentes espécies de reservatórios e vetores. Estima-se que mais de 150 espécies de mamíferos atuem como reservatório de *T. cruzi* nas Américas (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Os registros desse protozoário na ordem Cingulata foram descritos em *D. novemcinctus*, *E. sexcinctus*, *C. villosus*, *Colobus vellerosus*, *Tolypeutes matacus* e *Cabassous unicinctus* (YEO et al., 2005; NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009; TELLERIA; TIBAYRENC, 2010; OROZCO et al., 2013), demonstrando que apesar dos tatus serem comprovadamente reservatórios, pouco se sabe acerca da dinâmica epidemiológica de *T. cruzi* nestes animais.

Em estudo no nordeste do Brasil, no bioma Caatinga, entre 17 insetos *T. cruzi*-positivos que tiveram a sua fonte de alimento caracterizada, três haviam se alimentado em tatus, sendo os mesmos caracterizados como triatomíneos (SARQUIS et al., 2010). Tal resultado ressalta a participação dos tatus no ciclo epidemiológico da tripanossomíase americana, tanto no ciclo silvestre como no peridoméstico. Além disso, estudos moleculares de genotipagem revelaram que tatus estão associados principalmente com o genótipo *T. cruzi*-II (YEO et al., 2005).

3.3 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma antroponose distribuída mundialmente, causada por um parasita intracelular obrigatório, o protozoário *Toxoplasma gondii*. Em estudo realizado na Flórida, 12 de 63 (19,05%) tatus foram positivos para anticorpos do toxoplasma no teste de hemaglutinação indireta (HI). Os anticorpos para *T. gondii* também foram detectados em um lince norte-americano (*Linx rufus*), espécie que se alimenta principalmente de coelhos, e pode se alimentar de roedores, tatus e gambás. Este fato mostra que felinos e tatus são hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente (BURRIDGE et al., 1979).

Segundo Silva et al. (2008), o desmatamento e consequente perda de habitat de animais selvagens aumentam as possibilidades de transmissão de zoonoses, como a leptospirose e toxoplasmose, causada pela circulação de animais selvagens em ambientes domésticos.

Ainda neste estudo, os autores sugerem que os homens devem evitar ingerir carne de tatu, uma vez que estes animais podem transmitir toxoplasmose e leptospirose. Isto é especialmente verdadeiro em relação à toxoplasmose, considerando os elevados títulos de anticorpos para *T. gondii* observados no referido estudo, e considerando que a infecção pode ser transmitida aos seres humanos por meio da ingestão de carne crua mal-cozida de hospedeiros intermediários selvagens, como a de tatus.

Os tatus são mamíferos onívoros que habitualmente farejam e reviram o solo em busca de alimento e, portanto, estão em contato com material potencialmente infectado com fezes de felinos contendo *T. gondii* (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015). Por isso, a infecção por *T. gondii* nesta espécie pode ser considerada como um indicativo de contaminação com oocistos. Além disso, como os roedores e os marsupiais, esses mamíferos são vistos em áreas periurbanas, o que aumenta as chances de contato com oocistos provenientes de felinos. Da mesma forma, a via de transmissão contrária, através da predação do tatu infectado pelo felino doméstico, também é possível, contribuindo para a manutenção do ciclo do protozoário nestas áreas (SILVA et al., 2008). Porém, embora a vida selvagem possa desempenhar papel importante na transmissão e manutenção de *T. gondii* no ambiente, as informações são limitadas sobre este parasito em animais selvagens (DUBEY et al., 2011), de modo que o isolamento do patógeno fornece informações valiosas sobre sua estrutura populacional (VITALIANO et al., 2014). Em infecção experimental em camundongos, Vitaliano et al. (2014) verificaram que os isolados de tatus (*D. novemcinctus* e *E. sexcinctus*) foram virulentos e letais.

Em pesquisa realizada no Chaco paraguaio e boliviano, Acosta et al. (2017), destacaram a atuação do *D. novemcinctus* como um dos principais reservatórios silvestres para a linhagem TcIII e, entre os *E. sexcinctus* analisados nesse mesmo estudo, a positividade para o *T. cruzi* identificada por teste molecular de PCR foi de aproximadamente 15%. Poucas evidências foram demonstradas acerca da infecção de *T. gondii* em indivíduos da superordem Xenarthra em território brasileiro. Vitaliano et al. (2014), detectaram genótipos desse protozoário na fauna de diversas regiões do nosso país, estando os tatus entre as espécies infectadas.

Embora a caça não seja permitida no Brasil, espécies selvagens são caçadas em áreas rurais, servindo como fonte de infecção para seres humanos e animais domésticos. Além disso, a urbanização é caracterizada pela expansão do povoamento humano, invadindo áreas de natureza e elevando a chance de interações entre animais selvagens e domésticos, o que leva a aumento do risco de infecção em seres humanos, podendo expandir a transmissão de

genótipos selvagens de *T. gondii* para humanos e seres domesticados (VITALIANO et al., 2014). Este fato condiz com os achados de Alvarado-Esquivel et al. (2012), que descrevem a soroprevalência e fatores que contribuem para a infecção de *T. gondii* em pessoas idosas, relatando a associação do consumo de carnes de tatu e a enfermidade nesta faixa etária.

3.4 LEISHMANIOSE

No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) está presente em 21 estados, enquanto as formas cutâneas da doença (Leishmaniose cutânea – LC) foram descritas em todos os estados. Várias espécies de mamíferos silvestres, domésticos e sinantrópicos foram registrados como hospedeiros ou reservatórios de *Leishmania spp.* em território brasileiro (LIMA et al., 2013; ROQUE; JANSEN, 2014; CARDOSO et al., 2015).

Entende-se como reservatório de uma doença uma ou várias espécies que têm a capacidade de manter o patógeno vivo e com potencial infectante, e que serão responsáveis pela manutenção do parasita na natureza em um determinado período e espaço. A transmissão de espécies de *Leishmania* na natureza ainda possui várias ligações desconhecidas (CARDOSO et al., 2015). Como seres humanos, os mamíferos domésticos e selvagens também são suscetíveis a LV, mas cães (*Canis familiaris*) desempenham papel importante no ciclo de transmissão doméstica, atuando como reservatórios. No ciclo silvestre, os reservatórios são os canídeos *Lycalopex vetulus* (raposas) e *Cerdocyon thous* (raposa-do-mato) e os didelfídeos *Didelphis albiventris* (gambá da orelha branca). As alterações ambientais oriundas de mudanças naturais ou ocasionadas pelo homem acabam por estreitar o contato entre espécies silvestres e domésticas o que favorece a possibilidade de transmissão de LV (CURI; MIRANDA; TALAMONI, 2006).

No Brasil, a eco-epidemiologia da LV mudou desde a década de 1970, com o processo de urbanização, expansão das áreas endêmicas, e o surgimento de novos focos da doença, devido às extensas mudanças sócio-ambientais. As investigações sobre o papel dos mamíferos selvagens, são muito importantes, incluindo a avaliação da exposição desses animais ao vetor e ao parasita, que pode ser feito por meio de testes sorológicos (FUNASA, 2002; BRASIL, 2006).

