

Sílvia Cristina Barboza Pedrini

**Pesquisa de *Mycobacterium leprae* e outras Micobactérias
em Tatus Selvagens**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais, área de concentração em Biologia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes

Botucatu – SP
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Pedrini, Sílvia Cristina Barboza.

Pesquisa de *Mycobacterium leprae* e outras micobactérias em Tatus Selvagens / Sílvia Cristina Barboza Pedrini. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Carlos Alberto de Magalhães Lopes
Assunto CAPES: 40601005

1. Hanseníase 2. Hamster como animal de laboratório - Aspectos imunológicos 3. Epidemiologia 4. Saúde pública

CDD 616.998

Palavras chave: *Cabassous sp*; *Dasybus novemcinctus*; *Euphractes sp*; *Mycobacterium leprae*; PCR; Tatus selvagens

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP – campus de Botucatu.

DEDICATÓRIA

Ao meu filhinho Pedro Henrique,

... Meu Anjo de Luz,

o Maior Presente que Deus me deu!!!

Ao meu amado esposo Maurício,

*Por todo Amor,
compreensão e apoio durante estes oito
anos de união ...*

AMO MUITO VOCÊS !

Aos meus queridos pais, Diva e Orlando,

Pelo carinho e apoio,

Pelo exemplo de dignidade e respeito.

Minha gratidão é Eterna!

*Ao meu irmão Fábio e
meus queridos sobrinhos lindos
Lucas e Brenda.*

*Aos meus queridos avós Cinira e Orlando,
Pela família linda que me deram!*

AMO VOCÊS !

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Por estar sempre ao meu lado...

“Nada temas, pois eu te resgato,

Eu te chamo pelo nome: És meu!

Porque és precioso aos meus olhos,

Porque eu te aprecio e te amo.” (Is 43, 1-

4)

Ao Meu Orientador,

Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes

*Meu exemplo de pessoa e de Mestre,
Obrigada por toda dedicação, estímulo e confiança,
Pelos ensinamentos e o carinho que eu sempre vou levar comigo!...
Foi mesmo a realização de um Sonho e uma Honra!!!*

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isto existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

Aos docentes, funcionários e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia :

☞ *Ao Dr. Eduardo Bagagli,, pelas portas abertas... pela confiança, amizade e pelo carinho imenso, por compartilhar as alegrias das conquistas... por todo incentivo e estímulo! Foi um Prazer imenso trabalhar com você!!!*

☞ *Ao Dr. João Candeias, pela prontidão em ajudar, por tantas e tantas dúvidas esclarecidas, pelas sugestões valiosíssimas que enriqueceram tanto meu trabalho, pelo apoio e amizade!*

☞ *Aos Professores Dr. Silvio, Dra. Terue, Dra. Vera, Dr. Ary,, Dr. Ramon,, Dr. Maurício , Dra. Lourdes, Dr. João Pessoa, Dra. Terezinha, Dra. Ângela e Dra. Alexandrinapela convivência agradável e amizade!*

☞ *Aos meus amigos de batalha:*

*Raquel, Sandra, Assis, Virgínia, Gabi, Gi, Nilza, Smurf, Jiraia, Keila e Thiago...
pela amizade, pela maravilhosa companhia durante esses anos!...Foi uma delícia estar com vocês!!!*

☞ *Às amigas da secretaria, Sônia Faraldo e Nice, pelo carinho e incentivo, pela força e amizade!*

☞ *Aos amigos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia: Pedro e Tino, Lula, Luís Alquati, e Dito, pela amizade e carinho!!!*

Aos Pesquisadores e funcionários do Instituto Lauro de Souza Lima:

☞ *Dra. Patrícia Sammarco Rosa, pela oportunidade, confiança e pelo apoio!!! Pelas sugestões e idéias valiosíssimas para o projeto e para a Tese... Por não poupar esforços em ajudar e Fazer Acontecer!!!*

☞ *Dra. Idá Maria Foschiani Didas Baptista, pela disponibilidade, pelas valiosíssimas sugestões na elaboração do projeto, pela confiança e amizade!*

☞ *Aos funcionários: Sílvio, Da Matta, Sr. Dito , Thiago, Mara, Heloísa e Lazara, que participaram do desenvolvimento deste trabalho!*

Muito obrigada!



E de um modo muito especial,

☞ *À Dra. Rita de Cássia Trindade e à sua equipe, da Universidade Federal de Sergipe. Obrigada pela oportunidade , pelo Carinho e pela Amizade!*

☞ *Aos Amigos do CBAB/Cnpq-2005: Tony, Reinalda, Patrícia, D'Ângellis, Gerlane, Gisele, Anderson, Fernanda, Dayse, Regina, Marcílio, Cecília, Paula, Júlia, Andréia...*

Adoro vocês!!!

Aos Docentes da Faculdade de Medicina de Botucatu:

☞ *À Dra. Jussara Marcondes Machado, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pela oportunidade de ingressar no Doutorado.*

☞ *Ao Dr. Domingos Alves Meira e Dr. Paulo Câmara Marques Pereira, pela acessibilidade e disponibilidade!*

☞ *Ao Prof. Dr. Hélio Langoni, pela confiança, amizade e por estar sempre presente!*

☞ *Aos funcionários da seção de Pós-Graduação, em especial à Regina Spadin e Nathanael Pinheiro Salles, pela amizade e colaboração.*

☞ *Às bibliotecárias, Rosemary Cristina da Silva (Meire) e Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.*

☞ *À FUNDAÇÃO PAULISTA CONTRA A HANSENÍASE, pelo apoio financeiro.*

A todos, Muito Obrigada!

Abreviaturas

ADM: micobactérias derivadas de tatus
ATCC: *American Type Culture Collection*
BAAR: bacilos álcool-ácido resistentes
BSA: soro-albumina bovina
DNA: ácido desóxi-ribonucleico
dNTP: desoxinucleotídeo trifosfatado
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl: ácido clorídrico
hsp65: proteína do choque térmico de 65 kDa
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ILSL: Instituto Lauro de Souza Lima
IP: intraperitoneal
KCl: cloreto de potássio
LJ: Löweinstein-Jensen
MAC: Complexo *Mycobacterium avium*
MgCl₂: cloreto de magnésio
N_{2(líq)}: nitrogênio líquido
NaCl: cloreto de sódio
OMS: Organização Mundial da Saúde
pb: pares de bases
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PEH: Plano de Eliminação da Hanseníase
PQT: poliquimioterapia
PRA: PCR-*restriction enzyme analysis*
PV: peso vivo
RFLP: *restriction-fragment-length polymorphisms*
RNAr: ácido ribonucleico ribossômico
SDS: dodecil-sulfato de sódio
SINAN: Sistema de Informações de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde
SNP: *single-nucleotide polymorphisms*
TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0
TET: Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1mM e Triton X-100 1%

Introdução	1 8
Aspectos Gerais da Hanseníase e seu Agente Etiológico.....	1 8
O tatu como Indicador Biológico de Micobacterioses.....	2 3
Aspectos Moleculares.....	2 6
Objetivos	2 8
Justificativa	2 8
Delineamento Experimental: padronização da metodologia.....	3 0
Material e métodos	3 2
1. Culturas de Micobactérias.....	3 3
2. Animais.....	3 3
2.1 Hamsters.....	3 3
2.1.1. Protocolo de Imunossupressão.....	3 3
2.2. Tatus.....	3 3
2.2.1. Tatu experimentalmente infectado por <i>M. leprae</i>	3 3
2.2.2. Tatus selvagens.....	3 4
2.3. Outras espécies.....	3 4
3. Eutanásia dos animais.....	3 6
4. Necrópsia e obtenção de amostras.....	3 6
5. Caracterização microbiológica.....	3 6
5.1. Descontaminação e digestão.....	3 6
5.2. Baciloscopia semi-quantitativa para diagnóstico de tuberculose e outras micobacterioses.....	3 6
5.3. Cultura.....	3 7
6. Caracterização molecular	3 7
6.1. Extração do DNA das culturas de micobactérias.....	3 7
6.2. Amplificação do gene que codifica a hsp65 kDa.....	3 7
6.3. PRA.....	3 8
6.4. Determinação do melhor método de extração de DNA tecidual.....	3 9
6.4.1. Protocolo de Extração nº 1: NaCl.....	3 9
6.4.2. Protocolo de Extração nº 2: Extração fenólica com criofratura.....	4 0
6.4.3. Protocolo de Extração nº 3: Extração fenólica com criofratura e pré-tratamento.....	4 0
6.5. Amplificação do gene RLEP de <i>M. leprae</i>	4 2
6.6. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados.....	4 2
Resultados	4 3
I – Padronização das Técnicas	4 4
1. Culturas de micobactérias.....	4 4
2. Animais.....	4 8
2.1. Hamsters imunossuprimidos.....	4 8
2.1.1. Achados de necrópsia.....	4 8
2.1.2. Baciloscopia semi-quantitativa para diagnóstico de tuberculose e outras micobacterioses	5 0

2.1.3. Cultura.....	5 0
2.1.4. Determinação do melhor método de extração de DNA tecidual.....	5 1
2.1.5. Amplificação do gene da <i>hsp65</i> , na tentativa de realizar o PRA a partir de amostras de tecido de hamsters experimentalmente infectados por <i>Mycobacterium avium</i>	5 3
3. Tatu experimentalmente infectado por <i>M. leprae</i>	5 3
3.1. Amplificação de RLEP de <i>M. leprae</i>	5 3
3.2. Limite de detecção da PCR.....	5 4
II – Pesquisa em Animais selvagens	5 5
1. Tatus selvagens.....	5 5
1.1. Achados de necrópsia.....	5 5
1.2. Caracterização microbiológica	5 5
1.2.1. Baciloscopia semi-quantitativa.....	5 5
1.2.2. Cultura.....	5 5
1.3. Caracterização molecular.....	5 5
1.3.1. Pesquisa de RLEP de <i>M. leprae</i> em amostras de tatus.....	5 5
1.3.2. Pesquisa de RLEP em outros animais selvagens.....	6 0
1.3.3. Seqüenciamento genômico das amostras de tatus.....	6 0
Discussão	6 3
Conclusões	7 3
Referências bibliográficas	7 5
Resumo	8 5
Abstract	8 6
Anexo I: Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal	
Anexo II: Licença do IBAMA.....	
Anexo III: Árvore filogenética representativa das seqüências de RLEP de tatu experimentalmente infectado por <i>M. leprae</i>	

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais da Hanseníase e seu Agente Etiológico

A hanseníase é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, de notificação compulsória em todo o território nacional, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, o bacilo de Hansen.

Atualmente são conhecidas 109 espécies distintas no gênero *Mycobacterium*, o único da família *Mycobacteriaceae* (MEDLINE: mycobacterium + sp. + nov.). Estes microrganismos correspondem, em sua totalidade, a bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), aeróbios, imóveis, com variados fenótipos relacionados à taxa de crescimento, atividade metabólica, aspecto das colônias, distribuição ambiental e potencial patogênico para os hospedeiros eucariotos (Ducati *et al.*, 2004).

O *M. leprae* ainda apresenta características biológicas pouco conhecidas, tanto pela ausência de cultivo *in vitro*, quanto pelo seu metabolismo lento, com período de duplicação de 13 dias, que levam a um período de latência da doença extremamente prolongado, cerca de dois a cinco anos em humanos (OPROMOLLA, 2000).

Textos antigos descrevem a existência de hanseníase na China, Índia e Egito em aproximadamente 600 anos a.C., e esqueletos com marcas da doença foram encontrados no Egito (Browne, 1994).

Monot e colaboradores (2005), estudando o polimorfismo de nucleotídeos simples ("single-nucleotide polymorphisms" ou SNPs) no genoma de *M. leprae*, verificaram que a sua frequência foi de aproximadamente um para cada 28 kb, o que é significativamente menor que em outros patógenos humanos. Isto indica que o genoma do *M. leprae* é excepcionalmente bem conservado e que o bacilo de Hansen é altamente clonal.

Foi descoberta a existência de uma relação entre a origem geográfica do paciente hanseniano e o perfil de SNP, referidos como de 1 a 4. O SNP tipo 1 ocorre predominantemente na Ásia, região do Pacífico e Leste da África. O SNP tipo 4 é encontrado no Oeste da África e Caribe; o tipo 3, na Europa, Norte da África e Américas. O SNP tipo 2 é o mais raro, tendo sido identificado somente na Etiópia, Malawi, Nepal, Norte da Índia e Nova Caledônia.

Pela análise de 175 espécimes clínicos de 21 países, em todos os cinco continentes, os autores acreditam que a hanseníase tenha se originado na África Oriental e espalhou-se com as migrações humanas sucessivas. Do subcontinente indiano, a hanseníase deve ter sido introduzida na Europa pelos soldados gregos que retornaram da

Índia nas campanhas de Alexandre, "O Grande". Da Grécia, a doença se espalhou pelo Mediterrâneo com os romanos introduzindo a hanseníase na parte oeste da Europa. Da Índia, a hanseníase deve ter-se espalhado para a China, Japão, e ilhas do Pacífico, no século XIX. A hanseníase foi provavelmente introduzida no Oeste da África por exploradores infectados, escravos ou colonizadores da Europa ou do Norte da África. Do Oeste da África, a doença atingiu as Américas nos últimos 500 anos (MONOT *et al.*, 2005).

O Oeste e Sudoeste da África provavelmente foram povoados há mais de 50.000 anos por imigrantes do Leste da África antes da chegada do homem na Eurásia. Do Oeste da África a hanseníase foi introduzida pelo tráfico de escravos no século XVIII para o Caribe, Brasil, e, provavelmente, em outras partes da América do Sul, porque cepas de *M. leprae* com o mesmo SNP, tipo 4, foram caracterizadas nessas regiões.

A cepa de *M. leprae* responsável pela doença na maioria das Américas (SNP tipo 3) é circunscrita à Europa e Norte da África, o que indica que o colonialismo e a imigração do Velho Mundo provavelmente contribuíram para a introdução da hanseníase no Novo Mundo. Nos séculos XVIII e XIX, quando os estados do meio-oeste dos Estados Unidos foram povoados por imigrantes escandinavos, muitos casos de hanseníase foram relatados e, na época, estava ocorrendo uma grande epidemia na Noruega.

Atualmente, a doença apresenta-se como uma endemia de difícil controle nos países tropicais. O *M. leprae* é a única espécie do gênero cujo cultivo *in vitro* ainda não foi conseguido, o que representa também um sério obstáculo ao progresso das pesquisas em hanseníase em relação aos mecanismos de patogenia, fontes de infecção e disseminação do agente. Sabe-se que a evolução da hanseníase depende de fatores como predisposição genética e imunológica do hospedeiro. A doença apresenta múltiplas manifestações clínicas, como lesões cutâneas e dos nervos periféricos, levando desde quadros de alteração da sensibilidade até graves deformações do indivíduo. Acredita-se que o principal transmissor seja o doente com as formas multibacilares da moléstia (virchowiana e dimorfa). As vias aéreas superiores parecem ser as responsáveis pela eliminação dos germes, dado o grande número de lesões existentes na mucosa nasal, oral e laríngea. As lesões cutâneas ulceradas podem constituir também uma via de eliminação importante. O diagnóstico é essencialmente clínico, podendo ser complementado pela pesquisa de BAAR a partir das lesões (OPROMOLLA, 2000).

A [Organização Mundial de Saúde \(OMS\)](#) recomenda que o tratamento dos pacientes virchowianos e dimorfos seja feito com poli-quimioterapia (PQT/OMS), com três

drogas principais: dapsona, clofazimina e rifampicina, durante um ano. Os indivíduos paucibacilares devem ser tratados durante seis meses, utilizando-se a dapsona e rifampicina.

De acordo com a OMS, através dos relatos de 115 países e territórios, o número de casos de hanseníase no início de 2006 atingiu 219.826, enquanto o número de novos casos detectados durante 2005 era 296.499. O número de casos detectados caiu globalmente em mais de 111.000 casos (uma redução de 27%) durante o ano de 2005, comparado com 2004. Durante os últimos quatro anos, o número de novos casos tem continuado a diminuir em cerca de 20% ao ano.

Pontos de elevada endemicidade permanecem em áreas de Angola, Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia (WHO, 2006).

O Brasil e a Índia são os países com maior prevalência da doença. No final de 2005, o Brasil registrou um coeficiente de prevalência de 1,48 casos/10.000 habitantes (27.313 casos em curso de tratamento em dezembro de 2005) e um coeficiente de detecção de casos novos de 2,09/10.000 habitantes (38.410 casos novos em dezembro de 2005) (BRASIL, 2006).

A hanseníase ainda constitui um problema de saúde pública no Brasil, necessitando de medidas para evitar a transmissão da doença, de modo a atingir a meta de eliminação, com um caso/10.000 habitantes em cada município, conforme o Plano de Eliminação da Hanseníase (PEH), elaborado pelo Ministério da Saúde em 1995. O PEH teve, como fundamento, a eliminação global da doença, a detecção intensiva dos casos, a vigilância epidemiológica, a atenção às incapacidades e ao tratamento com PQT/OMS.

