



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Élderson Mariano de Souza Valois**

**Detecção molecular da viabilidade de *Mycobacterium leprae* em animais silvestres e possível associação na manutenção da transmissão da doença em região hiperendêmica da Amazônia Meridional**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ida Maria Foschiani Dias Batista  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Ignotti

**Botucatu  
(2019)**

Élderson Mariano de Souza Valois

Detecção molecular da viabilidade de *Mycobacterium leprae* em animais silvestres e possível associação na manutenção da transmissão da doença em região hiperendêmica da Amazônia Meridional

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ida Maria Foschiani Dias Batista  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Ignotti

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Valois, Elderson Mariano de Souza.

Detecção molecular da viabilidade de *Mycobacterium leprae* em animais silvestres e possível associação na manutenção da transmissão da doença em região hiperendêmica da Amazônia Meridional / Elderson Mariano de Souza Valois. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Coorientador: Eliane Ignotti

Capes: 20100000

1. Epidemiologia molecular. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Animais como transmissores de doenças. 4. Zoonoses.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; Genes 16S rRNA e RLEP; *Mycobacterium leprae*; *Mycobacterium lepromatosis*; Zoonoses.

**DEDICATÓRIA**

## **DEDICATÓRIA**

*“Dedico esse trabalho a tia Deuza que me apoiou em toda minha trajetória acadêmica, foi mãe, psicóloga, amiga e por último e não menos importante, colaboradora da minha pesquisa de doutorado. Obrigado por existir!”*

## **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao universo (Deus)

A minha orientadora (Ida Foschiani) pela dedicação, por ter acreditado nesse trabalho e ter feito acontecer.

A minha coorientadora (Eliane Ignotti) uma grande pessoa que sempre me incentivou a ir mais longe.

A Instituição Lauro de Souza Lima (Dr. Marcos Virmont, Dra. Patrícia Sammarco Rosa, Dra. Andrea, Noeme, Rosangela, Sr Batista, Rock). Pelo apoio e suporte para que eu concluísse este doutorado.

Ao CPD ILSL, Eric, e o Japa (Ulisses).

A portaria e segurança do ILSL (Robert, Reginaldo, Sr. Zé, Amanda, Ana Paula, Vanderley, Malra, Marcio, Michel, Douglas)

A Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, professores e programa de pós-graduação em Doenças Tropicais.

A Bruna Jorgetto da pós-graduação pelo apoio e atenção que teve dado durante esses anos em meu doutoramento.

A Universidade Federal de Mato Grosso - Sinop (Professores Roberta Bronsone, Gustavo Canale) David pela amizade e disponibilidade em ajudar com as coletas dos animais.

A Universidade do Estado de Mato Grosso (Professores doutores Almeri Bumpi, Manoel Santos-Filho) Dr. Patrick ao qual sem suas coletas eu não teria amostras.

Ao grupo de pesquisa da biologia molecular que me deram apoio, em especial a Amanda que esteve comigo em todas etapas da minha pesquisa, e aos amigos Elô, Vitor, Nathan, Ana Elisa e Gabi.

A equipe técnica da biologia molecular (Priscila Balalai).

Aos meus compadres e amigos (Ana Paula e Kiwi).

Aos amigos (Robson, Tetê, Magalei, Nilo, e Welvis).

Aos amigos de longa data (Marcele, Rafael, e Contita) de Sinop.

Aos meus amigos Cesar, Igor, Kazuo, e Hugo de Cuiabá.

Ao meu amigo Diogo, Rio de Janeiro.

Aos colegas de estudo (Bruna, Giovana, Mariane, Keren, e Rodrigo).

**EPIGRAFE**

## **EPIGRAFE**

*“Deixem que o futuro diga a verdade e avalie cada um de acordo com o seu trabalho e realizações. O presente pertence a eles, mas o futuro pelo qual eu sempre trabalhei pertence a mim”.*

*Nikola Tesla*

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CEPA** - Comitê de Ética em Pesquisa Animal

**DD** - Dimorfa-Dimorfa

**DT** - Dimorfa-Tuberculóide

**DV** - Dimorfa-Virchowiana

**IB**- Índice Baciloscópico

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**ICMBio** - Instituto Chico Mendes