A eutanásia de cães positivos e a aplicação de inseticidas foram estratégias implementadas para controle de LV no Brasil que além de não apresentaram eficácia em áreas endêmicas (FUNASA, 2002), não impediram a disseminação da doença em outras regiões. Um fator relevante é que as localizações endêmicas da doença em humanos estão

próximas às áreas de possível ocorrência do ciclo silvestre (WHO, 2010), que têm sido propostos como uma possível causa da falta de sucesso no controle da LV (MILLÁN; FERROGLIO; SOLANO-GALLEGO, 2014). Portanto, a importância de se investigar a infecção nos animais selvagens e incluir as regiões não endêmicas na vigilância se destaca, apresentando-se como uma nova abordagem para o controle eficaz da doença (BRASIL, 2006).

Paiz et al. (2015), descreveram, no estado de São Paulo, a evidência sorológica de infecção por *Leishmania (L.) infantum* em mamíferos silvestres de vida livre no município de Botucatu, São Paulo, Brasil, onde não há registros de casos em cães autóctones ou em humanos de LV. Estes resultados destacam a importância da elucidação do papel dessas espécies na manutenção e transmissão do parasita, e a necessidade de vigilância epidemiológica abrangente e eficaz em áreas onde não sejam identificadas contaminações em *C. familiaris* ou a doença humana não ocorrem, especialmente em regiões onde existem o aumento de contato entre ambientes urbanos e selvagens.

Na superordem Xenarthra já foram identificadas diversas espécies de *Leishmania*. Porém, os registros se concentram na ordem Pilosa, com ao menos sete espécies do parasita sendo detectadas em quatro espécies de preguiças e tamanduás (ROQUE; JANSEN, 2014). Por outro lado, apesar dos registros na ordem Cingulata serem escassos, com apenas duas espécies de *Leishmania* registradas, a espécie *D. novemcinctus* foi identificada como hospedeiro de *Leishmania naiffi* (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015) e o *E. sexcinctus* como hospedeiro da *Leishmania infantum* (BARBOSA et al., 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo da prevalência foi baseado e influenciado pela estação (chuvosa ou seca) e dificuldades para encontrar os espécimes e transportá-los para o laboratório.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

A utilização dos tatus selvagens no estudo está respalda na licença nº 50564-1 que consta no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) e foi obtida mediante submissão do pedido de autorização ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Além disso, o projeto foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), com o protocolo número 23091.002959/2016-43.

4.3 LOCAL DO ESTUDO

Os tatus da espécie *E. sexcinctus* foram capturados em localidades distintas pertencentes às áreas rurais do estado do Rio Grande do Norte que compreendem os municípios de Afonso Bezerra, Guamaré, Macau, Pedro Avelino e Pendências. A escolha das referidas localidades baseou-se em relatos de caça e cativeiro dos animais em questão, com finalidade de consumo, onde eles permaneciam em barris preenchidos de areia enquanto engordavam, o que indicava a presença dos tatus naquela localidade. Porém, os animais do nosso estudo foram capturados vivos e posteriormente transportados para o laboratório de análise, não sendo submetidos ao cativeiro.

4.4 COLETA DE AMOSTRAS

Ainda em no ano de 2016, no mês de maio, procedeu-se a coleta dos primeiros 10 animais. Antes disso, os tatus haviam sido identificados através de etiquetas ainda no local de captura e transportados para a cidade de Mossoró, especificamente para o laboratório de Animais Silvestres da UFERSA, e lá permaneceram durante 48 horas na tentativa de amenizar o estresse da captura e do deslocamento. Na sequência, foi feita a pesagem dos animais para aplicação, por via intramuscular, de 4mg/kg de tiletamina-zolazepam (Zoletil® 50, Virbac, Brasil), com o objetivo de possibilitar a inspeção do animal como um todo e a identificação de possíveis alterações indicativas de patologias, como a Leishmaniose. Posteriormente, com uso de agulha de calibre 22 G 1 ¼ acoplada à uma seringa estéril de 10mL, procedeu-se a coleta de sangue por acesso em veias subclávias. O sangue coletado foi

dividido para duas pesquisas de modo que uma parte contida em tubos Becton Dickinson (BD) Vacutainer® de 13 × 75 mm e 3,0 mL de volume contendo 3,4 mg de K₂EDTA revestido por spray (BD) foi destinada ao laboratório clínico do Hospital Veterinário da UFERSA para posterior envio a hemocultura. A outra parte complementar foi acondicionada em tubos vacutainer BD de 16 x 100 mm, volume de 10 mL, simples/sem aditivo e deixado coagular por 1 hora à temperatura ambiente (25 °C), seguido por centrifugação (1500 xg por 15 min a 4 °C), para produzir soro totalmente separado e foram destinados a outro estudo.

O último procedimento feito com os animais foi a eutanásia, realizada com a administração de 2,56 mEq/Kg (1 mL/kg de solução a 19,1%) de cloreto de potássio via intravenosa, que só era iniciada quando detectada a perda do reflexo corneano nos tatus submetidos às coletas. Com a confirmação do óbito do animal, foram coletadas amostras de baço e fígado que foram acondicionadas em *ependorfs* e imediatamente submetidas ao congelamento.

Foram feitas outras coletas, de mais 10 animais capturados, no mês de junho do mesmo ano. Nela, os animais passaram pelos mesmos procedimentos, incluindo a coleta de tecido cardíaco, pulmonar e renal. Assim, quando em posse das amostras, foram utilizadas para detecção de *T gondii*, tecido esplênico, cardíaco e pulmonar. Para pesquisa de *Leishmania spp.* foram analisadas amostras de baço e fígado. Para realização de PCR para *T. cruzi* os tecidos do coração e o sangue foram usados e para a pesquisa da *Leptospira spp.* foi realizado PCR de tecido renal além da Hemocultura. Com exceção da hemocultura, que foi realizada na FIOCRUZ/RJ, todos os outros teste foram realizados na UNESP-Botucatu.

4.5 DIAGNÓSTICO

4.5.1 Procedimento de biologia molecular

Medidas para evitar a contaminação entre amostras foram utilizadas em todas as fases do protocolo experimental, desde a colheita das mesmas, pela utilização de materiais individuais e estéreis, bem como para as etapas características da PCR, seguindo as recomendações de Kwok (1990), tais como utilização de salas diferentes para a extração de DNA (ácido desoxirribonucleico), preparação de reagentes, amplificação e análise das amostras, troca frequente de luvas, material plástico individual e descartável, e utilização de controles dos reagentes de extração e amplificação.

4.5.2 Toxoplasmose

4.5.2.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Todas as amostras foram triadas para a detecção de DNA de *T. gondii* pela PCR utilizando-se os primers TOX4 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') e TOX5 (5'CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT3'), segundo descrito por Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb). Cada microtubo de reação de 0,2mL recebeu 1X tampão de PCR 10X, sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 1,5mM de MgCl₂, 1,25mM de solução de deoxinucleotídeos, 0,15U de Taq DNA polimerase, 10PM de cada oligonucleotídeo, 10ng de amostra, e água ultrapura q.s.p., perfazendo um volume total de 25PL. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador MasterCycler EP gradient, utilizando-se uma desnaturação inicial por 7 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final por 10 minutos a 72°C. Os primers 27F (5' - GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LILLY; WORTHAM, 2013), direcionados para o gene universal bacteriano 16S rRNA, foram utilizados como controles para confirmar que os produtos da extração continham DNA amplificável e estavam livres de inibidores de PCR.