Assim como no mundo, a distribuição da hanseníase no Brasil não é uniforme, variando significativamente entre cinco macro-regiões do país. A região Norte possui o maior coeficiente de prevalência (4,02 doentes/10.000 habitantes), sendo considerada hiperendêmica. Já as regiões Sul e Sudeste apresentam a menor prevalência, 0,53 e 0,60 respectivamente (BRASIL, 2006).

Quadro 1: Prevalência e detecção anual da hanseníase no Brasil, por regiões. Fonte: SINAN/DATASUS/MS, 2005. (nº de doentes /10.000 habitantes).

Região	Prevalência	Parâmetro	Detecção	Parâmetro
N	4,02	Médio	5,63	Hiperendêmico
NE	2,14	Médio	3,07	Muito alto
SE	0,60	Baixo	0,88	Médio
S	0,53	Baixo	0,69	Médio
CO	3,30	Médio	4,41	Hiperendêmico
Brasil	1,48	Médio	2,09	Muito alto

A partir das informações do Sistema de Informações de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN) relativas ao ano de 2005, o Estado de São Paulo registrou uma taxa de prevalência de 0,35 doentes/10.000 habitantes, indicador de eliminação da hanseníase enquanto problema de saúde pública.

A distribuição da hanseníase no Estado de São Paulo também varia entre os 645 municípios. Observam-se municípios com coeficientes de prevalência muito baixos, menos que um doente para cada 10.000 habitantes, e municípios com coeficientes altíssimos. Pelo PEH, foram definidos critérios para a identificação de municípios prioritários, que incluem aqueles que registraram, no mínimo, 50 casos para tratamento em dezembro de 2003 e os que diagnosticaram em média, nos últimos cinco anos, no mínimo 10 casos multibacilares.

Os altos índices de prevalência de hanseníase são decorrentes de vários fatores, como as deficiências da rede de saúde pública e de pessoal qualificado para diagnosticar, além da desinformação da população acerca da doença, o que contribui para que aproximadamente 3% dos casos novos sejam diagnosticados tardiamente, com os pacientes já apresentando incapacidades físicas e necessitando de reabilitação (Brasil, 2006).

É prioritário que o diagnóstico seja precoce, antes da eliminação de bacilos, possibilitando a cura do paciente, sem seqüelas e com interrupção da cadeia epidemiológica da infecção.

Diferentemente das demais micobactérias cultiváveis *in vitro*, em que o nicho ecológico do agente etiológico é conhecido, o bacilo de Hansen apresenta a sua ecologia praticamente desconhecida.

Aliados à ausência de isolamento ambiental do bacilo de Hansen, existem outros fatores que também dificultam a elucidação do *habitat* do microrganismo, como a falta de surtos epidêmicos e a baixa reprodutibilidade dos casos de infecção natural, tornando praticamente impossível identificar o local exato onde a infecção foi adquirida. Estes fatores parecem refletir um nicho ecológico bastante restrito do microrganismo.

A ocorrência de hanseníase natural já foi relatada em tatus *Dasybus novemcinctus* e em três espécies de primatas não-humanos *Cercocebus atys* (macacos *mangabeys*), *Pan troglodytes* (chimpanzés) e em um macaco *Cynomolgus* (ROJAS-ESPINOSA & LOVIK, 2001 *apud* VALVERDE *et al.*, 1998), confirmando o fato de que as infecções por *M. leprae* na natureza não são limitadas aos seres humanos (WALSH *et al.*, 1975; MEYERS *et al.*, 1991). Por apresentarem infecção natural, estes animais podem ser considerados indicadores biológicos da ocorrência do microrganismo em uma determinada área.

Paralelamente à endemia hanseníase, as micobactérias pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, e atualmente *M. canetti* e *M. pinnipedii*) são significativas em saúde pública, por causarem a tuberculose. Além destas, as micobactérias atípicas têm tomado nova importância com a epidemia da aids. Tem-se observado que o Complexo *M. avium* (MAC) resulta na infecção bacteriana sistêmica mais comumente associada em pacientes aidséticos com contagem de células CD4+ extremamente reduzida (abaixo de 100/mm³) (WHO, 2005).

O MAC compreende micobactérias de crescimento lento ubíquas no ambiente (solo e água) e são capazes de infectar diversas espécies, como pássaros, suínos e humanos, provocando desde infecções assintomáticas até doenças de elevado significado clínico e freqüentemente fatais (WHO, 2005).

O Tatu como Indicador Biológico de Micobacterioses

Os tatus são mamíferos primitivos, taxonomicamente classificados na superordem Edentata, ordem Xenarthra, juntamente com os tamanduás e preguiças. Suas origens remontam ao período terciário, época do Paleoceno, há aproximadamente 60 milhões de anos (LAGUNA, 1984).

Atualmente, são descritas 20 espécies distintas de tatus, das quais 17 conhecidas somente no Brasil. Da família Dasypodidae, *D. novemcinctus*, popularmente conhecido como tatu de nove bandas ou tatu-galinha (TALMAGE & BUCHANAN, 1954), apresenta distribuição geográfica restrita unicamente às Américas Central e do Sul, tendo sido

introduzido na região sudeste dos Estados Unidos somente no final do século XIX (LAGUNA, 1984), portanto após a colonização humana, e após a introdução da hanseníase no continente americano (MONOT *et al.*, 2005).

No gênero *Euphractus*, o *E. sexcinctus*, conhecido como tatu peba (FRECHKOP & YEPES, 1949; TALMAGE & BUCHANAN, 1954; CABRERA, 1958; MOELLER, 1968) já foi identificado no Brasil, no Pará (THOMAS, 1911), planaltos do Mato Grosso ao Rio Grande do Sul, além de ter sido relatado no Suriname, Nordeste do Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia. Entretanto as características de sistemática e fisiologia são praticamente desconhecidas. Seu tamanho é superior ao das demais espécies, com exceção do *Priodontes maximus* (tatu canastra) e *Dasypus kappleri*. Sua coloração varia de amarelo claro a vermelho-bronze, com pêlos branco-amarelados esparsos, e apresenta também um escudo nugal. Difere dos outros eufractinos pelas orelhas e rosto maiores (WETZEL, 1985). Os dados da biometria incluem: peso médio 7,0 kg; comprimento cabeça + corpo: $4446,6 \pm 34,2$ mm; cauda: $231,3 \pm 14,0$ mm; pata posterior $84,2 \pm 6,2$ mm.

Cabassous sp. é amplamente distribuído nas Américas Central e do Sul. Produz um único filhote e se caracteriza pela ausência de placas ou escamas na cauda. As tocas de *Cabassous* sp. são facilmente identificadas, porque o formato da abertura é praticamente idêntico ao da sua carapaça; sendo muito rara a ocorrência de aberturas maiores. As entradas estão geralmente no chão ou encostas. Tipicamente, a área adjacente à entrada é limpa, livre de excrementos ou vegetação viva. O solo é, geralmente, duro e compactado (WETZEL, 1985). Uma característica interessante do gênero é a vocalização destes animais, que ocorre sempre que são encurralados nas baias ou manuseados. Este som se assemelha ao de um motor de baixa cilindrada. Este fato foi observado nos animais mantidos em cativeiro no Biotério de Experimentação Animal do ILSL (dados não publicados).

C. tatouay, o maior tatu de rabo-mole (CABRERA, 1958; WETZEL, 1980), é encontrado no Paraguai, Brasil (Sudeste do Pará, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo ao Rio Grande do Sul), Uruguai, Sudeste do Paraguai e Argentina. O *C. tatouay*, muito maior que as demais espécies de *Cabassous*, difere dos demais porque as placas do escudo escapular e pélvico são mais compridas que largas, a superfície externa da orelha possui escamas, o rosto é mais alongado, os dentes são ovais e alongados. Os parâmetros da biometria da espécie para adultos incluem: peso médio 6,2 kg; comprimento cabeça + corpo: $457,8 \pm 33,2$ mm; cauda: $179,0 \pm 19,5$ mm; pata posterior $82,2 \pm 3,0$ mm (WETZEL, 1985).

Embora existam poucos estudos sobre a ecologia e aspectos comportamentais dos tatus, sabe-se que os animais possuem hábitos predominantemente noturnos, locomovem-se em trilhas relativamente constantes, em regiões de mata ripária ou beiras de rios, sem evidências de hábitos migratórios. Têm pequena necessidade de oxigênio: quando estão cavando, podem parar de respirar por até seis minutos, por estocar o ar na traquéia e brônquios. Também conseguem nadar e flutuar, pois inflam seus intestinos e estômago de ar, o que dificulta a submersão (TALMAGE & BUCHANAN, 1954).

Os tatus não hibernam, e obrigatoriamente procuram alimento durante todo ano. Devido ao constante hábito escavatório, tanto para procura de alimentos, como para construção de tocas de moradia, apresentam contato íntimo com materiais do solo. Sua alimentação consiste basicamente em insetos como formigas e cupins, outros invertebrados e frutas. É freqüente a sua utilização na alimentação de comunidades rurais em diversos países latino-americanos (TABER, 1945; TALMAGE & BUCHANAN, 1954).

Outra característica biológica é a heterotermia, ou seja, os animais tendem a apresentar temperaturas corporais relativamente baixas (32-35°C), que variam de acordo com a temperatura do meio. Possuem períodos médios de vida de 15 anos, o que viabiliza a sua utilização como modelo experimental para doenças crônicas (WETZEL, 1985).

Seu sistema reprodutivo é dotado de características peculiares, como a implantação tardia do embrião, uma adaptação fisiológica para que os nascimentos se concentrem nas estações mais quentes do ano. Outro fenômeno reprodutivo característico desta espécie é a poliembrionia, isto é, os filhotes de *D. novemcinctus* são sempre quadrigêmeos monozigóticos (WETZEL, 1985). Este fato favorece a possibilidade da condução de estudos genéticos, já que os produtos poderiam ser considerados “clones naturais”.

Vários autores salientaram a importância de *D. novemcinctus* para a pesquisa biomédica, mas poucos estudos foram realizados sobre a biologia deste animal. Souza e colaboradores (1987) estudaram os parâmetros bioquímicos e hematológicos em tatus selvagens e inoculados com *M. leprae*.

Em tatus *D. novemcinctus* há relatos de isolamento tanto de micobactérias potencialmente patogênicas, como as pertencentes ao MAC, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, quanto de algumas saprófitas (*M. gordonae* e *M. terrae*) (BINFORD *et al.*, 1977; HALL & RATLEDGE, 1985).

A susceptibilidade desta espécie à infecção experimental por *M. leprae* tornou-a um importante modelo experimental para estudo da hanseníase, e atualmente tem sido utilizada para obtenção de bacilos em grandes quantidades.

As lesões observadas em tatus inoculados com suspensões de bacilos derivados de pacientes multibacilares, não se limitam a nervos periféricos e pele, podendo ocorrer de forma disseminada, com comprometimento de linfonodos, fígado, baço, medula óssea, olhos, sistema nervoso central, testículos, ovários e pulmões (KIRCHHEIMER & STORRS, 1971; STORRS, 1971).

Resultados similares de infecções experimentais por *M. leprae* foram observados apenas em primatas não-humanos, como o chimpanzé (*Pan troglodytes*), macaco mangabey (*Cercocebus atys*) e o macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (ROJAS-ESPINOSA & LOVIK, 2001).

Diversos autores têm citado *D. novemcinctus* como “sentinela” para a pesquisa do nicho ecológico de vários agentes infecciosos, tais como *Trypanosoma cruzi* (BARRETO, 1963; LAINSON *et al.*, 1979), *Leishmania naiffi* (NAIFF *et al.*, 1991), *Toxoplasma gondii* (SOGORB *et al.*, 1977), *Nocardia brasiliensis* (GEZUELE, 1972) *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter hinshawii* e *Streptococcus sp.*, *Ancylostoma sp.*, *Strongyloides sp.*, *Ascaris sp.*, *Trichuris sp.* (DINIZ *et al.*, 1997), *Sporothrix schenckii* (KAPLAN *et al.*, 1992), *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* (ARIAS *et al.*, 1982), *Coccidioides immitis* (EULÁLIO *et al.*, 2000), *Paecilomyces lilacinus* (GORDON, 1984) e *Paracoccidioides brasiliensis* (NAIFF *et al.*, 1986; SILVA-VERGARA, 1997; BAGAGLI *et al.*, 1998; SILVA-VERGARA & MARTINEZ, 1999; CORREDOR *et al.*, 1999; RESTREPO *et al.*, 2000; 2001).

Tendo em vista que *D. novemcinctus* representa um indicador biológico de extrema importância para diferentes agentes, neste trabalho procurou-se utilizar técnicas mais sensíveis e específicas, na tentativa de identificar o bacilo de Hansen e outras micobactérias potencialmente patogênicas aos animais e homem.

Aspectos Moleculares

Estudos moleculares são poderosos instrumentos para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais rápidos e sensíveis, novas abordagens terapêuticas e desenvolvimento de vacinas.

Os recentes avanços nas áreas de imunologia, biologia molecular e seqüenciamento genômico do *M. leprae* têm revelado novas perspectivas de pesquisa e de aplicação para diagnóstico, prognóstico e vigilância em hanseníase. Tendo em vista o surgimento contínuo de novos casos de hanseníase, inclusive de amostras resistentes, é necessária a aplicação de ferramentas moleculares para a identificação de *M. leprae*.

Vários autores têm utilizado métodos moleculares para o diagnóstico da hanseníase em pacientes multibacilares e paucibacilares (WILLIAMS *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 1993, 1995, 1997; SAKAI *et al.*, 1996; SCOLLARD *et al.*, 1997).

Grosskinsky e colaboradores (1989), estudando as relações genéticas entre diferentes espécies de micobactérias candidatas a cepas para vacinas, identificaram, através de testes de hibridização do DNA, seqüências repetitivas específicas de *M. leprae*, adjacentes e após a seqüência altamente conservada do gene de choque térmico, o antígeno de 65 kDa. A seqüência é denominada “elemento de seqüências repetitivas específico de *M. leprae* (RLEP)” e está presente cerca de 23 vezes no seu genoma. Na tentativa de identificar *M. leprae* em biópsias de pacientes, Woods e Cole (1989) desenvolveram uma técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com *primers* que hibridizaram com parte da seqüência repetitiva de *M. leprae* e amplificaram um fragmento de 372 pares de bases (pb).

Em relação às micobactérias potencialmente patogênicas, os estudos epidemiológicos do MAC são dificultados devido à grande diversidade genotípica e fenotípica. Embora vários sistemas de genotipagem tenham sido propostos, marcadores de espécies distintas têm sido identificados, podendo levar a resultados conflitantes. A identificação incompleta das espécies é freqüente, particularmente para os isolados ambientais. Métodos eficazes para identificação de espécies incluem *probes* comerciais para hibridização entre o ácido desoxirribonucleico e o ácido ribonucleico ribossômico (DNA-rRNA) (Accuprobe; GenProbe Inc., San Diego, Calif.); seqüenciamento nucleotídico do rRNA 16S, a seqüência do segmento 16S-23S ribossomal ou do fragmento de DNA de 360 pb (WILLIAMS *et al.*, 1992).

O método de identificação *PCR-restriction enzyme analysis* ou *PCR-restriction-fragment-length polymorphisms* (PRA ou PCR-RFLP), demonstrado por Telenti e

colaboradores, em 1993, baseia-se na amplificação de um segmento de 439 pb do gene que codifica para a proteína de choque térmico de 65.000 Da (*hsp65*), com posterior fragmentação do produto amplificado com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. O padrão de restrição é, então, comparado com algoritmos publicados (TELENTI *et al.*, 1993; DEVALLOIS *et al.*, 1997; DA SILVA ROCHA *et al.*, 1999) e armazenados em um banco de dados (PRASITE).

O PRA tem sido sugerido como método rápido de apoio à identificação de espécies micobacterianas e de novas espécies (PLIKAYTIS *et al.*, 1992; SPRINGER *et al.*, 1996; DA SILVA ROCHA *et al.*, 1999, 2002; LEÃO *et al.*, 1999; BRUNELLO *et al.*, 2001).

Neste trabalho, foi utilizado o PRA em micobactérias previamente isoladas de amostras de escarro de pacientes, e foi proposto um modelo experimental de infecção por *M. avium*, com o objetivo de otimizar os métodos de extração de DNA tecidual. Após esta padronização, iniciar-se-á a pesquisa de micobactérias em tatus selvagens, a fim de se verificar o papel ecológico do *D. novemcinctus* como reservatório natural de micobactérias.

OBJETIVOS

- Identificar molecularmente as espécies de micobactérias isoladas de pacientes, utilizando o PRA.
- Utilizar um modelo experimental com hamsters imunossuprimidos para a infecção mais precoce por *M. avium*, a fim de otimizar os métodos de extração de DNA e o diagnóstico molecular de micobactérias.
- Pesquisar, em tatus selvagens, a característica de portador de *M. leprae* e outras micobactérias e seu possível envolvimento na cadeia epidemiológica da hanseníase.