**MB**- Multibacilar

**OPAS** - Organização Pan-Americana de Saúde

**PB**- Paucibacilar

**PGL**– Phenolic glycolipid (Glicolípídeo fenólico)

**PQT**- Poliquimioterapia

**qPCR** - Polymerase chain reaction quantitative real time

**RNAr** - Ribosomal ribonucleic acid (ácido ribonucleico ribossômico)

**RT-PCR / qPCR**- Real Time Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase) / PCR quantitativo (Polymerase chain reaction quantitative)

**SINAN** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**SISBIO** - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**SNP** - Single Nucleotide Polimorphim

**TT** - Tuberculóide- Tuberculoide

**VV** - Virchowiana-Virchowiana

**WHO** - World Health Organization (OMS - Organização Mundial da Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa mundial epidemiológico da distribuição de casos novos de hanseníase em 2017 (Organização Mundial da Saúde, 2018)..... 36
- Figura 2.** Sintenia genômica e principais características de *M. leprae* e *M. lepromatosis*. Os 126 contigs de *M. lepromatosis* distinguem-se com cores vermelhas e laranja. As listras azuis claras indicam as repetições dispersas em *M. leprae*. A linha preta indica uma variação estrutural confirmada entre *M. leprae* e *M. lepromatosis* (Singh *et al.* 2015). ..... 39
- Figura 3.** Mapa de localização da área de estudo, sedes municipais, área dos *clusters* de captura dos roedores e marsupiais, área de captura dos tatus *Dasypus novemcinctus* e Biomas no Estado de Mato Grosso, Centro-Oeste, Brasil. .... 51
- Figura 4.** Detecção molecular de *M. leprae* para sequência repetitiva RLEP (enumerador bacilar), 16S RNAr (viabilidade) e RLEP+16SRNAr em amostras de orelha, fígado e baço oriundas de animais silvestres das Ordens Didelphimorphia e Rodentia. .... 60
- Figura 5.** Mapa da área geográfica do Estado do Mato Grosso onde estão localizados os municípios de captura e coleta das amostras de baço, fígado e orelha de animais silvestres..... 65
- Figura 6.** Mapas de localização dos *Clusters* B, C e F nas áreas de fragmentos florestais onde foram capturados os animais silvestres da ordem Didelphimorphia e Rodentia. .... 66
- Figura 7.** Mapas de localização dos *Clusters* G, H, I e J nas áreas de fragmentos florestais onde foram capturados os animais silvestres da ordem Didelphimorphia e Rodentia. .... 67
- Figura 8.** Mapa de calor gerado para a variável *RLEP* mostrando a intensidade de animais infectados entre a fronteira rural e o perímetro urbano dos municípios de

Santa Carmem, Sinop, Sorriso, Ipiranga do Norte e Vera. A representação das áreas corresponde ao ponto de coleta dos animais..... 69

**Figura 9.** Mapa de calor gerado para a variável 16S RNAr mostrando a intensidade de animais infectados entre a fronteira rural e o perímetro urbano dos municípios de Santa Carmem, Sinop, Sorriso, Ipiranga do Norte e Vera. A representação das áreas corresponde ao ponto de coleta dos animais..... 70

**Figura 10.** Detecção molecular de *M. leprae* para RLEP (presença), 16S RNAr (viabilidade) e RLEP+16SRNAr em amostras de orelha, fígado e baço oriundas de tatus da espécie *Dasybus novemcinctus*. ..... 71

**Figura 11.** Imagem de satélite do Estado de Mato Grosso, Brasil (A); área de captura dos tatus (*Dasybus novemcinctus*) no município de Marcelândia – MT (B); destaque para local de coleta em pomar de perímetro urbano (C)..... 72

**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação do fragmento de 244 pb para *M. lepromatosis* em amostras de fígado e baço. .... 73

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Informação dos animais silvestres capturados e organizados em nível de Ordem e Gênero segundo os dados de estrato vertical, dieta, biomas e tipo de amostras coletadas. .... 53

**Tabela 2.** Frequência da positividade de *M. leprae* em amostras de animais silvestres por gênero e tipo de amostras da Ordem Didelphidae..... 62

**Tabela 3.** Frequência da positividade de *M. leprae* em amostras de animais silvestres por gênero e tipo de amostras da Ordem Rodentia utilizando os marcadores RLEP e 16S RNAr ..... 64