4.5.3 Leptospirose

4.5.3.1 Sorologia para leptospirose pela Soroaglutinação Microscópica (SAM)

As amostras de soro foram testadas para anticorpos anti-*Leptospira spp.* pela técnica de SAM, segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002). Foi utilizada uma bateria de antígenos vivos, mantidas e repicadas semanalmente em meio Ellinghausen-McCullough- Johnson-Harris (EMJH) (DIFCO Laboratories®, Detroit, USA), a 28°C, constituída de 25 sorovares e quatro variantes do sorovar Hardjo: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Djasiman, Sentot, Gryppotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Andamana, Patoc, Hardjo prajitno, Hardjo miniswajezak, Hardjo C.T.G. e Hardjo bovis. Cada amostra foi inicialmente diluída em solução salina tamponada (SST) pH 7,6 na diluição 1:50, adicionando-se 100 µL do soro a 4,9 mL da solução em tubos de ensaio de 10 mL. Elas foram transferidas utilizando-se uma micropipeta para uma microplaca de fundo chato, e dispostas horizontalmente em 29 orifícios contendo 50 µL de amostra cada. Em seguida 50 µL de cada um dos 29 antígenos foram adicionados na posição vertical às amostras de soro, totalizando 100 µL de material em cada orifício. SST pH 7,6 foi utilizado como controle negativo. As placas foram

tampadas, levemente agitadas por 20 segundos e incubadas em estufa seca a 28°C durante uma hora. Após a incubação, procedeu a leitura das placas em microscópio ótico de campo escuro (Carl Zeiss®, Alemanha), com aumento de 1000X. Seriam consideradas positivas as amostras que apresentassem 50% ou mais de leptospiros aglutinadas.

4.5.3.2 PCR para leptospirose

Foi realizada a PCR (MÉRIEN et al., 1992) utilizando o reagente GoTaq® Green Master Mix, seguindo as recomendações do fabricante. Os *primers* foram Lep1 e Lep2, descritos por Mérien et al. (1992), que correspondem a sequência de oligonucleotídeos 38-57 (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG3') e 348-368 (5'TTCCCCCATTTGAGCAAGATT3'), da estrutura primária do gene 16S rRNA de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. As reações foram conduzidas em microtubos de 0,2 ml, onde eram adicionados 3 µl da amostra, 12,5 µl do reagente GoTaq® Green Master Mix, 7,5 µl de água ultra pura e 1 µl de cada primer, totalizando um volume de 25 µl. Os tubos foram inseridos em um termociclador (Mastercycler® Eppendorf), que realizou as seguintes condições para a amplificação do DNA: desnaturação a 94°C por 4 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 63°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos; e uma etapa final de extensão a 70°C por 10 minutos. Amostras positivas resultariam em um produto de 331 pares de bases, que seriam submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, contendo Nancy-520, e visualizados em um transiluminador UV (UVP®).

4.5.4 Leishmaniose

4.5.4.1 PCR de leishmaniose

Para realização da PCR usamos o reagente GoTaq® Green Master Mix, seguindo as recomendações do fabricante. Foram empregados dois pares de *primers*, com o objetivo de aumentar tanto a sensibilidade como a especificidade do diagnóstico. Primeiro, todas as amostras foram submetidas à análise com os *primers* HSP70F (5'-AGGTGAAGGCGACGAACG-3') e HSP70R (5'-CGCTTGTCATCTTTGCGTC-3') (HERNÁNDEZ et al., 2014), que amplificam um produto de 337 pb do gene codificador de proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) e, segundo a experiência do nosso grupo de pesquisa, estes *primers* apresentam ótima sensibilidade diagnóstica em amostras de sangue de animais silvestres. As reações foram conduzidas em microtubos de 0,2 ml, adicionados 3 µl da amostra, 12,5 µl do reagente GoTaq® Green Master Mix, 7,5 µl de água

ultra pura e 1 µl de cada primer, totalizando um volume de 25 µl. Os tubos eram inseridos em um termociclador (Mastercycler® Eppendorf), que realizava as seguintes condições para a amplificação do DNA: desnaturação a 94°C por 4 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; e uma etapa final de extensão a 70°C por 10 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% contendo Nancy-520 e visualizados em um transiluminador UV (UVP®).

4.5.5 Doença de chagas

4.5.5.1 Parasitológico para tripanossomatídeo

Para avaliar a infecção pelo *T. cruzi* em tatus, realizou-se hemocultura (HC) em condições estéreis através da inoculação de 0,3 ml de cada amostra de sangue em meio NNN (Novy-McNeal-Nicolle), com uma sobreposição de *Liver Infusion triptose* (LIT). Então, os tubos foram examinados semanalmente durante 5 meses (ALVES et al., 2016). Em caso de detecção de tripanossomatídeo, os parasitas seriam cultivados em LIT até a fase log, criopreservados, e depositados na coleção de *Trypanosoma* de selvagens e mamíferos domésticos e Vetores (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil).

4.5.5.2 PCR de tripanossomíase

Os isolados foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (0,15 M, pH = 7,2; centrifugação: 4000 rpm durante 15 min a 4 °C). Após o terceiro procedimento, fez-se o armazenamento dos peletes a -20 °C durante a noite. Os sedimentos foram ressuspensos em 50 µl de solução de TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) e incubados (56°C durante 2h) com 10 µl de proteinase K (5 mg/ml) e 50 µl de 10% dodecilsulfato de sódio. DNA genômico foi extraído três vezes com 500 µl de fenol-clorofórmio (1: 1) e uma vez com 500 µl de clorofórmio antes da precipitação com 45 µl de acetato de sódio 3M e 900 µl de etanol (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Os peletes obtidos após centrifugação seguiram para suspensão em 100 µl de água destilada. Estimou-se a concentração do DNA após a medição da absorvância a 260 nm. Após a diluição com água destilada, foi obtida a concentração final de molde (50 ng/µL).

A amplificação por PCR multiplex do espaçador não transcrito do gene mini-exon seria realizada (FERNANDES et al., 2001) pois esta técnica classifica a população de *T. cruzi* como TC I (correspondente a TcI DTU), TC II (TC II, TCV ou TcVI DTUs) e zimodema 3 (Tc III ou TC IV DTUs) (ALIAGA; BRENIÈRE; BARNABÉ, 2011), e também detecta *Trypanosoma rangeli*. As amostras que apresentassem TCII/TCV/ou padrões de bandas

TcVI TcIII/TCIV seriam sujeitos a amplificação por PCR do gene 1f8 nuclear, seguida de RFLP. A análise dos fragmentos de DNA digeridos com a enzima de Alw21I (ROZAS et al., 2007), e / ou de histona 3 (H3), seguiria para análise de RFLP dos fragmentos digeridos com a enzima de Alul (WESTENBERGER et al., 2005).

Todas as reações foram incluídas água destilada estéril como controle negativo e amostras a partir das estirpes de *T. cruzi* de cada genótipo como controles positivos. Após eletroforese, os produtos de PCR amplificados foram visualizados em géis de agarose corados com brometo de etídio (2%) sob luz ultravioleta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados estão expressos na tabela 1, mostrando uma negatividade para todos os testes, exceto o PCR de sangue de um dos tatus, que mostrou-se positivo para o *T. cruzi*.