JUSTIFICATIVA

O objetivo deste trabalho foi contribuir tanto para a elucidação do nicho ecológico de espécies de micobactérias, como para um melhor entendimento de outros aspectos epidemiológicos ainda não esclarecidos, como o possível papel de reservatório dos tatus na cadeia epidemiológica destas micobacterioses.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: Padronização da Metodologia

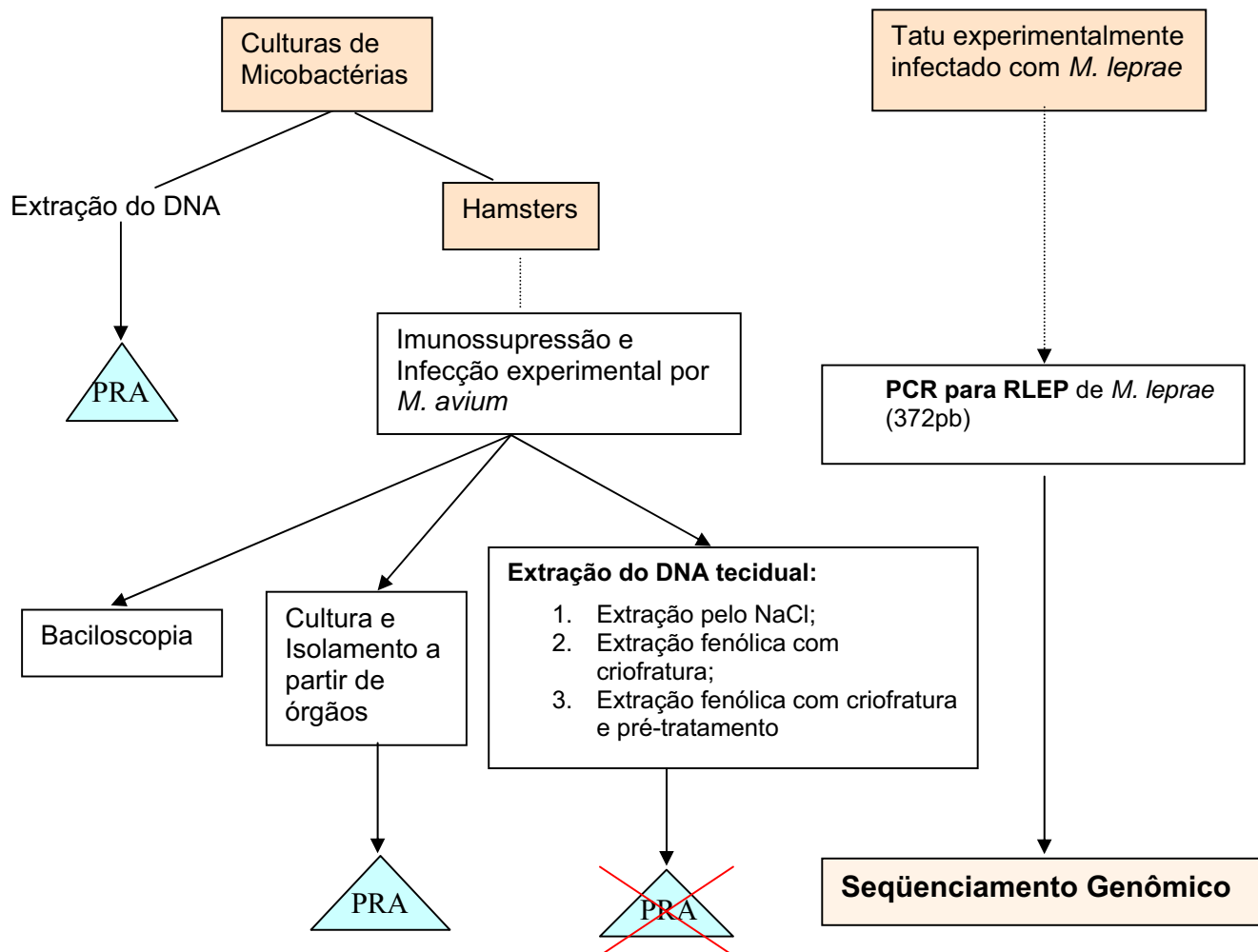


Figura 1: Delineamento experimental referente à padronização das técnicas empregadas.

Para a pesquisa em animais selvagens foram realizadas as técnicas de baciloscopia, cultura e PCR simples para RLEP de *M. leprae*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Culturas de Micobactérias:

Diferentes amostras previamente isoladas a partir de escarro de pacientes com suspeita de micobacterioses foram semeadas em meio Löweinstein-Jensen (LJ) e incubadas a 37°C, até o surgimento de colônias. Estas diferentes culturas foram identificadas molecularmente utilizando a técnica do PRA (Telenti, 1993), comparando-as com a cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) de *M. smegmatis* MC²155.

2. Animais

2.1. Hamsters

Foram utilizados oito hamsters *Mesocricetus auratus*, com cinco meses de idade, de ambos os sexos, pesando entre 100 e 130 g, para obtenção de amostras de fígado, baço, linfonodos, rins e pulmões.

2.1.1. Protocolo de Imunossupressão:

A fim de se padronizar o melhor método de extração do DNA de amostras clínicas para amplificar o gene que codifica a *hsp65*, foram utilizados hamsters submetidos ao protocolo de imunossupressão previamente estabelecido por Oliveira e colaboradores (1985). Propusemos aqui uma modificação para o seu uso em hamsters:

- Dia 0: ciclofosfamida a 200 mg / kg de peso vivo (PV), via intraperitoneal (ip);
- Dia 3: suspensão de *M. avium*, com $1,5 \times 10^8$ UFC / ml, via ip;
- Dias 5 e 7: eutanásia e obtenção dos órgãos (fígado, baço, rins e pulmões).

Esta imunossupressão foi realizada com o objetivo de antecipar a disseminação da infecção pelo *M. avium*, que atinge o pico dos 45 aos 50 dias.

2.2. Tatus

2.2.1. Tatu experimentalmente infectado por *M. leprae*:

Como controle positivo, foi utilizado tatu *D. novemcinctus* experimentalmente inoculado com 1,5 ml de suspensão de *M. leprae*, vias subcutânea e intravenosa (10^8 bacilos/ml) . A suspensão para o inóculo foi obtida a partir do processamento de amostra de biópsia de paciente multibacilar não tratado. Este animal foi mantido em cativeiro

durante 20 meses, tendo sido avaliado bimestralmente, até o surgimento de doença disseminada, com granulomas em fígado, baço ($3,06 \times 10^9$ bacilos/g de tecido), linfonodos, pulmões, adrenais e pele. Para este estudo, foram utilizados fragmentos do fígado do animal, gentilmente cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa, do Biotério de Experimentação Animal do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), Bauru-SP.

2.2.2. Tatus selvagens

Sob a licença nº 187/05 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), foram utilizados 21 tatus selvagens, sendo 80% capturados pela equipe do Laboratório de Micologia e 20% capturados pela nossa equipe, para a finalidade de semeadura em cultura.

No total, foram pesquisados 16 tatus *D. novemcinctus* (Figura 2), três *E. sexcinctus* (Figura 3) e dois *C. tatouay* (Figura 4), adultos jovens, de ambos os sexos, pesando de 3,5 kg a 5,0 kg, provenientes da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, mais precisamente nos municípios de Botucatu (22° 56' 15" S, 48° 26' 15" W), Pardinho, São Manuel (23° 03' 45" S, 48° 18', 45" W), Manduri (23° 03' 45" S, 49° 18' 45" W) e Bauru (22° 18' 41" S, 49° 03' 45" W).

Destes animais, foi obtido um total de 50 amostras, sendo 11 de fezes e 39 de tecidos de órgãos: fígado (15), baço (7), linfonodos (10), rim (1), adrenal (1), pulmões (2), fragmento de orelha (3).

2.3. Outras espécies:

Outros animais selvagens que haviam sido atropelados, também foram testados para *M. leprae*. De um total de 10 animais, foram pesquisadas 19 amostras de dois quatis, um gambá, um ouriço, um mão-pelada, um preá, dois furões e dois cachorros-do-mato.



Figura 2: *Dasypus novemcinctus*



Figura 3: *Euphractus sexcinctus*



Figura 4: *Cabassous tatouay*

3. Eutanásia dos animais

Os tatus foram previamente anestesiados com tiletamina e zolazepam na dose de 5,0 mg/kg PV, via intramuscular, colocados em decúbito dorsal e submetidos à punção cardíaca para retirada do sangue total. Os hamsters foram anestesiados com pentobarbital sódico a 80 mg/kg PV. Estes procedimentos receberam o parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina desta universidade, protocolo nº 468, segundo os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4. Necrópsia e obtenção de amostras

Durante a necrópsia dos hamsters, foram coletadas amostras de fígado, baço, linfonodos mesentéricos, rins e pulmões para baciloscopia, cultura micobacteriana e diagnóstico molecular.

Dos tatus selvagens, foram coletadas amostras de fígado, baço, linfonodo mesentérico, pulmões, adrenal, rim e fragmentos de orelha.

As amostras de DNA obtidas das fezes dos tatus foram provenientes do Banco de DNA do Laboratório de Biologia de Fungos no Departamento de Microbiologia e Imunologia, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Bagagli.

5. Caracterização microbiológica

5.1. Descontaminação e digestão:

Fragmentos de tecidos foram pesados, macerados e diluídos em 2,0 ml de água destilada estéril. As amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff (Brasil, 1994) e o sedimento foi utilizado para a cultura e baciloscopia.

5.2. Baciloscopia semi-quantitativa para diagnóstico de tuberculose e outras micobacterioses:

Amostras de 10 µl do sedimento obtido após descontaminação foram fixadas em lâminas, coradas pelo método de Ziehl-Neelsen a frio, submetidas à microscopia óptica, e observadas com a objetiva de imersão. Foram observados 20 a 100 campos. Os resultados foram expressos pelo método da baciloscopia semi-quantitativa para diagnóstico de tuberculose e outras micobacterioses:

- (-) negativo para BAAR em 100 campos examinados.
- (+) menos de um BAAR/campo em 100 campos examinados.
- (++) de 1 a 10 BAAR/campo em 50 campos examinados.
- (+++)+ mais de 10 BAAR/campo em 20 campos examinados.

5.3. Cultura

Amostras de fígado, baço e linfonodos mesentéricos foram semeadas, em duplicata, em tubos com tampa de rosca contendo meio LJ com citrato férrico a 2,5%. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C e inspecionados diariamente na primeira semana. A partir daí, foram observados semanalmente, até 90 dias ou até a verificação do surgimento de colônias. Na ausência de crescimento até este período, as culturas foram consideradas negativas.

6. Caracterização molecular

6.1. Extração do DNA das culturas de micobactérias:

Para a obtenção do DNA dos isolados clínicos, foram feitas suspensões com duas alçadas de massa micobacteriana em 0,5 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1mM e Triton X-100 1% (TET). Estas suspensões foram submetidas a três ciclos de fervura/10 minutos e congelamento a -74°C /5 minutos (DA SILVA ROCHA *et al.*, 1999). Os líquidos sobrenadantes obtidos foram estocados a -20°C e 2 µl desta mistura foram utilizados como molde na reação de PCR.

6.2. Amplificação do gene que codifica a *hsp65* kDa:

Para a PCR, foi feita uma mistura de 50 µl composta por 75 mM Tris-HCl (pH 9,0); 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 2,0 mM MgCl₂; 200 mM dNTP (GE Healthcare), 0,5 µM de cada *primer* Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT- 3') (MWG –Biotech AG) e 1,0 unidade de DNA polimerase (BioTools). Para a PCR utilizando DNA tecidual (hamsters e tatus) foi utilizada a Taq Polimerase (GE Healthcare). Após a adição de cada componente da mistura, foram acrescentados 2 µl do sobrenadante contendo o DNA micobacteriano.

A reação de amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C/10 minutos, seguida por 45 ciclos nas seguintes condições: 94°C/1 minuto, 64°C/1 minuto e

72°C/1 minuto, com extensão final de 72°C/10 minutos (TELENTI *et al.*, 1993). Foi feita a padronização das condições da reação de amplificação do gene da *hsp65* de *M. smegmatis* MC²155, através de uma PCR-gradiente, utilizando diferentes valores de temperatura de anelamento e de concentração de MgCl₂, em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf – Bioreserch do Brasil). Desta maneira, foi modificada a temperatura de anelamento de 60°C (Telenti *et al.*, 1993) para 64°C, a fim de aumentar a especificidade da reação.

6.3. PRA

Alíquotas de 10 µl do produto amplificado foram submetidas à restrição enzimática por 10 U de *Hae*III (Invitrogen), sob óleo mineral (TELENTI *et al.*, 1993). A digestão por *Bst*EII (Dialab) foi padronizada em 15 µl do produto amplificado para 5 U da enzima. A análise dos produtos da restrição enzimática foi feita por eletroforese de 5 µl de cada amostra digerida em gel de agarose a 3% (Sigma), com marcador de peso molecular de 50 pb (GE Healthcare). Após a eletroforese, os géis foram tratados com brometo de etídeo (10 µg/ml), sua imagem capturada por um fotodocumentador (Alphamager®, Alpha Innotech Corporation) e os dados analisados com software específico (Alphamager), visando determinar os padrões de banda obtidos. Uma vez definidos os padrões de PRA, estes foram comparados com as informações do banco de dados de referência PRASITE (<http://app.chuv.ch/pls/pranet/consultation>) e com o algoritmo de Telenti e colaboradores (1993), como pode ser visualizado na Figura 5.



Figura 5: Algoritmo para diferenciação de isolados de micobactérias ao nível de espécie. Os tamanhos moleculares aparentes podem variar dentro de ± 5 pb, mas isto raramente representa um problema para a correta identificação. Obs.: *HaeIII* e *BstEII*: enzimas de restrição originadas de *Haemophilus aegypticus* e *Bacillus stearothermophilus*, respectivamente. FONTE: TELENTI *et al.*, 1993.

6.4. Determinação do melhor método de extração de DNA tecidual

Foram testados três protocolos distintos para extração do DNA total de tecidos de órgãos-alvo (baço, fígado e linfonodos mesentéricos) dos hamsters inoculados com *M. avium*. O primeiro foi baseado em extração com cloreto de sódio (NaCl) 5M; e os demais em criofratura, seguida de digestão com Proteinase-K e purificações com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. O segundo e o terceiro protocolos diferiram entre si pela presença de um pré-tratamento das amostras antes da digestão com Proteinase-K.

6.4.1. Protocolo de Extração nº 1: NaCl

Fragmentos de tecido pesando aproximadamente 10 mg foram colocados em microtubos de 1,5 ml contendo 290 μ l de tampão de extração (Tris-HCl 30 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% e água Milli-Q q.s.p.) e 10 μ l de proteinase-K (10 mg/ml). As amostras foram

colocadas em banho termostático a 56°C *overnight*. Para a extração do DNA, foram adicionados 100 µl de solução de NaCl 5M e misturados bem, invertendo-se o tubo vagarosamente. Foram centrifugados a 10.000 rpm/10 min/25°C e transferidos 300 µl de sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 ml. Para precipitar o DNA, foram adicionados 600 µl de etanol gelado, mantendo-se no ultrafreezer (-80°C) durante 20 minutos. A quantificação e o controle da qualidade do DNA foram determinados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (10 µg/ml), utilizando o marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogen).

6.4.2. Protocolo de Extração nº 2: Extração fenólica com criofratura

Fragments de tecido com cerca de 300 mg foram submetidos à criofratura: os tecidos foram colocados em graal gelado e macerados com nitrogênio líquido (N₂ (liq)) até que se tornasse um pó branco. O material foi colocado em microtubos de 1,5 ml contendo 600 µl de tampão de lise (Tris-HCl 100mM, EDTA 0,125mM, SDS 1,0%, 2-mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q q.s.p.) e incubados a 56°C com 20 µl de proteinase-K a 20 mg/ml, *overnight*. Após este período, foram adicionados 500 µl da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 25°C/13.000rpm/20 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados e transferidos para novos microtubos, repetindo-se mais duas vezes a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. O DNA foi precipitado com isopropanol e 10 µl de acetato de sódio 3M, à temperatura de -20°C, durante 30 minutos. O material obtido foi centrifugado a 4°C/13.000 rpm/20 min e o "pellet" lavado duas vezes com etanol 70% gelado. Após secagem em estufa a 37°C durante uma hora, o DNA foi eluído em 100 µl de água Milli-Q estéril. A quantificação e o controle da qualidade do DNA foram determinados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (10 µg/ml), utilizando o marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogen).

6.4.3. Protocolo de Extração nº 3: Extração Fenólica com criofratura e pré-tratamento

Após a criofratura, as amostras de tecido (cerca de 300 mg) foram submetidas a um pré-tratamento (LEAL & ALMEIDA, 1999; MAHBUBANI & BEJ, 1994), antes da digestão com Proteinase-K. Desta forma, após a maceração com N₂ (liq), o material foi colocado em microtubos de 1,5 ml e com 600 µl de Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0

(TE). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 14.000rpm/25°C/5min. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram ressuspensos em 600 µl de TE, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições, para lavagem do material. O sedimento foi ressuspensão, então, em 600 µl do tampão de lise (Tris-HCl 100mM, EDTA 0,125mM, SDS 1,0%, 2-mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q q.s.p.) e incubados a 56°C, durante uma hora. Após este período, foram incubados em banho a 95°C, durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µl de Proteinase-K a 20 mg/ml a cada microtubo, mantendo-os a 56°C *overnight*. Após este período, foram adicionados 500 µl da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1); homogeneizados e centrifugados 25°C/13.000rpm/20 min. Os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados e transferidos para novos microtubos, repetindo-se mais duas vezes a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. O DNA foi precipitado com isopropanol e 10 µl de acetato de sódio 3M, à temperatura de -20°C durante 30 minutos. O material obtido foi centrifugado a 4°C/13.000 rpm/20 min e o "pellet" lavado duas vezes com etanol 70% gelado. Após secagem em estufa a 37°C durante uma hora, o DNA foi eluído em 100 µl de água Milli-Q estéril. A quantificação e o controle da qualidade do DNA foram determinados em gel de agarose a 1% (Sigma, Oakland, USA) corado com brometo de etídeo (10 µg/ml), utilizando o marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogen).