## RESUMO

As bactérias *Mycobacterium leprae* e mais recentemente *Mycobacterium lepromatosis* são os agentes etiológicos da hanseníase que causam sérios danos neuromotores e podem evoluir para incapacidades irreversíveis. A incidência de casos novos de hanseníase em todo o mundo foi de 2.77/100 mil habitantes. No Brasil, em 2016, foram 2.665 casos somente do Estado de Mato Grosso na Amazônia Meridional, esses valores representam 88,9/100 mil habitantes no índice geral de detecção para a hanseníase. Foram capturados animais silvestres naturalmente infectados por *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis* das Ordens Cingulata, Didelphimorphia, e Rodentia, todos estavam em fragmentos florestais próximos a grupos humanos. Um total 327 amostras de biópsias foram avaliados, dos quais recuperou-se 254, sendo 187 amostras de orelhas, 77 baço, e 63 fígado de 187 animais silvestres das Ordens Cingulata, Rodentia e Didelphimorphia. Após extraídos DNA e RNA de baço, fígado, e orelha, foram avaliados por qPCR para os genes *RLEP* (enumerador) e 16S rRNA (viabilidade). Três gêneros apresentaram positividade nas orelhas para ambos os genes *RLEP* e 16S rRNA, sendo 18% para *Dasypus* (Cingulata), 60% para *Proechimys* (Rodentia) e 64% para *Marmosa* (Didelphimorphia). Enquanto que nos testes utilizando PCR multiplex obteve-se 12 amostras positivas para o gene *henM* referente a *Mycobacterium lepromatosis*, dos 13 gêneros avaliados apenas *Proechimys* e *Marmosa* apresentaram presença para o bacilo. A presença frequente do homem nos fragmentos florestais onde foram encontrados animais silvestres positivos para *M. leprae* ou *Mycobacterium lepromatosis*, aumenta a possibilidade do risco de uma infecção zoonótica. Tendo em vista que a metodologia de qPCR por meio do gene 16S rRNA foi efetiva para demonstrar a presença de *M. leprae* viável em animais silvestres.

**Palavras-chave:** Epidemiologia molecular; Genes 16S rRNA e *RLEP*; *Mycobacterium leprae*; *Mycobacterium lepromatosis*; Zoonoses.

## ABSTRACT

Bacteria *Mycobacterium leprae* and more recently *Mycobacterium lepromatosis* are the etiological agents of leprosy that cause serious neuromotor damage and can progress to irreversible impairments. The incidence of new cases of leprosy worldwide was 2.77 / 100 thousand inhabitants. In Brazil, in 2016, there were 2,665 cases of the State of Mato Grosso alone in the Southern Amazon, which represent 88.9 / 100 thousand inhabitants in the general detection index for leprosy. Wild animals naturally infected with *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* from the Cingulata, Didelphimorphia, and Rodentia orders were all captured in forest fragments close to human groups. A total of 327 biopsy specimens were evaluated, of which 254 were recovered, being 187 samples of ears, 77 spleen, and 63 liver of 187 wild animals of the Orders Cingulata, Rodentia and Didelphimorphia. After extracting DNA and RNA from spleen, liver, and ear, they were assessed by qPCR for the RLEP (enumerator) and 16S rRNA (viability) genes. Three genera presented positivity in the ears for both RLEP and 16S rRNA genes, 18% for *Dasypus* (Cingulata), 60% for *Proechimys* (Rodentia) and 64% for *Marmosa* (Didelphimorphia). While in the tests using multiplex PCR, 12 samples were positive for the *henM* gene for *Mycobacterium lepromatosis*, of the 13 genera evaluated only *Proechimys* and *Marmosa* showed presence for the bacillus. The frequent presence of man in the forest fragments where *M. leprae* or *Mycobacterium lepromatosis* positive wild animals were found increases the possibility of the risk of a zoonotic infection. Considering that the qPCR methodology by means of the 16S rRNA gene was effective to demonstrate the presence of viable *M. leprae* in wild animals.