Patógeno	Tecido	Teste	Resultados
<i>T. gondii</i>	Baço, coração e pulmão	PCR	Negativo
<i>Leishmania</i> sp.	Baço e fígado	PCR	Negativo
<i>Leptospira</i> sp.	Rins	PCR	Negativo
	Sangue	MAT*	Negativo
<i>T. cruzi</i>	Sangue	PCR	1 animal positivo
	Sangue	Hemocultura	Negativo

Tabela 1. Patógenos pesquisados, tecidos testados e resultados obtidos. *MAT: teste de soroaglutinação microscópica.

Apesar da confirmação de que felinos são hospedeiros definitivos do toxoplasma, existe a possibilidade dos tatus atuarem como hospedeiros intermediários (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015), incluindo sua ação como agente transmissor para humanos. Deps et al. (2020) afirmaram a possibilidade da transmissão de zoonoses através do consumo da carne de tatu. Entretanto, apesar de estudo anterior em região próxima da explorada nessa pesquisa ter identificado o *T. gondii* em *E. sexcinctus* (BARBOSA et al., 2020), nossos animais não estavam infectados, demonstrando um perfil ainda não estabelecido para este animal como reservatório ou apenas portador. Porém, esse achado não descarta a hipótese dos tatus-peba atuarem como fontes de transmissão quando consideramos a dificuldade natural de identificação de *T. gondii* em animais selvagens devido ao número limitado de amostras passíveis de coleta e a ocorrência de baixa densidade do protozoário em animais que encontram-se assintomáticos (DUBEY et al., 2011).

Diversas espécies de mamíferos são capazes de abrigar e ser parasitado pela leptospira, porém não está estabelecido como atuam na transmissão aos humanos (FORNAZARI et al., 2018). Fornazari et al. (2018) identificaram a presença de leptospira em espécies de tatus em outra região do Brasil, o que constata a possibilidade destes atuarem como fontes de contaminação humana, o que discorda do nosso achado, que mostrou-se negativo. Barbosa et al. (2020), em pesquisa em tatus do bioma caatinga, identificaram a presença dos sorogrupos Andamana e Canicola, que não têm expressão significativa na

saúde pública do Brasil. Acreditamos que os roedores continuam sendo as fontes de maior relevância, inclusive no ambiente silvestre (FORNAZARI et al., 2018).

A leishmaniose estava ausente nos animais do nosso estudo. Sabemos que esse microorganismo é um parasita com epidemiologia complexa considerando seu comportamento em vetores e mamíferos (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015), o que dificulta o entendimento, a abordagem e o diagnóstico da doença. Apesar de já haver sido identificada a presença da leishmaniose em tatu na região próxima à estudada (BARBOSA et al., 2020), deve-se atentar para divergências de condições encontradas em períodos de tempo diferentes (DESJEUX, 2004). Os fatores a serem considerados para determinar os padrões de infecção por *Leishmania spp.* são inúmeros, envolvendo pontos inerentes ao hospedeiro, como espécie, estado de saúde, sexo e idade; e do parasita como: estratégias de dispersão e caracteres bioquímicos; ao ambiente, como a ocorrência de estresse ambiental e condições ambientais desfavoráveis; e às condições no momento de encontro dos mesmos (ROCKY et al., 2014), o que dificulta a pesquisa em animais de vida livre que, portanto, não são previamente monitorados.

Desde a descoberta do protozoário *T. cruzi* que tatus vêm apresentando positividade para tal infecção (CAPELLÃO; LAZAR; BONVICINO, 2015). Porém, não conseguimos identificar esse patógeno nos animais pesquisados, com exceção de um tatu que se mostrou positivo no teste de PCR com tecido sanguíneo (o que não teve significado estatístico), sendo confirmado através do sequenciamento genético. O teste molecular utilizado na nossa pesquisa foi a PCR, que apresenta uma boa eficácia quando da ocorrência de quadros agudos, mas não se comporta da mesma forma frente às infecções crônicas, de modo que o resultado negativo deve ser interpretado com cautela por não ser suficiente para evidenciar a ausência de infecção (BERN et al., 2011). Além disso, regiões próximas aos locais de captura dos tatus aqui estudados passaram por surtos da doença (SSP-RN, 2015), necessitando de medidas enérgicas de controle de vetores para romper o ciclo de transmissão. Considerando a interposição entre os ciclos possíveis no estado do Rio Grande do Norte (LILIOSO et al., 2017), as medidas atuam em todos eles direta ou indiretamente.

Sabe-se que no nordeste brasileiro o tatu-peba é utilizado como alimentação (DEPS et al., 2020) e não foram identificados nenhum dos quatro microrganismos pesquisados. Embora haja casuística das enfermidades no local de pesquisa, em seres humanos e espécies animais, não conseguimos estabelecer essa possível relação do tatu-peba atuando como reservatório dos patógenos. Sugerimos estudos epidemiológicos durante maiores períodos de

tempo, diferentes estações climáticas e com maior número de animais a serem realizados na região pesquisada. Ao que parece a espécie *E. sexcinctus* assume um papel ainda não esclarecido na cadeia epidemiológica destes agentes.

6 CONCLUSÃO

A espécie aqui estudada representa um indicador biológico e atua como “sentinela” para diferentes agentes já comprovados e para outros agentes patogênicos com hipótese não confirmada. Nossos achados podem sugerir que mesmo com estudos prévios confirmando a infecção desses animais e apontando-os como peças provavelmente importantes na epidemiologia das enfermidades pesquisadas, o tatu por si só não seria capaz de sustentar a transmissão de agentes infecciosos no meio silvestre, levando-nos a pensar no papel deste mamífero na cadeia epidemiológica nestas enfermidades. Portanto, sugerimos que na região da nossa pesquisa ainda necessita de mais estudos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, N.; LÓPEZ, E.; LEWIS, E. M.; LLEWELLYN, M. S.; GÓMEZ, A.; ROMÁN, F.; MILES, M. A.; YEO, M. Hosts and vectors of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in the Chagas disease endemic region of the Paraguayan Chaco. **Parasitology**, v. 144, p. 884–898, 2017.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. L. P. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ALIAGA, C.; BRENIÈRE, S. F.; BARNABÉ, C. Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, n. 5, p. 1155–1158, 2011.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; LIESENFELD, O.; BURCIAGA-LÓPEZ, B. D.; RAMOS-NEVÁREZ, A.; ESTRADA-MARTÍNEZ, E.; CERRILLO-SOTO, S. M.; CARRETE-RAMÍREZ, F. A.; LÓPEZ-CENTENO, M. L.; RUIZ-MARTÍNEZ, M. M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in Elderly People in a Northern Mexican City. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 12, n. 7, p. 568-574, 2012.
- ALVARADO-OTEGUI, J. A.; CEBALLOS, L. A.; OROZCO M. M.; ENRIQUEZ, G. F.; CARDINAL, M. V.; CURA, C.; SCHIJMAN, A. G.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. **Acta Trop.** v.124, n. 1, p.79–86. 2012.
- ALVES, F. M.; LIMA, J. S.; ROCHA, F. L.; HERRERA, H. M.; MOURÃO, G. M.; JANSEN, A. M. Complexity and multi-factoriality of *Trypanosoma cruzi* sylvatic cycle in coatis, *Nasua nasua* (Procyonidae), and triatomine bugs in the Brazilian Pantanal. **Parasit. vectors.**, v. 9, n. 1, p. 378, 2016.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, B. Environmental Mapping of *Paracoccidioides spp.* in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004606, 2016.
- ASSENGA, J. A.; MATEMBA, L. E.; MULLER, S. K.; MHAMPHI, G. G.; KAZWALA, R. R. Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003607, 2015.
- BARBOSA W. O.; COELHO, T. G.; COSTA, T. O.; PAIZ, L. M.; FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; ANTUNES, J. M. A. P.; FREITAS, C. I. A. Antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.*, and *Leptospira spp.* in Free-ranging Six-banded Armadillos (*Euphractus sexcinctus*) from Northeastern Brazil. **J. of Wildlife Diseases**, v.56, n. 2, 486-488, 2020.
- BERN C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v.24, n.4, p. 655–681, 2011.
- BRASIL. **Fundação Nacional de Saúde – FUNASA**. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Ano 02, n. 06. 2002: 10p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. 121p.
- BRILLHANTE, R. S. N.; MOREIRA FILHO, R. E.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; FECHINE, M. A. B.; De LIMA, R. A. C.; PICANÇO, Y. V. C.;