6.5. Amplificação do gene RLEP de *M. leprae*

A PCR para as seqüências repetitivas específicas de *M. leprae* (RLEP) (WOODS & COLE, 1989; GROSSKINSKY *et al.*, 1989), que amplifica um fragmento de 372 pb, foi realizada com os *primers* ML1 (5'-GCACGTAAGCCTGTCGGTGG-3') e ML2 (5'-CGGCCGGATCCTCGATGCAC-3'), que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Philip Noel Suffys, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. A reação foi realizada em um termociclador Thermal Controller, modelo PTC-100™ - 480 (Peltier-Effect Cycling MJ Research, USA), utilizando 10 ng de DNA total, 200 µM de cada dNTP, 10 µM de cada *primer*, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 U de *Taq* polymerase (GE Healthcare) e água suficiente para um volume final de 25 µl. As condições de ciclagem foram: 92°C por 3 min para desnaturar o DNA cromossômico, seguidos por 40 ciclos de 2,5 min a 55°C, 2 min a 72°C e 1,5 min a 92°C e uma extensão final a 72°C por 2 min (Santos *et al.*,1993). As amostras foram

analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Sigma, Oakland, USA), corado com brometo de etídeo (10 µg/ml).

6.6. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados foram extraídos do gel de agarose ou do produto amplificado, e purificados utilizando-se o kit específico GFX (GE Healthcare).

A técnica foi realizada no Centro de Estudos Genômicos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

O seqüenciamento de DNA a partir de produtos de PCR utilizou o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares (GE Healthcare). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante.

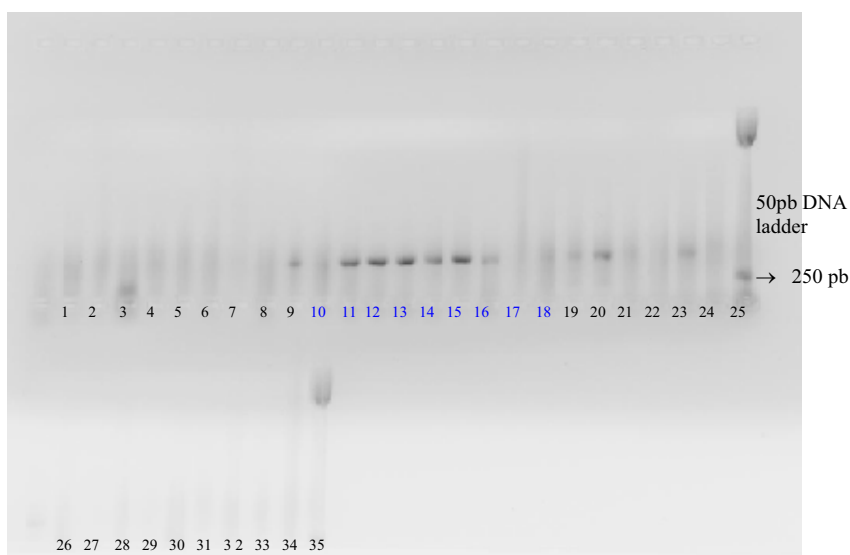
Uma vez anotadas as seqüências, elas foram alinhadas e editadas utilizando o software “Chromas” e “Sequence Navigator” (Perking Elmer) e analisadas no *Gene Bank*: Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

RESULTADOS:

I- Padronização das Técnicas

1. Micobactérias isoladas em cultura

A PCR-gradiente demonstrou que a concentração ótima de $MgCl_2$ foi 2,0 mM e houve amplificação em temperaturas variáveis: de 52,3°C a 64,8°C. A partir daí, optou-se por utilizar a temperatura de anelamento de 64°C, por tornar a reação mais específica (Figura 6). Houve sucesso na amplificação da *hsp65* para as micobactérias de origem humana isoladas em cultura (Figura 7).



Gradiente de temperatura de anelamento:

50,1°C = 1, 10, 19, 28
50,9°C = 2, 11, 20, 29
52,3°C = 3, 12*, 21, 30
54,4°C = 4, 13*, 22, 31
56,8°C = 5, 14*, 23, 32
59,5°C = 6, 15*, 24, 33
64,8°C = 7, 16*, 25, 34
67,1°C = 8, 17, 26, 35
68,0°C = 9, 18, 27

Gradiente de $[MgCl_2]$:

1-9: 1,5mM
10-18: 2,0mM*
19-27: 2,5mM
28-35: 3,0mM

Temperaturas ótimas (°C) = 52,3° a 64,8°C

Figura 6: PCR-gradiente para *M. smegmatis* MC²155, com variações na concentração de $MgCl_2$ e na temperatura de anelamento. (*) A concentração ótima de $MgCl_2$ foi 2,0 mM e as temperaturas ótimas de anelamento variaram de 52,3°C a 64,8°C.

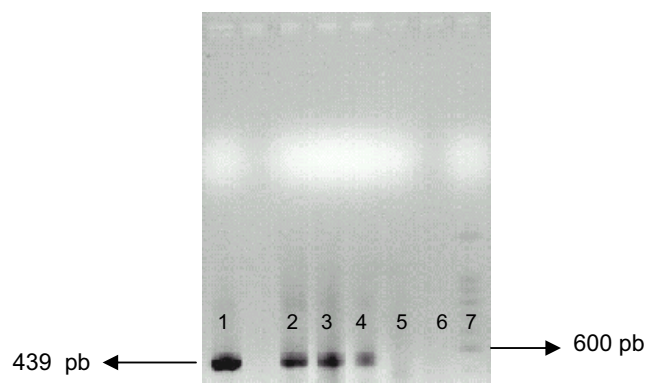


Figura 7: PCR para *hsp65*:

- 1 - ATCC *M. smegmatis* MC²155
- 2 - *Mycobacterium* sp. (registro ILSL-160)
- 3 - *Mycobacterium* sp. (registro ILSL-229)
- 4 - *Mycobacterium* sp. (registro ILSL-291)
- 5 - *Mycobacterium* sp. (registro ILSL-286)
- 6 - Controle negativo da reação
- 7 - 100 pb DNA ladder (Invitrogen)

Para identificação ao nível de espécie, seguiu-se a restrição enzimática do produto amplificado com *HaeIII* (Invitrogen), conforme Telenti (1993). Quanto à restrição pela *BstEII* (Dialab), foi feita uma padronização da reação (Figura 8). Para isto, foram mantidas constantes as concentrações do tampão da enzima (2,0 µl); 0,2 ul de soro-albumina bovina (BSA) a 10 µg/µl e 0,5 µl da enzima *BstE II* a 10 u/µl. Foram variados os volumes do produto amplificado e da água para o total de 20 µl. Desta maneira, pudemos verificar que, com 15 µl do produto amplificado, foram obtidos fragmentos com melhor visualização em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo (10 µg/ml) (Figura 8).

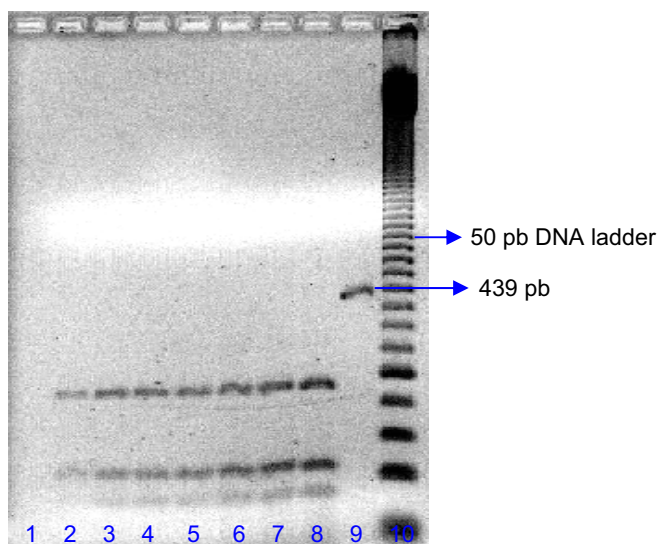


Figura 8: Padronização da restrição enzimática com *BstEII*. Foram mantidos constantes os volumes de tampão (2 μ l); 0,2 μ l de soroalbumina bovina (BSA) a 10 μ g/ μ l; 0,5 μ l de enzima. Foi mantido o volume final de 20 μ l. Volume (ul) do produto amplificado + água:

1 = 1 + 16,3 ul

2 = 2 + 15,3 ul

3 = 3 + 14,3 ul

4 = 4 + 13,3 ul

5 = 5 + 12,3 ul

6 = 7 + 10,3 ul

7 = 10 + 7,3 ul

8 = 15 + 2,3 ul *

9 = controle não digerido (439pb)

10 = 50bp DNA ladder (GE Healthcare).

Visualização: gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo (10 μ g/ml).

Padronizadas as condições de restrição, os produtos amplificados provenientes da cepa ATCC de *M. smegmatis* e os três produtos obtidos das culturas de micobactérias do ILSL foram submetidos à digestão enzimática com *HaeIII* e *BstEII* (Figura 9). Comparando nossos resultados com o algoritmo de Telenti (1993) e no PRASITE, pudemos chegar à identificação das micobactérias ao nível de espécie.

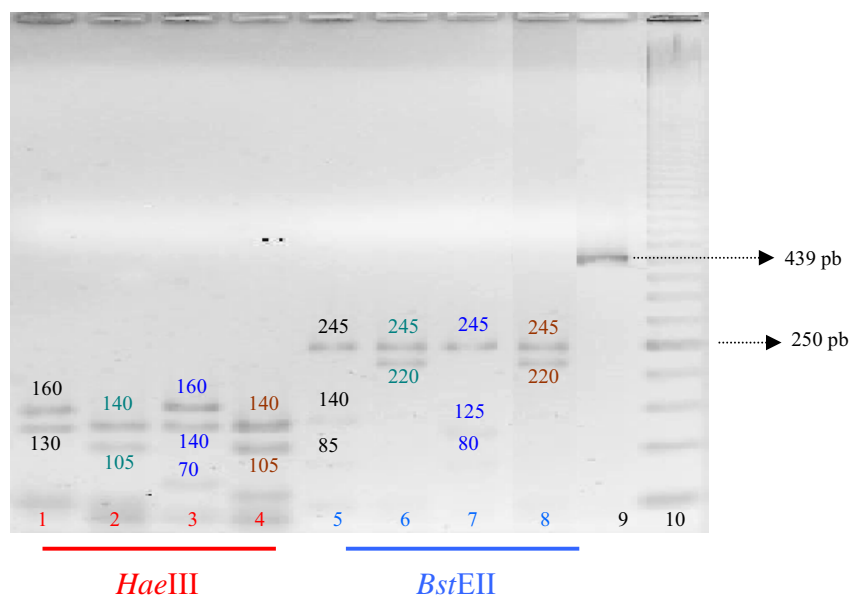


Figura 9: Identificação de diferentes espécies de micobactérias pelo PRA. Os números indicam os diferentes perfis de restrição com pesos moleculares distintos para cada espécie.

1, 5 – ATCC de *M. smegmatis* MC² 155

2,6 – Cultura 160 = *M. avium*

3,7 – Cultura 229 = Complexo *M. tuberculosis*

4,8 – Cultura 291 = *M. avium*

9 – controle não-digerido de ATCC de *M. smegmatis* MC² 155

10 – 50 bp DNA ladder (GE Healthcare)

1. Animais

2.1. Hamsters imunossuprimidos

2.1.1. Achados de necrópsia:

À necrópsia dos hamsters machos, no 5º dia, foram encontrados quadros de intensa degeneração hepática (37,5%), granulomas hepáticos (12,5%), comprometimento renal, com áreas pálidas no córtex e região medular edemaciada, com coloração esbranquiçada (12,5%).

No 7º dia, foram eutanasiadas as fêmeas, nas quais foram observados, em geral, quadros de hemorragia intensa (25%), com derrame sero-sangüinolento na cavidade peritoneal (25%), petéquias e sufusões em alças intestinais (12,5%), mesentério (12,5%) estômago (12,5%) e pâncreas (12,5%). Hepato e esplenomegalia (50%), pneumonia hemorrágica (37,5%), rins aumentados de volume e edemaciados (37,5%), com córtex e medula hemorrágicos (25%). Foram observados pequenos granulomas em baço (com hiperplasia de polpa branca) (25%), alças intestinais (12,5%), pâncreas (12,5%), ovários e cornos uterinos (12,5%). Um dos animais apresentava aderência das alças intestinais à cavidade peritoneal (12,5%) (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Os achados de comprometimento renal e quadros de hemorragias nos animais são sinais compatíveis com a atividade da droga, e não com o processo infeccioso intrínseco.



Figuras 10, 11, 12 e 13: achados de necrópsia em hamsters imunossuprimidos e inoculados com suspensão de $1,5 \times 10^8$ BAAR de *M. avium*. Presença de pequenos nódulos granulomatosos hepáticos no 5º e 7º dias da inoculação.

2.1.2. Baciloscopia semi-quantitativa

A baciloscopia semi-quantitativa foi positiva para todos os hamsters, com exceção de um deles (12,5%). Em órgãos do sistema fagocítico mononuclear (fígado e baço), a quantidade de bacilos foi maior que nos demais órgãos. Em fígado e baço foram observadas uma cruz (+) em 25% e três cruces (+++) em 62,5% dos animais. Entretanto, foi pequena a migração para rins e pulmões, já que 87,5% dos rins e 75% dos pulmões estavam livres de BAAR (Tabela 1).

Tabela 1: Baciloscopia semi-quantitativa de diferentes órgãos de hamsters inoculados, ip, com suspensão de *M. avium*, após descontaminação pelo método de Petroff.

Hamster	Fígado	Baço	Rins	Pulmões
H1	-	-	-	-
H2	+++	+++	-	-
H3	+	+	-	-
H4	+	+	-	-
H5	+++	+++	+	+
H6	+++	+++	-	-
H7	+++	+++	-	+
H8	+++	+++	-	-

2.1.4. Cultura:

Com exceção do Hamster n^o 1, foram isoladas colônias de micobactérias a partir de fígado, baço, rins e pulmões de todos os animais. A cultura foi mais sensível que a baciloscopia, visto que, das amostras de rins e pulmões semeadas em LJ, houve 100% de positividade, contrastando com a baciloscopia, que apresentou apenas 12,5% de positividade em rins e 25% de positividade em pulmões.

Tabela 2: Comparação dos métodos de baciloscopia, cultura em LJ e PCR para o gene da *hsp65*, a partir de órgãos de hamsters inoculados, ip, com suspensão de *M. avium*.

Amostra	Baciloscopia	Cultura	PCR (<i>hsp65</i>)
FH1	-	-	+
BH1	-	-	+
FH2	+++	+	+
BH2	+++	+	+
FH3	+	+	+
BH3	+	+	+
FH4	+	(- * / - ** / + ***)	+
BH4	+	(- * / - ** / + ***)	+
FH5	+++	(- * / + **)	+
BH5	+++	(- * / + **)	+
FH6	+++	(- * / + **)	+
BH6	+++	(- * / + **)	+
FH7	+++	(- * / + **)	+
BH7	+++	(- * / + **)	+
FH8	+++	(- * / + **)	+
BH8	+++	(- * / + **)	+

Obs.: (*) = cultura de 30 dias; (**) = cultura de 60 dias; (***) = cultura de 90 dias.

2.1.5. Determinação do melhor método de extração de DNA tecidual

Não houve sucesso na PCR para gene da *hsp65* utilizando o DNA dos tecidos dos hamsters inoculados como molde nas mesmas condições de reação utilizadas para os isolados clínicos (Figura 14).