**Keywords:** Molecular epidemiology; 16S rRNA and RLEP genes; *Mycobacterium leprae*; *Mycobacterium lepromatosis*; Zoonoses.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Breve histórico da hanseníase .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Epidemiologia .....</b>	<b>35</b>
2.2.1 A hanseníase no mundo .....	35
<b>2.2.2 A hanseníase no Brasil .....</b>	<b>36</b>
2.2.3 A hanseníase no Estado do Mato Grosso.....	36
<b>2.3 Agente etiológico da hanseníase .....</b>	<b>37</b>
<b>2.4 Aspectos microbiológicos e moleculares de <i>M. leprae</i> e <i>M. lepromatosis</i></b> .....	<b>37</b>
2.4.1 As Micobactérias .....	37
2.4.2 Microbiologia de <i>M. leprae</i> e <i>M. lepromatosis</i> .....	38
2.4.3 O genoma de <i>M. leprae</i> e <i>M. lepromatosis</i> .....	38
<b>2.5 Patogênese e formas clínicas da hanseníase .....</b>	<b>39</b>
<b>2.6 Diagnóstico clínico e laboratorial .....</b>	<b>41</b>
<b>2.7 Tratamento da hanseníase.....</b>	<b>43</b>
<b>2.8 Transmissão da hanseníase .....</b>	<b>44</b>
2.8.1 Pessoa a Pessoa .....	44
2.8.2 Casos autóctones e importados.....	44
2.8.3 Transmissão Zoonótica por animais silvestres .....	45
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>49</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
<b>4. 1 Objetivo Geral .....</b>	<b>50</b>
<b>4. 2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>50</b>
<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Desenho e área do Estudo .....</b>	<b>51</b>

<b>5.2 Obtenção dos animais silvestres .....</b>	<b>52</b>
5.2.1 Amostras de animais silvestres .....	52
5.2.2 Amostras de tatus silvestres ( <i>Dasyus novemcinctus</i> ) .....	53
<b>5.3 Sítio de coleta das amostras de biópsias dos animais silvestres .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4 Extração de RNA e DNA das amostras de animais silvestres.....</b>	<b>54</b>
<b>5.5 Tratamento das amostras de RNA .....</b>	<b>55</b>
<b>5.6 Transcrição reversa das amostras de RNA.....</b>	<b>56</b>
<b>5.7 Ensaio de viabilidade: Detecção de <i>M. leprae</i> por qPCR.....</b>	<b>57</b>
<b>5.8 PCR multiplex para detecção de <i>M. leprae</i> e <i>M. lepromatosis</i> .....</b>	<b>58</b>
<b>5.9 Método de Georreferenciamento.....</b>	<b>59</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
6.1 Animais silvestres: marsupiais e roedores .....	60
6.2 Detecção de <i>M. leprae</i> em amostras de animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia: enumeração e viabilidade molecular .....	60
6.3 Análise Geoespacial de animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia.....	65
6.4 Detecção de <i>M. leprae</i> em amostras de animais silvestres da espécie <i>Dasyus novemcinctus</i> : enumeração e viabilidade molecular .....	71
6.5 Localização espacial da área de coleta de tatu <i>Dasyus novemcinctus</i> no município de Marcelândia - Mato Grosso.....	72
6.6 Detecção de <i>M. lepromatosis</i> por PCR Multiplex .....	73
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que possui predileção pelas células de Schwann, macrófagos e nervos periféricos de indivíduos com predisposição genética para o desenvolvimento desta doença (1,2). *M. leprae* foi descrito em 1873 pelo médico norueguês Gerhard Hansen e foi a primeira bactéria a ser identificada e correlacionada a uma doença infecciosa (3).

O diagnóstico precoce da doença e o tratamento com a poliquimioterapia (PQT) são estratégias chave e definitivas de controle da hanseníase (4). A PQT foi introduzida em 1994 no Brasil, utilizando uma associação de três drogas para hanseníase multibacilar (MB): rifampicina, clofazimina e sulfona; e duas drogas para os paucibacilares (PB): rifampicina e sulfona (5).

A criação da classificação operacional foi determinante para o tratamento, dividindo as formas clínicas em paucibacilares (PB) nos casos com até cinco lesões cutâneas e em multibacilares (MB) com mais do que cinco lesões (6).

Além do diagnóstico precoce, é fundamental a regularidade na tomada mensal das drogas do esquema PQT para o êxito do tratamento da hanseníase, pois sua irregularidade predispõe ao desenvolvimento de incapacidades físicas e a ocorrência de recidivas, que quando adequadamente investigadas, podem decorrer da falha no tratamento, por reinfecção, persistência bacilar ou resistência às drogas (5).