- CORDEIRO, R. A.; De CAMARGO, Z. P.; QUEIROZ, J. A. N.; De ARAUJO, R. W. B.; De MESQUITA, J. R. L.; SIDRIM, J. J. C. Coccidioidomycosis in armadillo hunters from the state of Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 813-815, 2012.
- BURRIDGE, M. J.; BIGLER, W. J.; FORRESLI, D. J.; HENNMANN, J. M. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. **J Am Vet Med Assoc**, v. 175, n. 9, p. 964-967, 1979.
- CAPELLÃO, R. T.; LAZAR, A.; BONVICINO, C. R. Cingulata e zoonoses na América do Sul. **Bol. Soc. Bras. Mastozool**, v. 73, p. 23-36, 2015.
- CARDONA-CASTRO, N.; BELTRÁN, J. C.; ORTIZ-BERNAL, A.; VISSA, V. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia. **Lepr Rev**, v. 80, p. 424-431, 2009.
- CARDOSO, R. M.; ARAÚJO, N. N. S. L.; ROMERO, G. A. S.; SOUZA, T. T. C. M.; DIETRICH, A. G.; MENDES, J. D.; REIS, M. L.; FERREIRA, J. B. C.; GURGEL-GONÇALVES, M. M. R. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 171, 2015.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 (Suppl. I), p. 31-40, 2009.
- CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 99-101, 2006.
- DEPS P. D.; BL ALVES, B. L.; GRIPP, C. G.; ARAGÃO, R. L.; GUEDES B. V. S.; FILHO, J. B.; ANDREATTA, M. K.; MARCARI, R. S.; PRATES, I. C. A.; RODRIGUES, L. C. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v. 74, n. 4, p. 338-342, 2008.
- DEPS, P.; ANTUNES J. M.; SANTOS, A. R.; COLLIN, S. M. Prevalence of *Mycobacterium leprae* in armadillos in Brazil: A systematic review and metaanalysis. **PLoS Negl Trop Dis** v. 14, n. 3, p.e0008127, 2020.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v.27, n.5, p.305-18, 2004.
- DOMOZYCH, R.; KIM, E.; HART, S.; GREENWALD, J. Increasing incidence of leprosy and transmission from armadillos in Central Florida: A case series. **JAAD Case Rep.**, v. 2, n. 3, p. 189-192, 2016.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
- DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P. A.; MCFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E. B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, n. 11, p. 1139-1147, 2011.
- FERNANDES, O.; SANTOS, S. S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B.; DERRE, R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SANTOS, L. C.; STURM, N. R.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. B.; CAMPBELL, D.; COURA, J. R. A mini- exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 95, n. 1, p. 97-99, 2001.
- FORNAZARI, F.; LANGONI, H. Principal zoonoses in wild mammals. **Vet. Zootec.**, v.21, n. 1, p.10-24, 2014.

- FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; MARSON, P. M.; NÓBREGA, D. B.; TEIXEIRA, C. R. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. **Acta Tropica**, v. 178, p. 205-212, 2018.
- HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. In: ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. New York, Springer, 2015. p. 65-97.
- HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; De BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.
- KERR, L. R. F.; KENDALL, C.; SOUSA, C. A. B.; FROTA, C. C.; RODRIGUES, J. G. L.; FERNANDES, R. L.; BARRETO, M. L. Human-armadillo interaction in Ceará, Brazil: potential for transmission of *M. leprae*. **Acta Tropica**, v. 152, p. 74-79, 2015.
- KIN, M. S.; BRIHUEGA, B.; FORT, M.; DELGADO, F.; BEDOTTI, D.; CASANAVE, E. B. Presence of antibodies against *Leptospira* serovars in *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae), La Pampa province, Argentina. **Rev. argent. microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 41-46, 2015.
- KWOK, S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, Academic Press., 1990, p. 142-145.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; WAKELIN, D.; GILLESPIE, S.; DESPOMMIER, D. D. **Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections – Parasitology**. New York, John Wiley & Sons, 2010, 608p.
- LILIOSO, M.; FOLLY-RAMOS, E.; ROCHA, F. L.; RABINOVICH, J.; CAPDEVIELLE-DULAC, C.; HARRY, M.; MARCET, P. L.; JANE COSTA, J.; ALMEIDA, C. E. High *Triatoma brasiliensis* densities and *Trypanosoma cruzi* prevalence in domestic and peridomestic habitats in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: the source for Chagas disease outbreaks? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.96, n. 6, p. 1456–1459, 2017.
- LILLY, E. L.; WORTHAM, C. D. High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virginia, United States. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 266, 2013.
- LIMA, B. S.; DANTAS-TORRES, F.; CARVALHO, M. R.; MARINHO-JUNIOR, J. F.; ALMEIDA, E. L.; BRITO, M. E. F.; GOMES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 7, n. 9, p. 592–597, 2013.
- LINS, Z. C.; LOPES, M. L. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, n.78, 124-126, 1984.
- MEDRI, I. M. **Ecologia e história natural do tatu-peba, *Euphractus sexcinctus* (linnaeus, 1758), no pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul**. 2008. 187f. Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MEDRI, I. M.; MOURÃO, G. de M.; RODRIGUES, F. H. G. Ordem Xenarthra. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos Do Brasil**. Londrina, Midiograf, 2006, p. 71-99.
- MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.
- MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitol Res**, v. 113, n. 6, p. 2005-2014, 2014.
- NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Vet. Res.**, v. 40, n. 2, p. 26-23, 2009.