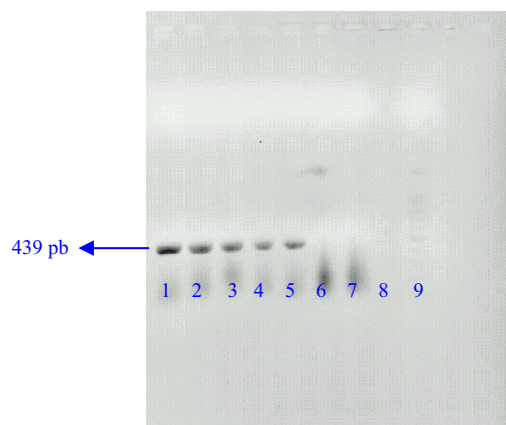
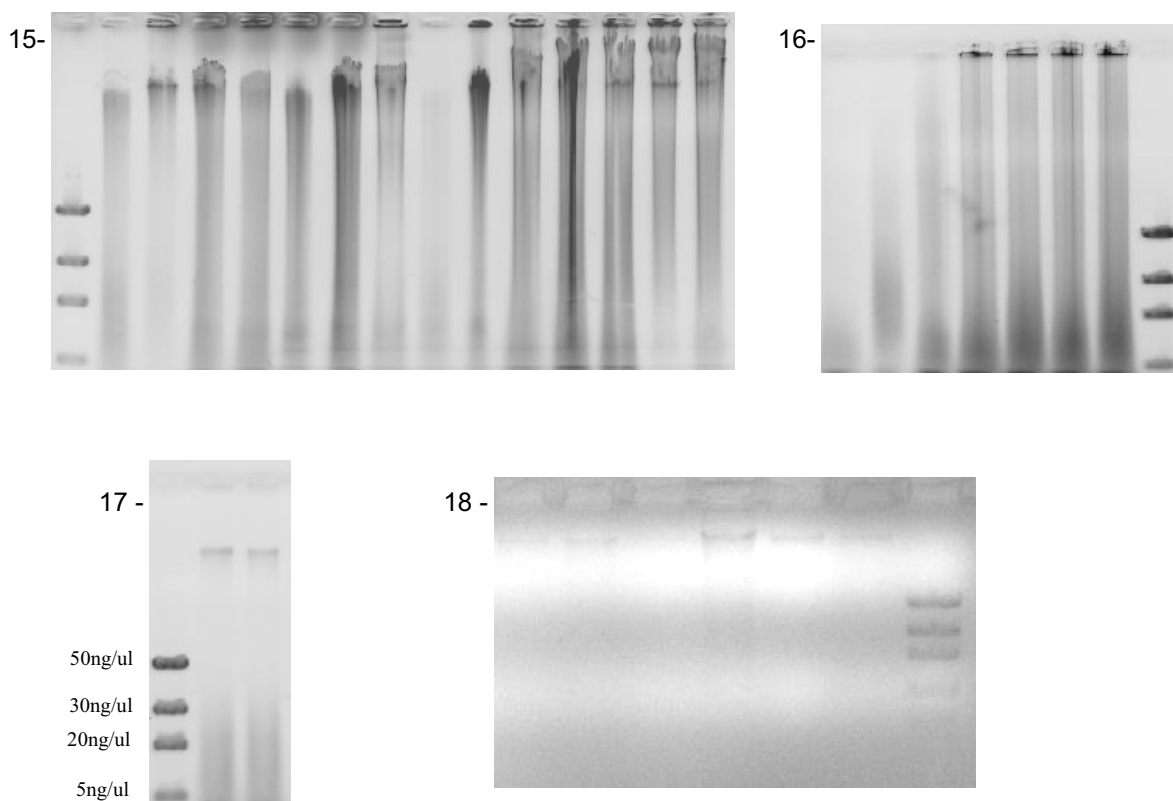


Figura 14: Amplificação do gene da *hsp65*, com visualização das bandas de 439 pb:

- 1- *M. smegmatis* MC²155
- 2 – Cultura 160
- 3 – Cultura 229
- 4 – Cultura 286
- 5 – Cultura 291
- 6 – FH1 * (otimizar a extração)
- 7 – FH2 *
- 8 – No
- 9 – 100 pb DNA ladder.

Foi necessário, então, otimizar o método de extração e as condições de PCR que permitissem a PCR a partir de DNA tecidual. Desta maneira, foram testados três diferentes protocolos de extração de DNA total dos hamsters previamente inoculados com *M. avium*. Através da visualização em gel de agarose, foi observada uma grande quantidade de DNA degradado na extração com NaCl 5M (protocolo nº1). Embora em baixa concentração, o protocolo nº3 forneceu DNA de alto peso molecular e de melhor qualidade que o protocolo nº2. Estas constatações podem ser verificadas nas Figuras 15, 16, 17 e 18.



Figuras 15, 16, 17 e 18: Padronização das técnicas de extração de DNA tecidual: controle da qualidade e quantificação em gel de agarose a 1%. Fig. 15: Protocolo de extração nº1 (NaCl 5M); Fig.16: Protocolo de extração nº2 (extração fenólica com criofratura); Fig. 17 e 18: extração fenólica com criofratura e pré-tratamento.

2.1.5. Amplificação do gene da *hsp65* na tentativa de realizar o PRA a partir de amostras de tecido de hamsters experimentalmente infectados por *M. avium*

A partir da determinação do melhor protocolo para extração do DNA total tecidual, a ser utilizado como molde foi feita a reação de amplificação do gene que codifica a *hsp65*, com o intuito de executar o PRA. Após a reação, foram obtidas bandas fracamente visíveis de cerca de 439 pb. Entretanto, após a digestão enzimática dos produtos amplificados, não foram observados fragmentos de restrição em nenhuma amostra. Isto deve ter ocorrido, porque, diferentemente dos produtos de culturas puras, as concentrações dos produtos amplificados das amostras de tecido animal foram baixas. Desta maneira, não houve sucesso no desenvolvimento do PRA a partir de amostras de tecidos de hamsters.

3. Tatu experimentalmente infectado por *M. leprae*

A partir de DNA extraído de fígado de um tatu experimentalmente infectado, foi realizada PCR simples para RLEP de *M. leprae*:

3.1. Amplificação de RLEP de *M. leprae*:

Foram amplificados fragmentos de aproximadamente 372 pb a partir de DNA do controle positivo, mas não em *M. avium*, *M. smegmatis* MC² 155, nem em tecidos de hamsters inoculados com *M. avium* (Figura 19).

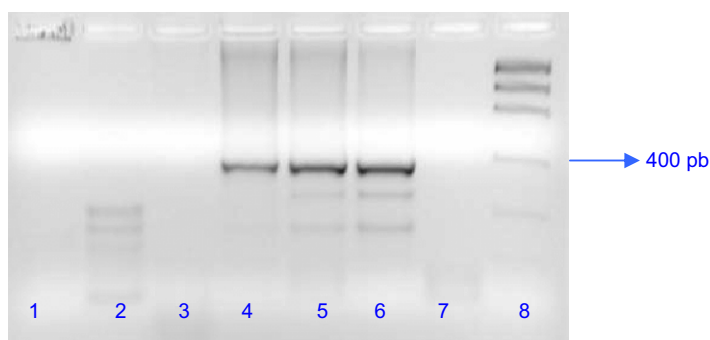


Figura 19: 1 – *M. smegmatis* MC² 155; 2 – *M. avium* ; 3 – *M. auratus* inoculado com *M. avium* (fígado); 4, 5 e 6 – *D. novemcinctus* inoculado com *M. leprae* (fígado); 7 – Controle negativo da reação; 8 – Low Mass DNA ladder.

2.2.2. Limite de detecção da PCR:

O DNA total do controle positivo foi quantificado em gel de agarose a 1% com marcador de peso molecular Low Mass DNA ladder (Invitrogen), sendo estimado em 5 ng/ μ l (Figura 20). O limite de detecção da reação da PCR para RLEP foi verificado para até 500 fg/ μ l do DNA total (Figura 21).

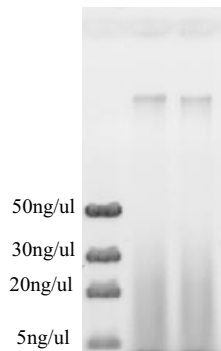


Figura 20: Quantificação do DNA total: 1- Low Mass DNA ladder; 2,3 – DNA total de tatu inoculado com *M. leprae*.

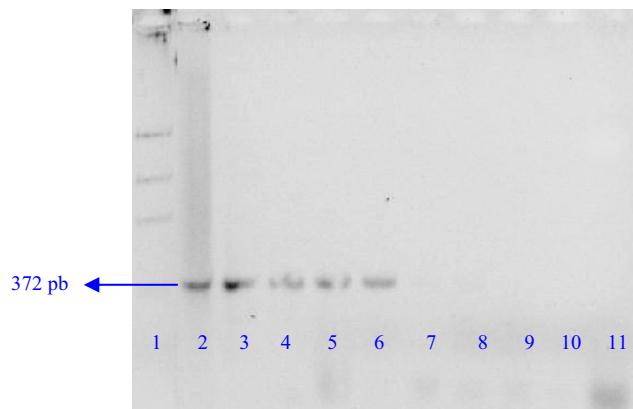


Figura 21: 1) Low Mass DNA ladder; 2) DNA total de tatu inoculado por *M. leprae* (template: 5ng/ul); 3) diluição 10⁻¹ (500 pg/ul); 4) diluição 10⁻² (50 pg/ul); 5) diluição 10⁻³ (5 pg/ul); 6) diluição 10⁻⁴ (500 fg/ul)*; 7) diluição 10⁻⁵; 8) diluição 10⁻⁶; 9) diluição 10⁻⁷; 10) diluição 10⁻⁸; 11) diluição 10⁻⁹

II - Pesquisa em Animais Selvagens

1. Tatus selvagens

1.1. Achados de necrópsia

À necrópsia, em geral, foram observados quadros de hepatomegalia (áreas de degeneração, com consistência friável) e esplenomegalia (baço com hiperplasia de polpa vermelha), enterite catarral ou hemorrágica (sufusões no intestino delgado), plexo mesentérico congesto, linfonodos mesentéricos aumentados de volume, edemaciados, presença acentuada de nematóides, inclusive no epíplon. Um dos animais apresentava aderência esplênica na parede abdominal e outro animal apresentava pequenos nódulos pulmonares.

1.2. Caracterização microbiológica

1.2.1. Baciloscopia semi-quantitativa

Todas as amostras foram negativas para BAAR.

1.2.2. Cultura:

Nenhuma amostra estudada apresentou crescimento em LJ até 90 dias de observação, o que impediu a identificação pelo PRA.

1.3. Caracterização molecular

1.3.1. Pesquisa de RLEP de *M. leprae* em amostras de tatus

Nenhuma amostra proveniente de tecido de tatus ou outras espécies de animais selvagens apresentou o produto amplificado de 372 pb (Figuras 19, 20 e 21) para RLEP específico de *M. leprae*. Em amostras da espécie *D. novemcinctus* foram observadas bandas inespecíficas, de tamanho menor ao esperado (cerca de 170–270 pb). Em apenas duas amostras de fezes de tatus *D. novemcinctus* (4% do total) foram observadas bandas fracamente visíveis com cerca de 372 pb (tatus Man 4 e Man 7, provenientes de duas propriedades rurais do município de Manduri), as quais podem ser melhor visualizadas nas Figuras 22, 23, 24 e 25.

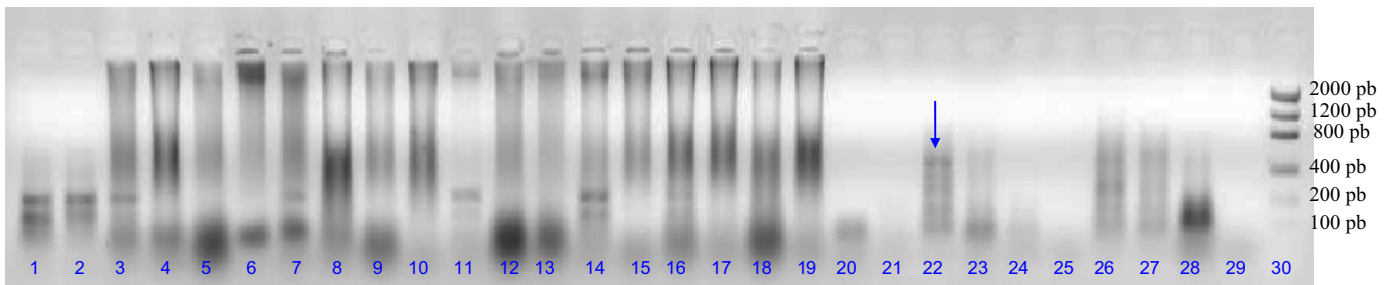


Figura 22: Pesquisa de RLEP em amostras de DNA de tatus selvagens. O fragmento esperado é de 372 pb.

- | | |
|---|--|
| 1- <i>D. novemcinctus</i> – (Man 2) – linfonodo mesentérico | 16- <i>D. novemcinctus</i> – (56) – baço |
| 2 – <i>D. novemcinctus</i> – (Man 3) – fígado | 17 – <i>D. novemcinctus</i> – (57) – baço |
| 3 – <i>D. novemcinctus</i> – (Man 3) – baço | 18 – <i>D. novemcinctus</i> – (57) – fígado |
| 4 – <i>D. novemcinctus</i> – (54) – baço | 19 – <i>D. novemcinctus</i> – (57) – linfonodo mesentérico |
| 5 – <i>D. novemcinctus</i> – (54) – fígado | 20 – <i>D. novemcinctus</i> 46 ILSL – fezes |
| 6 – <i>D. novemcinctus</i> (54) – linfonodo mesentérico | 21 – <i>D. novemcinctus</i> (Man 1) – fezes |
| 7 – <i>D. novemcinctus</i> (54) – orelha | 22 – <i>D. novemcinctus</i> (Man 4) – fezes (*) |
| 8 - <i>D. novemcinctus</i> (55) – baço | 23 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 5) – fezes |
| 9 - <i>D. novemcinctus</i> (55) – fígado | 24 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 7) – fezes |
| 10 - <i>D. novemcinctus</i> (55) – linfonodo mesentérico | 25 - <i>D. novemcinctus</i> (Serrito 1) – fezes |
| 11- <i>D. novemcinctus</i> (55) – orelha | 26- <i>D. novemcinctus</i> (Man 5) – fezes |
| 12 – <i>D. novemcinctus</i> (56) – fígado | 27 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 7) – fezes |
| 13 - <i>D. novemcinctus</i> (56) – fígado | 28 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 7) – fezes |
| 14 – <i>D. novemcinctus</i> (56) – linfonodo mesentérico | 29 - controle negativo da reação |
| 15 – <i>D. novemcinctus</i> (56) – orelha | 30- Low Mass DNA ladder |
| | (*) – amostra supeita |

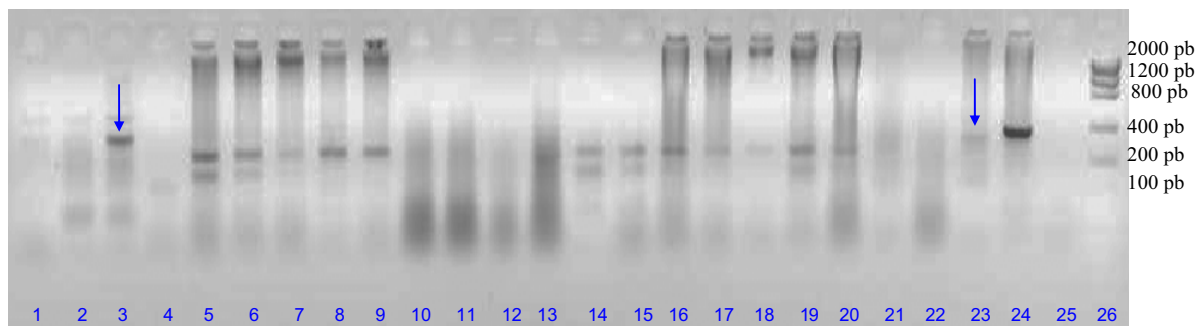


Figura 23: Pesquisa de RLEP em amostras de DNA de tatus selvagens. O fragmento esperado é de 372 pb.