Em 2017, as taxas de incidência de casos novos em todo o mundo foram de 2,77/100 mil habitantes, evidenciando a alta capacidade de dispersão e infectividade do bacilo, mesmo diante das medidas de combate protocoladas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (7).

No Brasil, as regiões que compõem a Amazônia e o entorno detêm os maiores números de casos da doença (8). Em 2016, a região Centro-Oeste apresentava 4.701 casos novos, sendo que 2.665 eram do Estado de Mato Grosso com 88,9/100 mil habitantes no índice geral de detecção para a hanseníase (9).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), a transmissão ocorre pelo contato estreito e prolongado entre um indivíduo susceptível e um paciente infectado por meio da inalação dos bacilos contidos na secreção nasal ou gotículas expelidas na fala, sendo a da mucosa nasal a principal via de transmissão (10).

Nas últimas décadas, estudos foram empreendidos para obter um melhor entendimento das vias de transmissão de *M. leprae* entre as comunidades afetadas

sem sucesso. Os estudos epidemiológicos identificaram um risco aumentado em indivíduos que vivem em contato próximo com pacientes com hanseníase. No entanto, em muitos casos novos não é possível identificar o caso índice na cadeia de transmissão (11).

Evidências de hanseníase zoonótica nos EUA e a descoberta do DNA do *M. leprae* no ambiente estão desafiando o paradigma tradicional de que o bacilo é transmitido apenas de humano para humano (11). Ocasionalmente desequilíbrios ecológicos desencadeiam o surgimento de doenças emergentes (12,13), assim como os causados pelo desmatamento e fragmentação das florestas tropicais no mundo (14).

Como *M. leprae* pode persistir e possivelmente proliferar no ambiente em associação com certas plantas e animais (15), é concebível que a infecção possa ser resultante da exposição prolongada ou repetida a uma fonte ambiental contendo bacilos viáveis. A investigação experimental nesses casos fica comprometida em virtude da impossibilidade do cultivo *in vitro* de *M. leprae*; portanto, as evidências são obtidas indiretamente por meio de estudos epidemiológicos e mais recentemente por métodos moleculares (16).

A sequência repetitiva RLEP foi descrita como enumerador molecular de *M. leprae* com base na amplificação por qPCR e apresentou resultados correlatos com a contagem microscópica, permitindo uma quantificação rápida e específica do bacilo em tecidos de camundongos e tatus (14).

Destaca-se que a contagem microscópica não fornece dados absolutos sobre a viabilidade do bacilo. No entanto, a contagem de Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR) e qPCR utilizando a sequência repetitiva RLEP gera informações de viabilidade apenas indiretamente, à medida que os números de bactérias aumentam ao longo do tempo em uma população em crescimento (17).

A impossibilidade na determinação da viabilidade do *M. leprae* a partir da detecção do DNA fez com que pesquisadores voltassem sua atenção para a molécula de RNA, por meio da transcrição reversa e posterior amplificação da molécula alvo 16S RNAr revelando alta sensibilidade na detecção de organismos viáveis, permitindo também a implementação de metodologias que inativam inibidores na detecção de RNA do *M. leprae* em amostras ambientais (18).

A presença de animais naturalmente infectados pelo *M. leprae* em áreas de alta endemicidade vem motivando a investigação sobre a existência de fatores ambientais

e zoonóticos envolvidos na dinâmica de transmissão da hanseníase (20, 29, 30, 31, 32-35).

Na região da Amazônia legal, por exemplo, é frequente e cultural o hábito de consumir carne de animais silvestres como fonte de proteína e tratamentos terapêuticos, e essa prática portanto, vem sendo considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças (26–28).

Deste modo, a detecção da infecção natural de animais selvagens naturalmente infectados por *M. leprae* viáveis pode promover uma melhor compreensão sobre a transmissão da hanseníase em áreas de alta endemicidade .

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Breve histórico da hanseníase**

A hanseníase, conhecida também pela designação de lepra, é uma das mais antigas doenças que acomete o homem e remonta as civilizações humanas mais antigas, no que se refere aos fluxos migratórios, atividades militares e comerciais de grande importância na história (19).