- OLIVEIRA, S. V.; ARSKY, M. L. N. S.; CALDAS, E. P. Reservatórios Animais da Leptospirose: Uma Revisão Bibliográfica. **Saúde (Sta Maria)**, v. 39, n. 1, p. 9-20, 2013.
- OROZCO, M. M.; ERIQUEZ, G. F.; AVARADO-OTEGUI, J. A.; CARDINAL, M. V.; SCHIJMAN, A. G.; KITRON, U.; GURTER, R. E. New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 5, p. 872-882, 2013.
- PAIZ, L. M.; FORNAZARI, F.; MENOZZI, B. D.; OLIVEIRA, G. C.; COIRO, C. J.; TEIXEIRA, C. R.; SILVA, V. M. C.; DONALISIO, M. R.; LANGONI, H. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 15, n. 11, p.1-7, 2015.
- RAHMAN, T.; SOBUR, A.; ISLAM, S.; IEVY, S.; HOSSAIN, J.; EL ZOWALATY, M. E.; RAHMAN, A. T.; ASHOUR, H. M. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. **Microorganisms**, v. 8, p.1405, 2020.
- RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina, UEL, 2006, 437p.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.
- ROZAS, M.; DONCKER, S.; ADAUI, V.; CORONADO, X.; BARNABÉ, C.; TIBYARENC, M.; SOLARI, A.; DUJARDIN, J. C. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. **J. Infect. Dis.**, v. 195, v. 9, p. 1381–1388, 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Press, 1989. 1626p.
- SARQUIS, O.; CARVALHO-COSTA, F. A.; OLIVEIRA, L. S.; DUARTE, R.; ANDREA, P. S. D.; OLIVEIRA, T. G.; LIMA, M. M. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. **J Vector Ecol.**, v.35, n. 2, p.385-94, 2010.
- SECRETARIA DE SAÚDE PÚBLICA DO RIO GRANDE DO NORTE. **Investigação aponta surto de Doença de Chagas em municípios do RN em 2015**. Rio Grande do Norte: 2016. 1p. Disponível em:
<http://www.saude.rn.gov.br/Conteudo.asp?TRAN=ITEM&TARG=111912&ACT=null&PAGE=null&PARM=null&LBL=not%C3%83+cia> Acesso em: 20 ago. 2021.
- SILVA, A. V.; BOSCO, S. M. G.; 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.**, v. 135, n. 1, p. 81-83, 2006.
- SILVA, R. C.; ZETUN, C. B.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ROSA, P. S.; LANGONI, H. *Toxoplasma godii* and *Leptospira spp.* infection in free-ranging armadillos. **Vet. Parasitol.**, v. 157, n. 3-4, p. 291-293, 2008.
- TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. **American trypanosomiasis Chagas disease one hundred years of research**. London, Elsevier, 2010. 870p.
- VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; MINERVINO, A. H.; SANTOS, A. L.; WERTHER, K.; MARVULO, M. F.; SIQUEIRA, D. B.; PENA, H. F.; SOARES, R. M.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic characterization of *Toxoplasma godii* from brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.**, n. 3, n. 3, p. 276–283, 2014.

- VRIES, S. G.; VISSER, B. J.; NAGEL, I. M.; GORIS, M. G. A.; HARTSKEERL, R. A.; GROBUSCH, M. P. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: A systematic review. **J. Infect. Dis.**, v. 28, p. e47– e64, 2014.
- WESTENBERGER, S. J.; BARNABÉ, C.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 527–543, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva, technical report series, n. 949. 2010: 187p.
- YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G. A.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J. S.; GAUNT, M. W.; De ARIAS, A. R.; MILES, M. A. 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.**, v. 35, n. 2, p. 225-233, 2005.

APÊNDICE A – Artigo submetido ao Emerging Infectious Diseases journal
Letters

Research for *Trypanosoma cruzi* in armadillos (*Euphractus sexcinctus*) in hunting and consumption area

Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros Oliveira¹, José Artur Brilhante Bezerra², Gabriela Hémylin Ferreira Moura², Ana Carolina Yamakawa³, Mariana Guimarães Nilsson³, Jéssica da Silva Ferreira⁴, Felipe Fornazari⁵, Hélio Langoni⁵, João Marcelo Azevedo de Paula Antunes^{6*}.

¹Veterinary, MSc. Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil. Av. Francisco Mota, 572, Campus leste, Bairro Costa e Silva, Mossoró-RN – CEP: 59.625-900.

²Veterinarians, BSc. Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil. Av. Francisco Mota, 572, Campus leste, Bairro Costa e Silva, Mossoró-RN – CEP: 59.625-900.

³Veterinarians, BSc. Department of Veterinary Hygiene and Public Health (DHVSP), School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University (UNESP), Rubião Jr., Botucatu, SP, Brazil. Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n - UNESP - Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618687.

⁴Veterinary, MSc. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁵Veterinarians, Ph.D. Department of Veterinary Hygiene and Public Health (DHVSP), School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University

(UNESP), Rubião Jr., Botucatu, SP, Brazil. Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n - UNESP - Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618687.

⁶Veterinary, Ph.D. Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia, Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

*Corresponding author. Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia - Av. Francisco Mota, 572, Campus leste, Bairro Costa e Silva, Mossoró-RN – CEP: 59.625-900. Phone number (84) 3317-8310. Joao.antunes@ufersa.edu.br

Abstract: We investigated the infection by *T. cruzi* in armadillos that inhabit an endemic region for Chagas disease, as they are identified as potential reservoirs of the protozoan. We used blood PCR and blood cultures to research and find *T. cruzi* in an animal, indicating the need for more detailed studies.

Chagas disease has three distinct transmission cycles (domestic, peridomestic and wild) (Alvarado-Otegui et al. 2012) that can occur simultaneously in the same region, being characterized by different species of reservoirs and vectors. More than 150 mammal species are estimated to act as a reservoir for *T. cruzi* in the Americas (Rassi Jr. et al. 2010).

Records of this protozoan in the order Cingulata have been described in *D. novemcinctus*, *E. sexcinctus*, *C. villosus*, *Colobus vellerosus*, *Tolypeutes matacus* and *Cabassous unicinctus* (Yeo et al. 2005; Noireau et al 2009; Telleria et al 2010; Orozco et al. 2013), showing that although armadillos are proven to be reservoirs, little is known about the epidemiological dynamics of *T. cruzi* in these animals.

In a study in northeastern Brazil, in the Caatinga biome, among 17 *T. cruzi*-positive insects that had their food source characterized, three had fed on armadillos, which were characterized as triatomines (Sarquis et al. 2010). This result highlights the participation of

armadillos in the epidemiological cycle of American trypanosomiasis, both in the wild and in the peridomestic cycle. Furthermore, molecular genotyping studies revealed that armadillos are mainly associated with the *T. cruzi*-II genotype (Yeo et al. 2005).

This study aimed to acquire information on the presence of *T. cruzi* circulating among armadillos populations from hunting and consumption areas, referring to their genotypes through molecular biology and serological techniques in order to elucidate the possible epidemiological functions of armadillos of the species *E. sexcinctus* in regions located in the semiarid region of the state of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil.

We worked with 20 armadillos of the species *E. sexcinctus*, from a Brazilian hyperendemic area for leprosy (Deps et al. 2020). In the studied area (Mossoró, RN, Brazil) only one study collected armadillos samples for Leishmaniasis, Leptospirosis and Toxoplasmosis (Barbosa et al. 2020), and none for the analysis of Trypanosomiasis. The animals in our study were captured with the help of local hunters, at location 5°28'47.0"S 36°31'17.9"W, license No. 50564-1 from the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), which appears in the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO) and authorized (n. 23091.002959/2016-43.) by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of UFERSA.