- | | |
|--|---|
| 1 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 5) – fezes (extração de 15. 07.04) | 14 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 2) – linfonodo mesentérico |
| 2 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 5) – fezes (extração de 12.11.04) | 15 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 3) – fígado |
| 3 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 7) – fezes (extração de 31.05.05 - amostra de 18.05.05) (*) | 16 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 3) - baço |
| 4 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 7) – fezes (extração de 12.11.04 - amostra de 09.06.04) | 17 - <i>D. novemcinctus</i> (54) – orelha |
| 5 - <i>D. novemcinctus</i> (Serrito 1) – baço | 18 - <i>D. novemcinctus</i> (55) – orelha |
| 6 - <i>D. novemcinctus</i> (Serrito 1) – linfonodo próximo do fígado | 19 - <i>D. novemcinctus</i> (56) – linfonodo mesentérico |
| 7 - <i>D. novemcinctus</i> (Serrito 1) – pulmão | 20 - <i>D. novemcinctus</i> (56) – baço |
| 8 - <i>D. novemcinctus</i> (Dh1) – baço | 21 - <i>Didelphis marsupialis</i> (Mina) – baço |
| 9 - <i>D. novemcinctus</i> (Dh1) – linfonodo mesentérico | 22 - <i>D. marsupialis</i> (Mina) – fígado |
| 10 - <i>E. sexcinctus</i> (TC1) – fígado | 23 - <i>D. novemcinctus</i> (Man 4) – fezes (*) |
| 11 - <i>E. sexcinctus</i> (TC3) – fígado | 24 - <i>D. novemcinctus</i> inoculado com <i>M. leprae</i> (fígado) |
| 12 - <i>D. novemcinctus</i> (Pardinho) – fígado | 25 - controle negativo da reação |
| 13 - <i>D. novemcinctus</i> (Pardinho) – pulmão | 26 - Low Mass DNA ladder |
- (*) – Amostras suspeitas

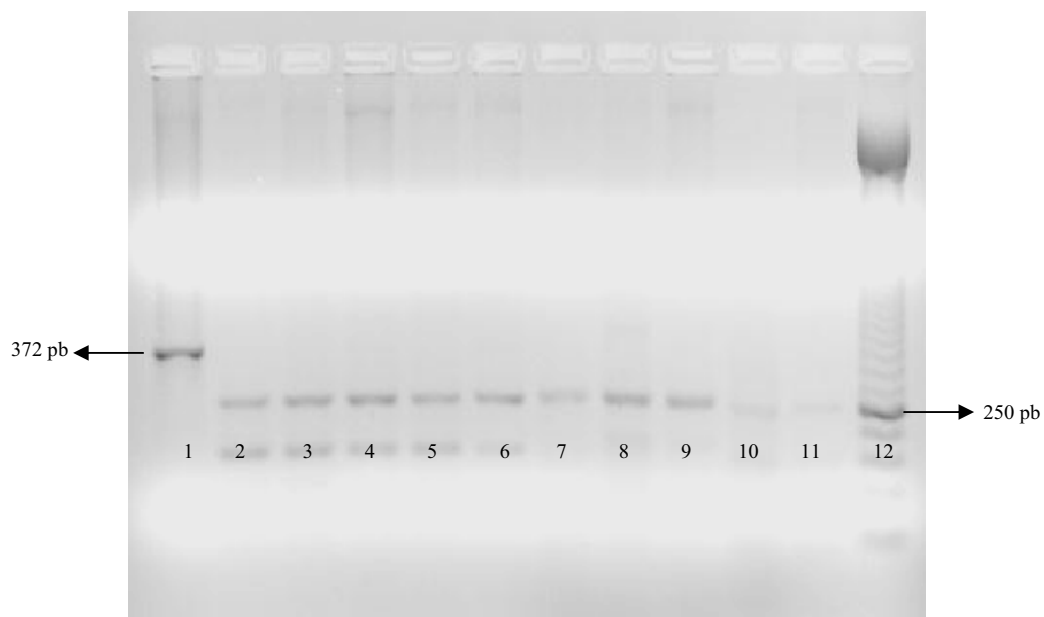


Figura 24: Pesquisa de RLEP em amostras de DNA de tatus selvagens. O fragmento esperado é de 372 pb. Visualização: gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

- 1 - *D. novemcinctus* inoculado com *M. leprae*
- 2- *D.* (Serrito 1) – fígado
- 3 – *D. novemcinctus* (Serrito 1) – baço
- 4 - *D. novemcinctus* (Serrito 1) – linfonodo próximo do fígado
- 5 - *D. novemcinctus* (Serrito 1) – linfonodo pulmonar
- 6- *D. novemcinctus* (Serrito 1) – pulmão
- 7 – *D. novemcinctus* (Dh1) – fígado
- 8 – *D. novemcinctus* (Dh1) – baço
- 9 – *D. novemcinctus* (Dh1) – linfonodo mesentérico
- 10 – *D. novemcinctus* (T16) – fígado
- 11 – *D. novemcinctus* (T13) – pulmão
- 12 – 50pb DNA ladder

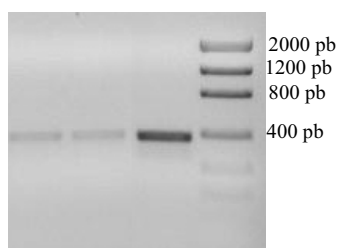


Figura 25: Pesquisa de RLEP em amostras de DNA de tatus selvagens. O fragmento esperado é de 372 pb. Bandas recortadas do gel e purificadas para seqüenciamento genômico. Visualização: gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

- 1 – **Man 7 (fezes)**
- 2 - **Man 4 (fezes)**
- 3 – ***D. novemcinctus* inoculado com *M. leprae***
- 4 – Low Mass DNA ladder

1.3.2. Pesquisa de RLEP de *M. leprae* em outros animais selvagens:

Outros animais selvagens também não apresentaram as seqüências específicas de *M. leprae* (Figura 26).

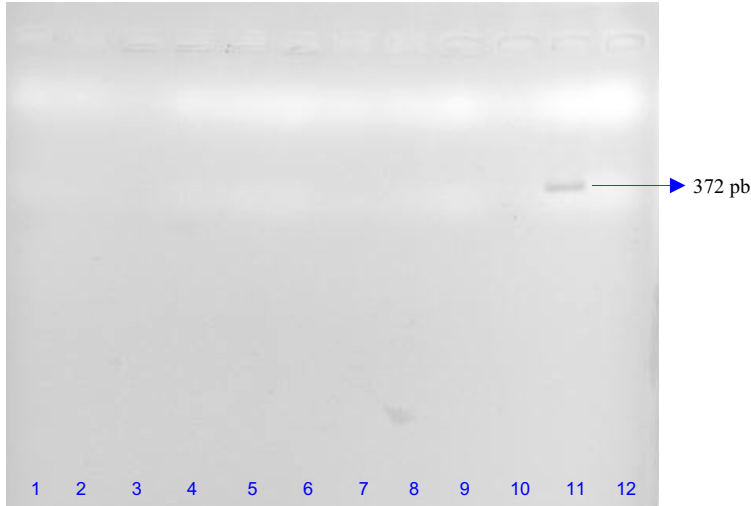


Figura 26: Pesquisa de RLEP em amostras de DNA de tatus selvagens. O fragmento esperado é de 372 pb.

- 1- Ouriço (baço)
- 2- mão-pelada (linfonodo mesentérico)
- 3- preá (linfonodo mesentérico)
- 4 – preá (baço)
- 5 – cachorro-do-mato (baço)
- 6- cachorro-do-mato (linfonodo mesentérico)
- 7- furão (baço)
- 8 – cachorro-do-mato (baço)
- 9- cachorro-do-mato (baço)
- 10 – furão (baço)
- 11- tatu inoculado com *M. leprae*
- 12 – controle negativo da reação

5.2. Seqüenciamento genômico das amostras de tatus:

Os produtos amplificados das amostras dos tatus Man 4 (fezes)*, Man 7 (fezes)* e *D. novemcinctus* inoculado com *M. leprae* (Figura 22) foram purificados do gel de agarose, para retirada das bandas inespecíficas e obtenção das bandas fracamente visíveis de aproximadamente 372 pb. Estas bandas foram submetidas ao seqüenciamento genômico para confirmação dos resultados da amplificação.

Analisando-se as seqüências *Forward* e *Reverse* no banco de dados *GeneBank*, Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), verificou-se que as seqüências dos fragmentos provenientes de tatus selvagens não foram compatíveis com *M. leprae*, nem apresentaram similaridade entre si. As seqüências *Forward* e *Reverse* não puderam ser alinhadas, provavelmente por se tratarem de fragmentos inespecíficos.

A seguir, as seqüências das amostras analisadas (*Forward* e *Reverse*):

1 – *D. novemcinctus* (Man 4)

>SCBP 1-FWD

```
CCCAANGNAAGGGGGTTCTCAGCAAATGGCAGCAGNTAGCCGTCTGATATTTCGCGG
AAGAGTCACCGCTGTGACCAATTGCTTTAGTGTTCTGGGAAAGCCTGAATTATCCCG
AGCAACATTATTGTTCGGATATCATCATACGACGCAGCACGACGCACCATGTTGCGA
GCACCGGTGGCTGCAGTTGCATCATTGTTATCCCCTTTCTGTTGCCAATAGTTGGG
CTTCATGTCCACGGTTGCAGTTCGCGGGAGCAGTGTGACACACAACACTACCGATCCT
GCTGGGGTATCTCCAGCCCTCNACGGTTCGAGCTCAATCGCCAGGGATGTTTCCAT
TGACAACACTAGTTGGGGTTCGCTCGCGGCCAGACACGAAGTGCCGATGGAGCGAAA
CTGCCGTCTGAGTGTTGTGGTGCCTGTATCAAGATAATGTCGCTTCAGTCGTATTG
GGCAGTGAGCGCAGTTTCGCGTGTAGGCTACTAATCTACTCTACTAGTCTTGCGAT
GCGACTATCAGAGAGTAATCGGGGCGNCGGGA
```

>SCBP1 REV-COMPL

```
AATTTCAATTTGAATCGTAAAAGCATGGTTCGGGTGGGCTCGAAGGTTCAAGGCCAA
GCAATATGGCTGCGTTGGACTCGTCGAATTGCGAAAGAATGCAACCGCGTCTTCCG
CAATTTATTCTGTGTCTTGGGACAACCTCTATAGTGTNCCAATGAGCACTGTTTCGT
TCCGAAGCTCTATACTGACACAATCNCGATCACGACCGTCTTACATCGAGCCCGTG
GCAGCATTTACATTTTTCCATATTTTGCAAATAGGTCATTTCAGTCGTCACGGGAG
ATGCGCAAACACACACCTGTGGTTTTACCTCGCGCAGCACGACGGCTGTTCTGCC
ATAGCTGGGTGTCGTCGACCAAACAATGACCACTGGTACGCGAATGACCGCATTGG
TGCGTTTCAAGTAAGTCCCTCGCATTTGGCAGTGNCCAGCTTCGCGTGTANGCTACA
ATCATNAGTGNCTTTTTCTCTG
```

2 – *D. novemcinctus* (Man 7)

>SCBP2-FWD

```
AGTGCACATGGCGCGTGCCGTCTGAATTGCAGAACATCACGCTGTGTACCATTTAC
TTTGTGGAAACACCTCAACTCTTCCAGACATATGGTCAGAACCTCGAGTACGATCC
AGCCTAGCTCGATCNTTACACCCGTGGCGCATTACATTTTCTTTTGTGCAACA
GTGGTCATTCATGGTCGTCCGGGAGTGGCAGAACACCATCCTGATGTGTTTCAGCC
TCGTTCGTTCAGCCTAGCGCGGTTCGCTTCCCTGCATCAGATGGAGTCGTCCGCGCAAAC
AATGCCATGGAGCGAAATGCCGCATTTGGTGCNTATCAGTAAGTCCCTCGCTTN
GCAGTGGCCAGGTCCGCGTGTACGGCACAACTCACCACAGCTTGCAGTTGCATCGA
TGGATC
```

>SCBP2 REV-COMPL

```
ATGCACGTAAGCCTGTTCGGTGGCCGAAGTCAGCCAGCAATGGCGCGTNCCGTCGAA
TTGGNGAAATCACGCGTTGTCCATCTTCTTTCTTGGAAACACTAATCCACAGACA
TGTTGATCGAAACTGCATCGACACATCACATCCACGTATTACAGCAACCGTGCAGC
ATTCACATTTTCTATTTGCAAATGGTCATTTCAGTCGTCCGGGTAGTGGCAAACAC
CACCTGTGGTTTTCACCTCGCGCAGCACGCGGTGTTCCCTGCATAGTGGGTTCGTCCGC
CAAACAATGACCATGGAGCGAATGCCGCATTTGGTGCNTTCCAGTAAAGTCCCTCG
CTTTGCATGGCCAGTTTCGCGTGTAGCACATCACAGCTT
```

3 – *D. novemcinctus* inoculado com *M. leprae*

>SCBP3 FWD

```
GGGCCTTTGGTCTACATGTTGATGATGCAGGGGCTGGGCACTGGGCTGTGCTGAAGGCGA
TATCGATGCAGGCGTGAGTGTGAGGATAGTTGTTAGCGCCGCGGGGTAGGGGCGTTTTAG
TGTGCATGTCATGGCCTTGAGGTGTTCGGCGTGGTCAATGTGGCCGCACCTGAACAGGCAC
GTCCCCGTGCACGGTATAACTATTCGCACCTGATGTTATCCCTTGCACCATTTCTGCCGC
TGGTATCGGTGTTCGGCGGCTTGTGACCGGCCCTCAGCCAGCAAGCAGGCATGCCGCGG
GTGCAGCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCATCG
```

>SCBP3 REV-COMPL

```
AGCCTGTCGGTGGTGGATGCTGCTTGGTCTACATGTTGATGATGCCAGGGGCTGGGCACC
TGGGCTGTGCTGAAGGCGATATCGATGCAGGCGTGAGTGTGAGGATAGTTGTTAGCGCCG
CGGGGTAGGGGCGTTTTAGTGTGCATGTCATGGCCTTGAGGTGTTCGGCGTGGTCAATGTG
GCCGCACCTGAACAGGCACGTCCCCGTGCACGGTATAACTATTCGCACCTGATGTTATCC
CTTGCACCATTTCTGCCGCTGTATCGTGTTCGGCGGCTTGTGACCGGCCCTCAGCCAGCAA
GCAGCATGCCGCGGTCAGCAGTATGTAAGGG
```

Alinhando as seqüências *Forward* e *Reverse* do controle positivo, foi obtida uma seqüência de 329 pb, que segue:

TTGGTCTACATGTTGATGATGCCAGGGGCTGGGCACCTGGGCTGTGCTGAAGGCGA
TATCGATGCAGGCGTGAGTGTGAGGATAGTTGTTAGCGCCGCGGGGTAGGGGCGTT
TTAGTGTGCATGTCATGGCCTTGAGGTGTCGGCGTGGTCAATGTGGCCGCACCTGAA
CAGGCACGTCCCCGTGCACGGTATAACTATTTCGCACCTGATGTTATCCCTTGACCA
TTTCTGCCGCTGGTATCGGTGTCGGCGGCTTGTTGACCGGCCCTCAGCCAGCAAGC
AGCATGCCGCCGGGTGCAGCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCATCG

Esta seqüência apresentou 100% de identidade com *M. leprae* no Blast-n (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), indicando que a técnica foi adequada aos objetivos propostos.

DISCUSSÃO

A identificação pelo PRA das micobactérias isoladas em cultura, provenientes de amostras de escarro de pacientes encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do ILSL, constituiu-se em importante recurso diagnóstico ao nível de espécie. A técnica empregada foi rápida, de fácil execução e aplicabilidade, diferentemente dos métodos convencionais, que se baseiam nas características bioquímicas dos isolados e despedem muito tempo para a sua realização.

Por outro lado, não podemos recomendar sua utilização para as amostras de tecidos de hamsters e tatus, pois, no modelo experimental utilizado, a PCR para *hsp65* resultou em bandas fracamente visíveis, embora compatíveis com o tamanho esperado (439 pb). Após a restrição enzimática dos produtos amplificados, não foram observados os fragmentos de restrição em nenhuma amostra, provavelmente devido à concentração insuficiente do produto amplificado. Em conseqüência, não ocorrendo amplificação suficiente a partir de DNA de um animal experimentalmente infectado, deduz-se pelo não funcionamento do protocolo para um animal selvagem paucibacilar.

Em relação ao nível de sensibilidade das técnicas empregadas para diagnóstico de micobactérias em tecidos de hamsters, evidenciou-se em ordem decrescente, a PCR para *hsp65*, a cultura em LJ e a baciloscopia semi-quantitativa. Os métodos de extração de DNA tecidual, por sua vez, proporcionaram bons resultados com DNA de alto peso molecular menos degradado através de extração fenólica após criofatura e digestão com proteinase-K (protocolo nº 1). Já o protocolo de extração com NaCl 5M, forneceu DNA extremamente degradado, levando -nos a optar pelo protocolo nº 3 devido ao fato de que as lavagens com TE antes da digestão com Proteinase-K ajudaram a retirar parte do sangue dos tecidos, especificamente da hemoglobina considerada um inibidor da PCR.

Em base destes resultados, decidiu-se aplicar o protocolo de extração fenólica com pré-tratamento (protocolo nº 3) e padronizar uma reação de PCR com *primer* específico de *M. leprae* para a amplificação direta a partir do DNA tecidual, bem como o PRA nas demais micobactérias que fossem isoladas.

Contudo, com a finalidade de escolher um método de PCR de alta especificidade para *M. leprae*, foram testados *primers* de RLEP utilizando-se como controle positivo, DNA de *D. novemcinctus* experimentalmente infectado com suspensão de *M. leprae*. Não são todos os tatus infectados experimentalmente que apresentam a hanseníase, mas quando a desenvolvem, apresentam grande quantidade de bacilos em fígado, baço e linfonodos, adrenais, pele e pulmões e poucos em orelha e testículos (Rosa *et al.*, 2005).

Foram testados três métodos de PCR para RLEP de *M. leprae*, porém, diferentemente de Kang e colaboradores (2003), na TD-PCR foram obtidos fragmentos do tamanho esperado (129 pb), tanto para o tatu experimentalmente infectado (controle positivo), como para as outras micobactérias (*M. smegmatis* MC² 155 e *M. avium*), fato que demonstrou a inespecificidade dos *primers*.

A reação de Nested-PCR (DONOGHUE *et al.*, 2001) também se mostrou inespecífica, já que foram amplificados fragmentos de mesmo peso molecular não só em controle positivo e em tatus selvagens, mas também em controles de especificidade, *M. smegmatis* MC²155 e *M. avium*. Contudo, utilizando-se outro par de *primers* para RLEP de *M. leprae* que amplifica um fragmento de 372 pb (WOODS & COLE, 1989; GROSSKINSKY *et al.*, 1989; SANTOS *et al.*, 1993), a reação mostrou-se específica, visualizando-se banda com peso molecular esperado somente no controle positivo, mas não em *M. avium*, *M. smegmatis* MC² 155 e em tecidos de hamsters inoculados com *M. avium*, comprovando-se assim a especificidade dos *primers* e da reação.