O conjunto de estudos históricos como a paleomicrobiologia e a epidemiologia molecular contribuíram para evidenciar a dispersão da hanseníase, demonstrando traços genéticos do bacilo de Hansen em esqueletos da antiga Índia (20) e da Europa medieval (21) datados antes mesmo do descobrimento do patógeno em 1873 na Noruega (22).

No Brasil os primeiros casos de hanseníase foram observados no Estado do Rio de Janeiro nos anos de 1600(23) (20). Mas somente por volta da década de 30, o governo adotou medidas para a prevenção e tratamento dos pacientes diagnosticados com a doença, por meio do isolamento em asilos-colônias (21).

Com a introdução das sulfonas, para o tratamento da hanseníase no final da década de 40, o controle da doença deixa de ser feito por meio do isolamento e da segregação do doente (24,25).

## 2.2 Epidemiologia

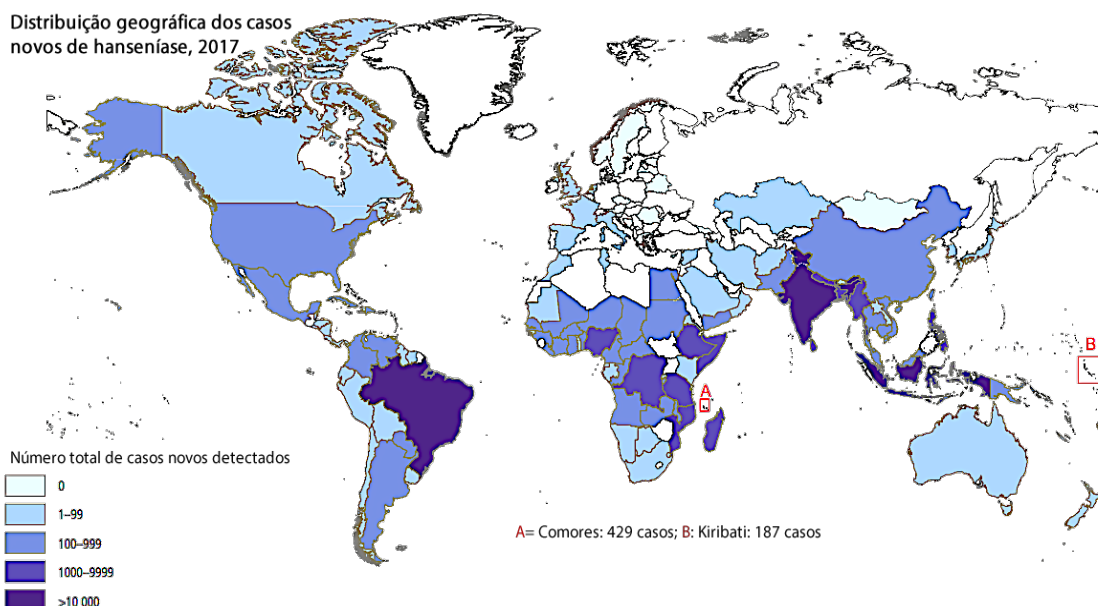
### 2.2.1 A hanseníase no mundo

Nas últimas três décadas, a OMS ampliou esforços integrando os países ao redor do mundo para combater a hanseníase, evoluindo progressivamente na detecção passiva de casos e na ampla disseminação do tratamento (26).

Os casos de hanseníase com incapacidade são determinados em: grau 0, quando a força muscular e a sensibilidade desses segmentos estão preservadas; grau 1, quando há diminuição da força muscular e/ou diminuição de sensibilidade; e grau 2, quando há deformidade visível nas mãos e/ou pés e/ou olhos (9,27,28).

Desde então, as estratégias globais se concentraram na redução da carga da doença com destaque para a sustentabilidade pela integração, visando assim, a diminuição do número de novos casos com grau de incapacidade 2, a promoção da detecção precoce e a redução nas taxas de transmissão, destacando os aspectos humanos e sociais que afetam o controle da doença (29).

Em 2017, 150 países relataram 210.671 casos novos de hanseníase, dos quais 95% correspondem a 22 países prioritários (Angola, Bangladesh, Brasil, Comores, Costa do Marfim, República Democrática do Congo, Egito, Etiópia, Micronésia, Índia, Indonésia, Kiribati, Madagascar, Moçambique, Mianmar, Nepal, Nigéria, Filipinas, Sudão do Sul, Sri Lanka, Sudão e Tanzânia), sendo a taxa de detecção de 2,77/100 mil habitantes. A Índia, o Brasil e a Indonésia são os três países que mantêm a maior incidência da doença, representando 81% dos pacientes recém-diagnosticados e notificados no mundo (Figura 01)(7).