Also in 2016, in May, the first 10 animals were collected. Before that, armadillos had been identified through tags still at the capture site and transported to the city of Mossoró, specifically to the Wild Animals laboratory of the Federal Rural University of the Semi-arid (UFERSA) and remained there for 48 hours in the attempt to ease the stress of capture and displacement. Subsequently, the animals were weighed for intramuscular application of 4mg/kg of tiletamine-zolazepam (Zoletil® 50, Virbac, Brazil), with the objective of allowing the inspection of the animal as a whole and the identification of possible alterations indicative of other pathologies. Subsequently, using a 22 G 1 ¼ needle attached to a 10 mL

sterile syringe, blood was collected by accessing the subclavian veins. The collected blood was divided for two surveys so that a portion contained in 13 × 75 mm volume 3.0 mL BD Vacutainer® tubes containing 3.4 mg spray-coated K₂EDTA (Becton Dickinson) was sent to the clinical laboratory from the UFERSA Veterinary Hospital for subsequent sending to blood culture. The other complementary part was placed in BD (Becton Dickinson) vacutainer tubes (Becton Dickinson) of 16 x 100 mm, volume of 10 mL, simple / without additive and allowed to coagulate for 1 h at room temperature (25 °C), followed by centrifugation (1500 xg for 15 min at 4 °C) to produce fully separated serum and were assigned to another study.

The last procedure performed with the animals was euthanasia, performed with the administration of 2.56 mEq / kg (1 mL / kg of a 19.1% solution of potassium chloride intravenously, which was only started when the loss was detected of the corneal reflex in armadillos submitted to collections. With the confirmation of the animal's death, samples of spleen and liver were collected and placed in eppendorfs and immediately submitted to freezing to investigate other diseases. Other collections were made from 10 more animals captured, in the month of June of the same year, which were submitted by the same protocol.

To assess *T. cruzi* infection in armadillos, blood cultures (HC) were performed under sterile conditions, according to Alves et al. (2016) and PCR (Sambrook et al. 1989).

Since the discovery of the protozoan *T. cruzi*, armadillos have been positive for this infection (Capellão et al. 2015). However, we were not able to identify this pathogen in the researched animals, with the exception of one armadillo that was positive in the PCR test with blood tissue (which had no statistical significance). The molecular test used in our research was the PCR, which has good efficacy when acute conditions occur, but does not behave in the same way against chronic infections, so the negative result must be interpreted with caution as it is not enough to evidence the absence of infection (Bern et al. 2011). In

addition, regions close to the capture sites of armadillos studied here have experienced disease outbreaks (SUS/SSP 2015), requiring strong vector control measures to break the transmission cycle. Considering the interposition between the possible cycles in the state of Rio Grande do Norte (Lilioso et al. 2017), the measures act on all of them directly or indirectly.

Our findings may suggest that even with previous studies confirming the infection of these animals and pointing them out as probably important pieces in the epidemiology of the researched disease, the result of only one positive armadillo alone is not capable of sustaining the viability of this species to act as a reservoir, therefore, more detailed studies are needed in the researched region to clarify the real importance of armadillos in the epidemiological chain of Chagas disease.

LITERATURE CITED

- Alvarado-Otegui JA, Ceballos LA, Orozco MM, Enriquez GF, Cardinal MV, Cura C, Schijman AG, Kitron U, Gürtler RE. 2012. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta Trop* 124(1): 79–86.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375(9723): 1388-1402.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* 40(2): 26-23.
- Orozco MM, Enriquez GF, Alvarado-Otegui JA, Cardinal MV, Schijman AG, Kitron U, Gürtler RE. 2013. New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *Am J Trop Med Hyg* 88(5): 872-882.
- Telleria J, Tibayrenc M. 2010. *American trypanosomiasis Chagas disease one hundred years of research*. Elsevier, London, 870pp.

- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, et al. 2005. 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* 35(2): 225-233.
- Deps P, Antunes JM, Santos AR, Collin SM. 2020. Prevalence of *Mycobacterium leprae* in armadillos in Brazil: A systematic review and metaanalysis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(3): e0008127.
- Barbosa WO, Coelho TG, da Costa TO, Paiz LM, Fornazari F, Langoni H, Antunes JMAP, Freitas CIA. 2020. Antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., and *Leptospira* spp. in Free-ranging Six-banded Armadillos (*Euphractus sexcinctus*) from Northeastern Brazil. *J Wildl Dis* 56(2): 000-000.
- Alves FM, Lima JS, Rocha FL, Herrera HM, Mourão GM, Jansen AM. 2016. Complexity and multi-factoriality of *Trypanosoma cruzi* sylvatic cycle in coatis, *Nasua nasua* (Procyonidae), and triatomine bugs in the Brazilian Pantanal. *Parasit Vectors* 9(1): 378.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York, 1626pp.
- Capellão RT, Lazar A, Bonvicino CR. 2015. Cingulata e zoonoses na Américas do Sul. *Bol Soc Bras Mastozool* 73: 23-36.
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 24(4): 655–681.
- Secretaria de Saúde Pública. 2016. Investigação aponta surto de Doença de Chagas em municípios do RN em 2015, <http://www.saude.rn.gov.br/Conteudo.asp?TRAN=ITEM&TARG=111912&ACT=null&PAGE=null&PARM=null&LBL=not%C3%83+cia>. Accessed August 2021.

Lilioso M, Folly-Ramos E, Rocha FL, Rabinovich J, Capdevielle-Dulac C, Harry M, Marcet PL, Costa J, Almeida CE. 2017. High *Triatoma brasiliensis* Densities and *Trypanosoma cruzi* Prevalence in Domestic and Peridomestic Habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The Source for Chagas Disease Outbreaks? *Am. J. Trop. Med. Hyg* 96(6): 1456–1459.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, Andrea PSD, de Oliveira TG, Lima MM. 2010. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J Vector Ecol* 35(2):385-94.

APÊNDICE B – Artigo submetido ao Journal of Wildlife Diseases

Letters

Absence of zoonotic agents in caatinga armadillos

Ilanna Vanessa Prito de Medeiros Oliveira¹, José Artur Brilhante Bezerra¹, Gabriela Hémylin Ferreira Moura¹, Ana Carolina Yamakawa², Mariana Guimarães Nilsson², Felipe Fornazari², Hélio Langoni², Jéssica da Silva Ferreira³, Douglas McIntosh³, Philip NoelSuffys⁴, João Marcelo Azevedo de Paula Antunes^{5*}.

¹Department of Animal Science, Federal Rural University of Semi-Arid – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil - Av. Francisco Mota, 572, Campus leste, Bairro Costa e Silva, Mossoró/RN, Brazil. – CEP: 59.625-900.

²Department of Veterinary Hygiene and Public Health (DHVSP), School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University (UNESP), Rubião Jr., Botucatu, SP, Brazil. Av. Prof. Montenegro, s/n, Vila Paraíso, Botucatu/SP. CEP: 18.618-687.

³ Multiuser Molecular Biology Laboratory, Department of Animal Parasitology, Institute of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil. BR-465. Km 7, Seropédica – Rio de Janeiro-RJ, Brazil – CEP: 23.897-000.

⁴Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro - CEP: 21040-900.

⁵Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia Veterinary Hospital, Federal Rural University of the Semi-arid – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

*Corresponding author. Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia Veterinary Hospital - Av. Francisco Mota, 572, Campus leste, Costa e Silva, Mossoró/RN, Brazil – CEP: 59.625-900. Phone number (84) 3317-8310. Joao.antunes@ufersa.edu.br

Word count: 817

Absence of zoonotic agents in caatinga armadillos

Key words: *Euphractus sexcinctus*. Zoonosis. Brazil. Toxoplasmosis. Leishmaniosis. Leptospirosis.

Absence of zoonotic agents in caatinga armadillos

Abstract: Researched for *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp* and *Leptospira spp* in *Euphractus sexcinctus* from northeastern Brazil. Used PCR to research with blood tissues, spleen, liver, heart, lung and kidney beyond microscopic agglutination test for *Leptospira spp*. Results were negative, not to establish the role of armadillos in epidemiology of zoonoses addressed.