A fim de se estabelecer o limite de detecção de reação da PCR para RLEP (fragmento de 372 pb), o DNA total extraído do controle positivo foi quantificado em 5 ng/μl e, a seguir, foram feitas diluições sucessivas para servir de molde para a PCR. O limite de detecção da reação foi estabelecido em até 500 fg/μl de DNA total. A partir deste momento, terminada a padronização da metodologia, foi iniciada a pesquisa em tatus selvagens.

À necrópsia, os quatro animais apresentavam lesões compatíveis com gastroenterites hemorrágicas, com presença de nematóides. Havia também o comprometimento de órgãos do sistema fagocítico mononuclear e pequenos nódulos pulmonares. Nestes animais foi diagnosticada a Paracoccidioidomicose (RICHINI-PEREIRA – comunicação pessoal).

Tanto na baciloscopia semi-quantitativa, como na cultura em LJ, não foram observados BAAR nos tatus selvagens. Também, pela PCR simples para RLEP de *M. leprae*, das 50 amostras testadas, nenhuma proveniente de órgãos internos apresentou bandas do tamanho esperado. Das amostras provenientes de fezes, duas apresentaram bandas fracamente visíveis de 372 pb.

A fim de verificar se estas bandas eram realmente relativas às seqüências repetitivas de *M. leprae*, foi realizada uma contra-prova para uma PCR simples para *hsp65*, presente em todas as micobactérias. Não foi visualizada a banda de 439 pb nas amostras de tatus selvagens, porém foi identificada no tatu inoculado com *M. leprae*.

O seqüenciamento destas amostras selvagens também não foi compatível com o *M. leprae*. O controle positivo, entretanto, apresentou 100% de identidade com *M. leprae*. Ao analisar estes resultados, foi observado que a técnica empregada funcionou perfeitamente para o controle positivo, ou seja, para o tatu inoculado com *M. leprae*. Entretanto, com base na metodologia, não foi identificado nenhum tatu ou outro animal selvagem portador do bacilo.

Neste trabalho, em que foram testados 21 tatus e 10 animais de outras espécies (quatis, gambás, ouriço, mão-pelada, preá, furão, cachorro-do-mato) da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, não foi detectado o agente causador da hanseníase, com exceção de duas amostras de fezes de tatus *D. novemcinctus*, que foram positivas para RLEP (banda de 372 pb). Entretanto, o achado de amostras de DNA positivas nas fezes não indica a presença de bacilos viáveis. Pode-se concluir dois fatos: primeiro que se os bacilos nas fezes forem mesmo *M. leprae* viáveis, pode-se sugerir que o tatu apresenta um papel importante como reservatório da hanseníase. Por outro lado, a presença de bacilos não viáveis indica que, em algum momento, este animal teve contato com alguma fonte ambiental de bacilos, o que pode mostrar a distribuição espacial da doença, sendo o tatu um indicador biológico da presença de bacilos no ambiente.

Modos de transmissão envolvendo reservatórios não-humanos têm sido sugeridos. Sabe-se que bacilos viáveis podem sobreviver em secreções nasais secas por até sete dias e por até 46 dias em solo (Browne, 1994). Além do solo (CHAKRABARTY *et al.*, 2001; KAZDA *et al.*, 1986), já foi sugerida a participação de água (MATSUOKA *et al.*, 1999), vegetação (KAZDA *et al.*, 1990) animais (incluindo tatus, macacos mangabeys e chimpanzés) (MEYERS *et al.*, 1992; WALSH *et al.*, 1988) e artrópodes (pulgas, besouros, mosquitos e moscas) (BLAKE *et al.*, 1987) na cadeia epidemiológica da hanseníase. No entanto, acredita-se que o homem seja o hospedeiro e reservatório do *M. leprae* e que a PQT eliminará definitivamente a doença.

Sob o ponto de vista de Saúde Pública, o achado de amostras positivas para *M. leprae* em tatus selvagens deveria ser olhado com cuidado, e estudos posteriores de rastreamento deveriam ser realizados para verificar se o microrganismo do tatu é o mesmo do homem, e assim, comprovar o processo de transmissão.

Admite-se que o contágio ocorra através do contato freqüente e constante com o paciente hanseniano multibacilar (virchowianos e dimorfos), que elimina o bacilo para o meio exterior, podendo transmitir a doença para pessoas susceptíveis. As vias aéreas superiores e o trato respiratório são considerados as mais prováveis portas de entrada no organismo passível de ser infectado, a partir de contato direto, freqüente e constante com a pessoa doente não tratada.

Nos Estados Unidos, a hanseníase ocorre em humanos residentes nas áreas da costa do Golfo do Texas, sudeste da Louisiana e Califórnia (Enna *et al.*, 1978, Lane *et al.* 2006) e a distribuição de tatus naturalmente infectados é paralela a essa distribuição populacional. Os fatores que poderiam contribuir para a introdução e perpetuação da hanseníase em populações são difíceis de se determinar. Tatus não são domesticados, dificultando o contato com as populações de doentes. Entretanto, na era pré-sulfona, pacientes multibacilares com doença avançada viviam principalmente em áreas rurais, onde tatus naturalmente infectados foram identificados posteriormente, o que sugere que os tatus estão envolvidos na cadeia epidemiológica da doença naquela região.

Na Louisiana, Walsh e colaboradores, em 1975, relataram a presença de sete tatus com lesões disseminadas em pele, nervos, baço, fígado e linfonodos, com prevalência de 10%. A pesquisa microbiológica demonstrou a presença de BAAR não cultiváveis em meio LJ e Middlebrook 7H10, e foram suspeitos de ser *M. leprae*. Após este primeiro relato, em 49 tatus capturados no mesmo Estado foi diagnosticada doença semelhante à hanseníase. Os exames histopatológicos e microbiológicos revelaram lesões idênticas às da hanseníase experimental lepromatosa em tatus, e foram caracterizados por infiltrados histiocitários contendo grande número de BAAR intracelulares, muitos em globias clássicas (WALSH *et al.*, 1977). Em 41 tatus da Louisiana com infecção natural semelhante à hanseníase, foram conduzidos estudos histopatológicos e microbiológicos. As culturas para micobactérias de linfonodos e baço foram negativas para 24 de 32 tatus, tendo sido cultivados *M. avium* e *M. intracellulare* nos demais oito animais. Os 24 tatus foram, assim, suspeitos de estarem infectados pelo *M. leprae* (BINFORD *et al.*, 1977).

Outras micobactérias foram isoladas em cultura a partir de tecidos de órgãos de tatus selvagens e de tatus experimentalmente inoculados por *M. leprae*. Estas foram denominadas micobactérias derivadas de tatus (“armadillo-derived mycobacteria” ou ADMs).

Posteriormente, Smith e colaboradores pesquisaram a enfermidade em tatus

selvagens na Louisiana e Texas (SMITH *et al.*, 1978 e 1983, respectivamente). De 20 tatus capturados na Louisiana, dois apresentaram doença semelhante à hanseníase, que foi indistinguível da doença experimentalmente produzida pela inoculação com *M. leprae* (BINFORD *et al.*, 1976), sendo a doença similar à descrita por Walsh em 1975.

Através do mapeamento geográfico da região do Texas e Louisiana, Folse e Smith (1983) detectaram 4,66% de 451 tatus infectados na Costa do Golfo do Texas. Os animais foram primeiramente submetidos à triagem através de exame físico, biópsia de orelha e histopatologia. Os tatus suspeitos foram eutanasiados e necropsiados. Fragmentos de fígado, baço e linfonodos foram semeados em meios de cultura para micobactérias e estudados histopatologicamente. As taxas de prevalência locais variaram de 1% a 15,4%.

Posteriormente, Truman e colaboradores (1990) diagnosticaram 2,7% de positividade em 216 tatus da Louisiana. Job e colaboradores (1986) encontraram 2% infectados de 494 tatus. Em 1991, os mesmos autores encontraram taxas de positividade variáveis de 3% a 53,3% de um total de 39 tatus na Louisiana. Neste último trabalho, os resultados da prevalência de infecção natural diferiram significativamente, de acordo com o método diagnóstico empregado. A análise histopatológica das orelhas revelou 3% de infecção nos animais; a pesquisa de anticorpos e de granulomas em linfonodos inguinais revelou 6,7% dos animais com doença disseminada avançada; os achados de necrópsia demonstraram 13,3% de infecção e a PCR dos linfonodos inguinais indicou 53,3%, portanto, este foi considerado o método mais sensível.

Desde a descoberta do glicolípido fenólico-I (PGL-I), um antígeno específico do *M. leprae* (HUNTER & BRENNAN, 1981), a presença de anticorpos IgM anti-PGL-I em pacientes hansenianos e seus contatos tem sido relatada (BUCHANAN & DISSANAYAKE, 1983; DOUGLAS *et al.*, 1987).

Truman e colaboradores (1986) detectaram anticorpos específicos anti-PGL-I em 20% dos soros de tatus capturados oito anos antes dos estudos de hanseníase experimental. Estudos da prevalência de anticorpos IgM anti-PGL-I em 216 tatus selvagens da Louisiana, resultaram em taxas de prevalência de 7,5% de 77 (STALLKNECHT *et al.*, 1987) e 16% de 565 animais examinados (TRUMAN *et al.*, 1991).

Os estudos de sorologia realizados nos Estados do Texas e Louisiana demonstraram que, ainda que os tatus selvagens daquelas regiões tenham apresentado taxas elevadas de anticorpos, ainda foi baixa a prevalência da doença em humanos.

Outros grupos de pesquisadores (KIRCHHEIMER & SANCHES, 1978;

KIRCHHEIMER, 1979; HOWERTH *et al.*, 1990) não confirmam os achados de tatus naturalmente infectados e relatam que os tatus selvagens não possuem o *M. leprae*.

No Centro de Pesquisa de Carville, Louisiana, Kirchheimer e colaboradores iniciaram as pesquisas de hanseníase em tatus selvagens quando o Dr. Sohan L. Issar informou o corpo científico local que havia conseguido reproduzir um quadro de micobacteriose generalizada em um tatu não infectado experimentalmente. A partir daí, começaram a investigar as possíveis origens de infecção destes animais, e publicaram várias pesquisas com resultados negativos para doença semelhante à hanseníase em diferentes áreas geográficas dos Estados Unidos. Entre janeiro de 1974 a dezembro de 1977, nenhum de 373 tatus apresentou sinal clínico ou histopatológico, sendo 288 animais provenientes da Louisiana, 78 da Flórida e 14 do Texas (KIRCHHEIMER *et al.*, 1979).

No período de janeiro de 1974 a junho de 1978, já haviam sido examinados 396 tatus selvagens, onde 306 eram da Louisiana e o restante da Florida e Texas. Apenas um animal (0,3%) apresentou sinais clínicos de micobacteriose generalizada, que foi confirmada histopatologicamente (KIRCHHEIMER, 1979).

Na região sudeste dos Estados Unidos, que compreende Alabama, Arkansas, Flórida, Geórgia e Mississipi, não foram encontrados tatus naturalmente infectados por *M. leprae*. Na Flórida, também não houve evidências de doença em 800 tatus examinados (Walsh *et al.*, 1977; Kirchheimer & Sanches, 1978). Howerth e colaboradores, em 1990, examinaram microscopicamente fragmentos de orelhas de 853 tatus da região, e todos foram negativos para o microrganismo e para lesões compatíveis com hanseníase.

Dhople e colaboradores (1986) relatam que “contrariamente aos achados em tatus da Louisiana e Texas, os da Flórida são livres de infecção semelhante à hanseníase natural”. Os autores não identificaram o bacilo de Hansen em animais inoculados com biópsia de paciente e de tatus, mas conseguiram o isolamento em cultura de *M. gordonae*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*, a partir de seis amostras de tecidos em 77 tatus, dentre fragmentos de orelha, mucosa nasal, sangue, fígado e baço.

Experimentalmente, não são todos os animais que são susceptíveis à infecção por *M. leprae*, pois alguns não desenvolvem a doença, mesmo quando inoculados com elevada carga bacilar. No entanto, admite-se que os tatus apresentem um *status* imune semelhante ao de alguns pacientes em que a doença é autolimitada, mas que permanecem com título de anticorpos (ROSA *et al.*, 2005).

Não se sabe se os tatus dessas regiões apresentam as duas formas de doença.

Os estudos da presença de anticorpos sugerem que pode ocorrer a apenas a forma tuberculóide, pois a forma virchowiana o condicionaria a ficar na toca. Neste caso, seria necessário fazer uma busca ativa de animais mortos, objetivando-se esse esclarecimento.

Em Corrientes, Argentina, ZUMARRAGA e colaboradores, em 2001, utilizaram o PRA em amostras de DNA extraído de baço, fígado e linfonodo poplíteo de um tatu selvagem, e os resultados foram comparados a amostras de três lepromas humanos. Os autores sugerem a existência de infecção natural neste tatu *D. novemcinctus* em uma área endêmica para hanseníase humana.

No Brasil, Deps e colaboradores (2002) avaliaram 14 tatus *D. novemcinctus* em uma área rural de elevada endemicidade do Estado do Espírito Santo. Nenhum dos animais estudados apresentou lesões macroscópicas sugestivas de hanseníase. Entretanto, testes de hibridização de DNA com *primers* específicos para *M. leprae*, a partir de amostras do sangue de cinco animais foram positivos. A autora sugere que o tatu selvagem pode ser considerado um reservatório natural de *M. leprae*.

O achado de tatus selvagens naturalmente infectados pelo *M. leprae* na Louisiana, que albergam o SNP tipo 3, da América e Norte da África, indica que esses animais foram contaminados por fontes humanas (MONOT *et al.*, 2005).

Os possíveis achados de *M. leprae* em tatus selvagens seriam importantes para a tipagem molecular do bacilo, para o estudo da distribuição global e geográfica de diferentes clones de *M. leprae*, explorando correlações entre genótipos do microrganismo e a incidência de taxas de hanseníase, bem como dos tipos de manifestações da doença.

Embora estes resultados não sejam definitivos, o risco de adquirir hanseníase de tatus nesta região, provavelmente, é baixo com base nas pequenas taxas de prevalência da doença nesta área e nos resultados negativos para *M. leprae* nos animais.

Os resultados positivos da PCR para RLEP de *M. leprae* nas amostras das fezes dos dois tatus selvagens, somados a todos os demais, que foram negativos, sugerem que há um indicativo de que o tatu pode apresentar um papel na cadeia epidemiológica da doença. Este é um estudo indicativo, que necessita de confirmação, através de pesquisas mais aprofundadas, como o teste de hibridação do DNA com sonda interna para RLEP, após transferência para membrana, ou mesmo o teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-PGL-I. Existe a possibilidade de que os produtos amplificados a partir das amostras de fezes dos tatus selvagens sejam bandas inespecíficas, por não se tratarem de amostras de DNA purificado de *M. leprae*. Mas, como as bandas de 372 pb são mais fortes, há grande chance de que seja o produto certo. Ainda que os testes posteriores de

hibridação comprovem que o DNA presente nas fezes é realmente do *M. leprae*, será necessário verificar se os bacilos estão viáveis após a passagem pelo sistema digestivo.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que os tatus da região Centro-Oeste paulista podem apresentar um papel de reservatório na cadeia epidemiológica da hanseníase.

CONCLUSÕES:

- Com base na metodologia empregada, não recomendamos a aplicação do PRA para amostras de tecidos - somente para tipificação de micobactérias previamente isoladas em cultura.
- O modelo experimental proposto para a infecção precoce por *M. avium* foi útil e adequado para os fins de padronização das metodologias.
- Não foram detectadas micobactérias cultiváveis a partir de tecidos de tatus selvagens.
- Com base na metodologia empregada, os outros animais selvagens (quatis, gambás, ouriço, mãos-pelada, preás, furões e cachorros-do-mato) da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo parecem não apresentar infecção natural por *M. leprae*.
- Os resultados preliminares deste estudo sugerem que existe um indicativo de que os tatus selvagens podem apresentar papel de reservatório de *M. leprae* na cadeia epidemiológica da doença, na região estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MEDLINE, PUBMED. National Library of Medicine's Medline and pre-medline database. 2006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>.
2. Ducati RG, Basso LA, Santos DS. Micobactérias. In: Trabulsi LR, Alterthum F, ed. Microbiologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004: 409-21.
3. Opromolla DVA. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Reynaldo Quagliato, Instituto Lauro de Souza Lima; 2000.
4. Browne, SG. In: Hastings RC, editor. Leprosy. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994: 394-5.
5. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C et al. On the Origin of Leprosy. Science 2005; 308: 1040-2.
6. WHO. World Health Organization. Leprosy. 2006. Available from: <http://www.who.int/lep/en/>.
7. Brasil, Ministério da Saúde, 2006. Disponível em <http://portal.saude.gov.br>.
8. Rojas-Espinosa O, Lovik M. Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepramurium infections in domestic and wild animals. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2001; 20: 219-51.
9. Walsh GP, Storrs EE, Burchfield HP, Cotterell EH, Vidrini ME, Binford C H. Leprosy-like disease occurring naturally in armadillos. J Reticuloendothel Soc 1975; 18: 347-51.
10. Meyers WM, Gormus BJ, Walsh GP, Baskim GB, Hubbard GB. Naturally-acquired and experimental leprosy in nonhuman primates. Am J Trop Med and Hyg 1991; 44: 24-7.
11. WHO. World Health Organization. Leprosy. 2005. Available from: <http://who.int/topics/leprosy/en>.
12. Laguna AF. El cachicamo sabanero: aspectos de su biología y ecología. Fondo Edit Acta Cient Venezol, 1984: 15-7.
13. Talmage RV, Buchanan GD. The armadillo *Dasypus novemcinctus* – a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. Rice Inst Pamphlet Houston 1954; 4: 247-56.

14. Frechkop S, Yepes J. Etude systématique et zoogéographique des Dasipodidés conservés a 1' Institut. Bull Inst Roy Sci Nat Belg 1949; 25: 2-56.
15. Cabrera A. Catálogo de los mamíferos de America del Sur. Rev Mus Argent Cienc Nat "Bernardino Rivadavia". Zool 1958; 4: 1-307.
16. Moeller W. Allomestrische Analyse der Gurteltierschadel ein Beitrag zur Phylogenie de Dasypodidae Bonaparte, 1838. Zool Jb Anat 1968; 85: 411-528.
17. Thomas O. The mammals of the Tenth Edition of Linnaeus; an attempt to fix the types of the genera and the exact bases and localities of the species. Proc Zool Soc London 1911; 120-58.
18. Wetzel RM. The identification and distribution of recent xenarthra (Edentata) and taxonomy and distribuiton of armadillo, Dasypodidae. In: Montgomery GG, editor. The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilingua,. Smithsonian Institution, Washington; 1985: 279-92.
19. Wetzel RM. A revision of the naked-tailed armadillos, genus Cabassous McMurtrie. Ann Carnegie Mus Nat Hist 1980; 49: 323-57.
20. Taber FW. Contribution on the life story and ecology of the nine-banded armadillo. J Mammal Baltimore 1945; 26: 211-6.
21. Souza LCD, Dalpino D, Costa HC. Avaliação Hematológica em Tatus (*Dasypus novemcinctus*) Capturados na Cidade de Bauru – SP. Salusvita 1987; 6: 79–88.
22. Binford CH, Meyers WM, Walsh GP, Storrs, EE, Brown HL. Naturally Acquired Leprosy-like disease in the Nine-Banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): Histopathologic and Microbiologic Studies of Tissues. J Reticuloendothelial Soc 1977; 22: 4.
23. Hall RM, Ratledge C. Micobactins in the classification and identification of armadillo-derived mycobacteria. FEMS Microbiol Let 1985; 28: 243-7.
24. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatous leprosy in an experimentally infected armadillo. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1971; 39: 692.
25. Storrs EE. The nine-banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1971; 39: 703-14.
26. Barreto MP. Reservatórios e vetores de *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Arq Hig Saúde Pub 1963; 28: 43-66.

27. Lainson R, Shaw JJ, Fraha H, Miles MA, Draper CC. Chagas's disease in the Amazon basin: I. Trypanosoma cruzi infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in state of Pará, north Brazil. *Trans Royal Trop Med Hyg* 1979; 73: 193-204.
28. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barret TV, Momen H et al. Epidemiological and nosological aspects of Leishmania naiffi Lainson & Sahw. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 317-21.
29. Sogorb F, Jamira LF, Guimarães EC. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1977; 19: 91-4.
30. Gezuele E. Fatal infection by Nocardia brasiliensis in an armadillo. *Sabouraudia* 1972; 10: 63-5.
31. Diniz LSM, Costa EO, Oliveira PMA. Clinical disorders in Armadillos (Dasypodidae, Edentata) in Captivity. *J Vet Med* 1997; 44: 577-82.
32. Kaplan W, Broderson JR, Pacific JN. Spontaneous systemic sporotrichosis in nine-banded armadillos (Dasypus novemcinctus). *Sabouraudia* 1992; 20: 289-94.
33. Arias JR, Naiff RD, Naiff MF, Mok WY, Almeida MMR. Isolation of Histoplasma capsulatum from an armadillo (Dasypus novemcinctus) in the eastern Amazon of Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1982; 76: 705-6.
34. Eulalio KD, Macedo RL, Cavalcanti AS, Martins LMS, Lazera MS, Wanke B. Coccidioides immitis from armadillos (Dasypus novemcinctus) in the state of Piauí, Brazil. *Mycopathol* 2000; 149: 57-61.
35. Gordon MA. Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson, from systemic infection in an armadillo (Dasypus novemcinctus). *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 109-16.
36. Naiff RD, Ferreira LCP, Barrete TV, Naiff MF, Arias Jr. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (Dasypus novemcinctus) no estado do Pará. *Ver Inst Méd Trop São Paulo* 1986; 53: 19-27.
37. Silva-Vergara ML. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidioidomicose. Estudo em área agrícola de café. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30: 83-6.
38. Bagagli E, Sano A, Coelho KIL, Alquati S, Miaji M, Camargo ZP et al. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus novemcinctus) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 505-12.
39. Silva-Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo Dasypus novemcinctus in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1999; 144: 131-33.

40. Corredor GG, Castaño JH, Peralta A, Díez S, Arango M, McEwen J et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 216-20.
41. Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, Cooper CR, McGinnis MR, Lázera MS et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol* 2000; 38: 67-77.
42. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 2001; 39: 233-41.
43. Williams DL, Gillis TP, Fiallo P, Job CK, Gelber RH, Hill C et al. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. *Molec and Cell Probes* 1992; 6: 401-10.
44. Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degrave WM. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1993; 39: 298-304.
45. Santos AR, Goes Filho JT, Nery JAC, Duppre NC, Gallo MEN, Suffys PN et al. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 11: 113-20.
46. Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo ME, Filho JT, Suffys PN et al. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1997; 46: 170-2.
47. Sakai T, Matsuo E, Wakizaka A. A genomic study of the leproma-derived and cultivable *Mycobacterium* HI-75. The direct DNA sequencing of PCR product of 16S ribosomal RNA. *Jpn J Lepr* 1996; 65: 180-5.
48. Scollard DM, Gilles TP, Williams DL. Polymerase Chain Reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Microbiol and Infectious Dis* 1997; 109: 642-6.
49. Grosskinsky CM, Jacobs Jr WR, Clark-Curtiss JE, Bloom BR. Genetic Relationships among *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, and Candidate leprosy Vaccine Strains Determined by DNA Hybridization: Identification of an *M. Leprae*-Specific Repetitive Sequence. *Infect Immun* 1989; 57: 1535-41.
50. Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in huma biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 65: 305-10.
51. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-8.

52. Devallois A, Goh KS, Rastogi, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 gene and proposition of algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2969-73.
53. Da Silva-Rocha AS, Leite CC, Torres HM, Miranda AB, Lopes MQP, Degrave WM et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *J Microbiol Meth* 1999; 37: 223-9.
54. PRASITE. Identification of Mycobacteria. Institut Pasteur. Chuv – Les Hospices Cantonaux. Swiss National Center for Mycobacteria. 2006. Available from: <http://app.chuv.ch/pls/prasite/index.html>.
55. Plikaytis BD, Plikaytis BB, Shinnick TM. Computer-assited pattern recognition model for the identification of slowly growing mycobacterial including *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 2265-73.
56. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 296-303.
57. Da Silva-Rocha AS, Barreto, AMW, Campos CED, Silva MVB, Fonseca L, Saad MH et al. Novel allelic variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-Restriction Enzyme Analysis of hsp65. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4191-6.
58. Leão SC, Briones MRS, Sircili MP, Balian SC, Mores N, Ferreira-Neto JS. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-Restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 87: 2592-7.
59. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 Mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Lenght Polymorphism Analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2799-806.
60. Oliveira SL, Ibanez OM, Mouton D, Santanna OA, Siqueira MS, Biozzi G. Independent polygenic regulation of quantitative antibody responsive ness and expression of delayed-type hipersensitivity (DTH). *Experim Clin Immunogenet* 1985; 2: 223-33.
61. Brasil, Ministério da Saúde – FNS/CENEPI/CNPS/CRPHF. Manual de bacteriologia da tuberculose. 20^a ed., 1994.
62. Leal N C, Almeida AMP. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1999; 41: 339-342.

63. Mahbubani MH, Bej AK. Applications of polimerase chain reaction methodology in clinical diagnostics. In: Griffin LC, Griffin AM, editors. PCR Technology: Current innovations. Boca Raton, 1994: 307-326.
64. Gene Bank. Blast-n. National Library of Medicine and the National Institutes of Health. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>)
65. Rosa PS, Belone AFF, Silva EA, Pedrini SCB, Pinke CAE. Inoculação experimental de tatus com o *M. leprae*: resultados preliminares. 10^o Congresso Brasileiro de Hansenologia; 2005 Nov 19-22; Recife, Brasil.
66. Kang TJ, Kim SK, Lee, SB, Chae GT, Kim, JP. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Experim Dermatol* 2003; 28: 420-424.
67. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *M. leprae* DNA. *J Med Microbiol* 2001; 50: 177-82.
68. Chakrabarty AN, Dastidar SG, Sen A, Banerjee P, Roy R. Leprosy bacillus – possibly the first chemoautotrophic human pathogen cultivated in vitro and characterised. *Indian J Exp Biol* 2001; 39: 962-83.
69. Kazda J, Ganapat R, Revankar C, Buchanan TM, Young DB, Irgens LM. Isolation of environment-derived *Mycobacterium leprae* from soil in Bombay. *Lepr Rev* 1986; 57: 201-8.
70. 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* 1999; 71: 61-7.
71. Kazda J, Irgens LM, Kolk AH. Acid-fast bacilli found in sphagnum vegetation of coastal Norway containing *Mycobacterium leprae* specific phenolic glycolipid-I. *Int J Lepr* 1990; 58: 353-7.
72. Meyers WM, Gormus BJ, Walsh GP. Nonhuman sources of leprosy. *Int J Lepr* 1992; 60: 477-80.
73. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gormus BJ, Baskin GB, Wolf RH, Gerone PJ. Leprosy as a zoonosis: an update. *Acta Leprol* 1988; 6: 51-60.
74. Blake LA, West BC, Lary, CH, Todd JR. Environmental nonhuman sources of Leprosy. *Rev Infect Dis* 1987; 9: 562-77.
75. Enna CD, Jackson RR, Trautman JR, Sturdivant M. Leprosy in the United States. *Public Health Reports* 1978; 93: 468-73.

76. Lane JE, Balangon MV, Dela Cruz EC, Abalos RM, Tan EV, Cellona RV et al. *Mycobacterium leprae* in untreated lepromatous leprosy: more than skin deep. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31: 469-70.
77. 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.
78. 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.
79. Smith JH, Folse DS, Long EG, Christie JD, Crouse DT, Tewes ME et al. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) of the Texas Gulf Coast: epidemiology and mycobacteriology. *J Reticuloendothel Soc* 1983; 34:75-88.
80. 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. *Int J Lepr other mycobact Dis* 1976; 44: 80.
81. Folse DS, Smith JH. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) on the Texas Gulf Coast: anatomic pathology. *J reticuloendothel Soc* 1983; 34: 341-57.
82. Truman RW, Job CK, Hastings RC. Antibodies to the phenolic glycolipid-1 antigen for epidemiologic investigations of enzootic leprosy in armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Lepr Rev* 1990; 61: 19-24.
83. Job CK, Harris EB, Allen JL, Hastings RC. A random survey of leprosy in wild nine-banded armadillos in Louisiana. *Int J Lepr other mycobact Dis* 1986; 54: 453-7.
84. Job CK, Sanches RM, Hastings RC. An attempt to produce experimental tuberculoid leprosy in the nine-banded armadillo. *Ind J Lepr* 1991; 63: 159-65.
85. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *M. Leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* 1981; 147: 728-35.
86. Buchanan TM, Dissanayake, S. Evaluation of the significance of antibodies to PGL-I of *M. Leprae* in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr* 1983; 51: 658-9.
87. Douglas JT, Celona RV, Abalos RM, Madarang MG, Fajardo T. Serological activity and early detection of leprosy among contacts of lepromatous patients in Cebu, The Philippines. Letter to the Editor. *Int J Lepr* 1987; 55: 718-21.
88. Truman RW, Shannon EJ, Hagstad HV, Hugh-Jones ME, Hastings RC. Evaluation of the origin of *M. leprae* infections in the wild armadillos. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 588-93.

89. Stallknecht DE, Truman RW, Hugh-Jones ME, Job CK. Surveillance for naturally acquired leprosy in a nine-banded armadillo population. *J Wildlife Dis* 1987; 23: 308-10.
90. 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: 549-60.
91. Kirchheimer WF, Sanches RM. Examination of North American armadillos for mycobacteriosis. *Lepr India* 1978; 50: 156-60.
92. Kirchheimer WF. Examination of north american armadillos for mycobacteriosis – a further report. *Lepr India* 1979; 51: 60-4.
93. Howerth EW, Stallknecht DE, Davidson WR, Wentworth EJ. Survey for leprosy in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Southeastern United States. *J Wildlife Dis* 1990; 26: 112-15.
94. Dhople AM, Kazda J, Storrs EE. Presence of “difficult to isolate” mycobacteria in armadillos. *Ind J Lepr* 1986; 58: 29-37.
95. Zumarraga MJ. 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 Oth Mycobact Dis* 2001; 69: 21-5.
96. Deps PD, Santos AR, Tomimori JY. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo: preliminary results. *Int J Lepr Other Mycob Dis* 2002; 70: 34-5.

RESUMO

A hanseníase é, ainda hoje, um problema global de saúde pública. O Brasil e a Índia são os países com maior prevalência da doença. A existência de tatus *Dasyus novemcinctus* naturalmente infectados por *Mycobacterium leprae* foi relatada nos Estados Unidos, México, Argentina e no Brasil, no Estado do Espírito Santo. Micobactérias potencialmente patogênicas e algumas ambientais já foram isoladas destes animais. A identificação do bacilo é dificultada, particularmente pela sua incapacidade de crescimento *in vitro*. Portanto, o uso de ferramentas moleculares representa uma alternativa mais rápida e sensível para diagnóstico de micobacterioses. Neste trabalho foram feitas baciloscopia, cultura e PCR com *primers* específicos para seqüências repetitivas de *M. leprae*, a partir de DNA extraído de amostras de fígado, baço, linfonodos e pele de 21 tatus *D. novemcinctus*, *Euphractus sexcinctus* e *Cabassous tatouay* provenientes da região Centro-Oeste do Estado de SP, dos quais 17 eram provenientes do Banco de DNA do Laboratório de Biologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IBB. Para a padronização da metodologia foram utilizados hamsters experimentalmente infectados por *M. avium* e o modelo experimental para hanseníase (*D. novemcinctus*) do Biotério de Experimentação Animal do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru-SP. Com exceção de dois tatus, cujas amostras fezes foram positivas pela PCR, nenhum tatu selvagem apresentou infecção natural por micobactérias. Somente o tatu inoculado com biópsia de paciente virchowiano foi positivo, tanto na PCR, quanto no seqüenciamento genômico, que revelou 100% de identidade com o *M. leprae*. Os resultados preliminares deste estudo, com base na metodologia empregada, sugerem que existe um indicativo de que os tatus selvagens podem apresentar papel de reservatório de *M. leprae* na cadeia epidemiológica da doença, na região estudada.

Palavras-chave: *Dasyus novemcinctus*, *Euphractes* sp., *Cabassous* sp., *Mycobacterium leprae*, PCR, tatus selvagens.

ABSTRACT

Leprosy is still a worldwide public health problem. Brazil, in addition to India, show the highest prevalence rates of the disease. Natural infection of armadillos *Dasypus novemcinctus* with *Mycobacterium leprae* has been reported in the United States, Mexico, Argentina and Brazil, in the State of Espírito Santo. Potentially pathogenic and ambiental mycobacteria have been isolated from these animals. Identification of bacilli is difficult, particularly because its inability to grow *in vitro*. The use of molecular tools represent a fast and sensitive alternative method for diagnosis of mycobacteriosis. In the present study, the diagnostic methods used were bacilloscopy, culture and PCR using specific *primers* for *M. leprae* repetitive sequences. The PCR were performed using genomic DNA extracted from liver, spleen, lymphnodes and skin of 21 *D. novemcinctus*, *Euphractus sexcinctus* and *Cabassous tatouay* armadillos from the Middle Western region of the State of São Paulo. From those, 17 samples were taken from the DNA Bank of the Fungal Biology Laboratory at Department of Microbiology and Immunology – IB - Botucatu, UNESP. Standardization of the technique was done in *M. avium* experimentally infected hamsters and *M. leprae* experimentally infected *D. novemcinctus* tissue from the Laboratory Animal House at Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru-SP. No one of the wild armadillos showed natural mycobacterial infection. Only the armadillo inoculated with material collected from untreated multibacillary leprosy patient was PCR positive. The genomic sequencing revealed 100% identity with *M. leprae*. According to these preliminary studies, based on the methodology, we may conclude that wild armadillos seem play a role on epidemiology of leprosy in the Middle Western region of the State of São Paulo.

KEY-WORDS: *Dasypus novemcinctus*, *Euphractus* sp., *Cabassous* sp., *Mycobacterium leprae*, PCR, wild armadillos.

Anexo III: Árvore filogenética representativa das seqüências de RLEP de tatu experimentalmente infectado por *M. leprae*.....