In Brazil, free-living armadillos have been linked to certain infections, including leprosy (1), toxoplasmosis, leptospirosis and Leishmaniasis (2).

The participation of armadillos in the leprosy cycle, caused by *Mycobacterium leprae*, is established in the United States of America, being considered zoonosis (3). Toxoplasmosis is distributed worldwide and caused by *Toxoplasma gondii*, infecting animals and humans after ingestion of oocysts from the environment, food contaminated with feces from infected felines or bradyzoites in cysts of intermediate hosts. Leptospirosis is a worldwide disease, caused by bacteria of the *Leptospira* genus, transmitted by direct or indirect contact with the urine of infected animals. *Leishmaniasis*, caused by protozoa of the *Leishmania* genus, causes a serious public health problem worldwide. It is transmitted by sandflies that become

infected during blood meal in mammalian hosts. Therefore, we aimed to elucidate the probable role of armadillos of the species *Euphractus sexcinctus* in the epidemiology of Toxoplasmosis, Leptospirosis and *Leishmaniasis* in a hyperendemic region for leprosy in armadillos (4) and in humans in Brazil.

We worked with 20 armadillos of the species *E. sexcinctus*, from a hyperendemic area (Mossoró, RN, Brazil) in Brazil for leprosy (1), *Leishmaniasis* and Leptospirosis (Ministério da Saúde, 2019), where only one study conducted research of *Leishmaniasis*, Leptospirosis and Toxoplasmosis in armadillos (6). They were captured with the help of local hunters, at location 5°28'47.0"S 36°31'17.9"W, license No. 50564-1 from the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), which appears in the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO), and authorized (n. 23091.002959/2016-43.) by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Table shows the methodologies used and results obtained.

Table. Tests performed, fabrics used to research each pathogen and their results

Pathogen	Tissue	Test	Results
<i>T. gondii</i>	Spleen, heart and lung	PCR	Negative
<i>Leishmania</i> sp.	Spleen and liver	PCR	Negative
<i>Leptospira</i> sp.	Kidney	PCR	Negative
	Blood	MAT*	Negative

. *MAT: microscopic agglutination test

Despite the confirmation that felines are definitive hosts of toxoplasma, the participation of the armadillo as an intermediate host is considered (2), including its action as a transmitting agent for humans. Deps et al. (1) affirmed the possibility of transmission of zoonoses through the consumption of armadillo meat and even though a previous study in a region close to the one explored in this research has identified *T. gondii* in *E. sexcinctus* (6), our animals were not infected, demonstrating a profile not yet established for this animal as

a reservoir or just a carrier. However, this finding does not rule out the hypothesis that armadillos act as sources of transmission when we consider the natural difficulty in identifying *T. gondii* in wild animals due to the limited number of collectibles and the occurrence of low density of the protozoan in animals that let's go asymptomatic (7)

Several species of mammals are capable of harboring and being parasitized by *Leptospira*, but it is not established how they would act in transmission to humans (8). Fornazari et al. (8) identified the presence of *Leptospira* in armadillos (nine-banded armadillo) species in another region of Brazil, which confirms the possibility of these act as sources of human contamination, which disagrees with our finding. Barbosa et al. (6), in a research on armadillos in the caatinga biome, identified the presence of the Andamana public and Canícola serogroups, which have no express expression in Brazilian health. We believe that rodents continue to be the sources of the largest company, including in the wild (8).

Leishmania is a parasite with complex epidemiology considering its behavior in vectors and mammals (2), which makes it difficult to understand, approach and diagnose the disease. Although the presence of *Leishmania* in armadillos has already been identified in the region close to the one studied (6), attention should be paid to divergences in conditions found in different periods of time (9). Factors to be considered to determine patterns of infection by *Leishmania* sp. they are numerous, involving aspects inherent to the host, such as species, health status, sex and age; and of the parasite as dispersal strategies and biochemical characters; to the environment, such as the occurrence of environmental stress and unfavorable environmental conditions; and the conditions at the time of meeting them (10), which makes it difficult to research free-living animals that, therefore, are not previously monitored.

It is known that in northeastern Brazil the armadillo is used as food (1) and the presence of the 3 pathogenic microorganisms investigated was not identified. Although there is a case series of diseases at the research site, in humans and animal species, we were unable to establish this possible relationship of yellow armadillo acting as a reservoir for pathogens. We suggest epidemiological studies for longer periods of time, climatic seasons and with a greater number of animals should be carried out in the researched region. It seems that the species *E. sexcinctus* plays an unclear role in the epidemiological chain of these agents.

REFERENCES

1. Deps P, Antunes JM, Santos AR, Collin, SM. Prevalence of *Mycobacterium leprae* in armadillos in Brazil: A systematic review and meta-analysis. PLoS Neglected Tropical Diseases [internet]. 2020 Mar. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008127>
2. Capellão RT, Lazar A, Bonvicino CR. Cingulata e zoonoses na Américas do Sul. Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia [internet]. 2015 Aug. <https://www.researchgate.net/publication/295401247>
3. 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 [internet]. 2011 Apr. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1010536>
4. da Silva Ferreira J, de Carvalho FM, Vidal Pessolani MC, de Paula Antunes JMA, de Medeiros Oliveira IVP, Ferreira Moura GH, et al. Serological and molecular detection of infection with *Mycobacterium leprae* in Brazilian six banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*). Comp Immunol Microbiol Infect Dis [internet]. 2020 Feb. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101397>

5. Ministério da Saúde, Plataforma integrada de vigilância em saúde, RN, Brazil. 2019 [cited 2021 Ago 20]. <http://plataforma.saude.gov.br/cidades/>
6. Barbosa WO, Coelho TG, da Costa TO, Paiz LM, Fornazari F, Langoni H et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.*, and *Leptospira spp.* in Free-Ranging Six-Banded Armadillos (*Euphractus sexcinctus*) from Northeastern Brazil. Journal of Wildlife Diseases [internet]. 2020 Mar. <https://doi.org/10.7589/2019-06-165>
7. Dubey JP, Velmurugan GV, Rajendran C, Yabsley MJ, Thomas NJ, Beckmen KB et al. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. International Journal for Parasitology [internet]. 2011 Jul. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.06.005>
8. Fornazari F, Langoni H, Marson PM, Nóbrega DB, Teixeira CR. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond ro-dents. Acta Tropica [internet]. 2018 Feb. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019>
9. Desjeux P. *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis [internet]. 2004 Sep. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
10. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife [internet]. 2014 Aug. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>

ANEXO



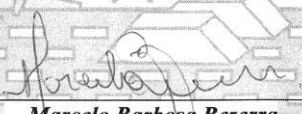
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 10 de junho de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação de infecção natural da Hanseníase em tatus das espécies Dasypus novemcinctus e Euphractus sexcinctus através de testes rápidos”, protocolo n. 23091.002959/2016-43 sob a responsabilidade de João Marcelo Azevedo de Paula Antunes – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião de 26/04/2016.

N. de solicitação ou autorização do SISBIO	50564-1
Atividade (s)	Captura, Coleta de espécimes
Espécie/Grupo taxonômico	Euphractus sexcinctus Dasypus sexcinctus
Local (is)	Mossoró-RN


Marcelo Barbosa Bezerra
 Presidente CEUA