**Figura 1.** Mapa mundial epidemiológico da distribuição de casos novos de hanseníase em 2017 (Organização Mundial da Saúde, 2018).

## 2.2.2 A hanseníase no Brasil

De acordo com a OPAS/OMS, entre 2011 e 2016, o número de casos novos da doença nas Américas diminuiu 26%, passando de 40 mil em 2007 para 25 mil em 2016 (30). Dos 35 países que compõe as Américas, o Brasil foi o único que não alcançou a meta global de redução da hanseníase como problema de saúde pública, mantendo-se na categoria de hiperendêmico e o segundo maior em número de casos registrados no mundo (7,30).

Em 2016 a taxa de detecção de casos novos de hanseníase no país foi de 12,2/100 mil habitantes. No período entre 2012 e 2016 as regiões Centro-Oeste e Norte exibiram as maiores taxas de detecção geral, sendo 37,27/100 mil e 34,26/100 mil habitantes, respectivamente (9).

## 2.2.3 A hanseníase no Estado do Mato Grosso

O Estado de Mato Grosso é considerado hiperendêmico, ocupando a primeira posição com as maiores taxas de prevalência e incidência da doença no país. De acordo com a Portaria nº 2556/ 11/ MS, 27 municípios do Mato Grosso foram priorizados para vigilância em hanseníase, como por exemplo, a região “Vale do Teles Pires” com sede em Sinop e Sorriso e o Norte Mato-grossense com sede em Colíder.

Em 2015, a taxa de detecção foi de 93,0/100 mil habitantes com registro de 3.037 casos novos da doença. (31).

No mesmo período de 2012 e 2016, também foi registrada a taxa média de 44,55/ 100 mil habitantes para os casos de incapacidade física com grau 2 que são as mais associadas a discriminação e estigmatização social (9).

### **2.3 Agente etiológico da hanseníase**

Descrito em 1873 pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen em amostras de tecido de pacientes, *M. leprae* foi o primeiro microrganismo associado a uma doença humana (3).

Recentemente, Han e colaboradores descreveram no México uma nova espécie denominada de *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*) causador da hanseníase e associada aos casos de 'Fenômeno de Lucio' que é uma reação cutânea necrosante grave e rara (32,33).

### **2.4 Aspectos microbiológicos e moleculares de *M. leprae* e *M. lepromatosis***

#### **2.4.1 As Micobactérias**

As micobactérias pertencem à ordem *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*. O gênero *Mycobacterium* inclui 198 espécies e 14 subespécies, incluindo micobactérias intracelulares não cultiváveis e também as ambientais presentes no solo e na água (34).

Destacamos as espécies agrupadas em complexos por similaridade genética e epidemiológica: o complexo *Mycobacterium avium* (35,36); o complexo *Mycobacterium abscessus* (37); complexo *M. tuberculosis* (38,39); e o complexo *M. leprae* sugerido por Scollard et al. (40).

### 2.4.2 Microbiologia de *M. leprae* e *M. lepromatosis*

*M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório que vive predominantemente em macrófagos, não formador de esporos, não produtor de toxinas e não possui plasmídeo. Apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas, medindo cerca de 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro (41,42).

Quando suspensões bacilares são depositadas em lâminas de vidro, estes encontram-se isolados ou em conjunto assemelhando-se a um maço de cigarros. Uma particularidade é sua incapacidade de multiplicação *in vitro*, sendo necessária para sua manutenção a inoculação de suspensão de bacilos em patas de camundongos e tatus (43).

Destacamos que *M. leprae* possui parede celular semelhante as outras micobactérias, com ácidos micólicos de alto peso molecular. A presença deste componente lipídico é o que confere a resistência álcool ácido observada na coloração de Ziehl Neelsen. Os micosídeos (glicolípídeos e peptidoglicolípídeos) presentes na membrana são responsáveis pela permeabilidade celular e estão relacionados com a resistência às enzimas solúveis em água, antimicrobianos e desinfetantes (44,45).

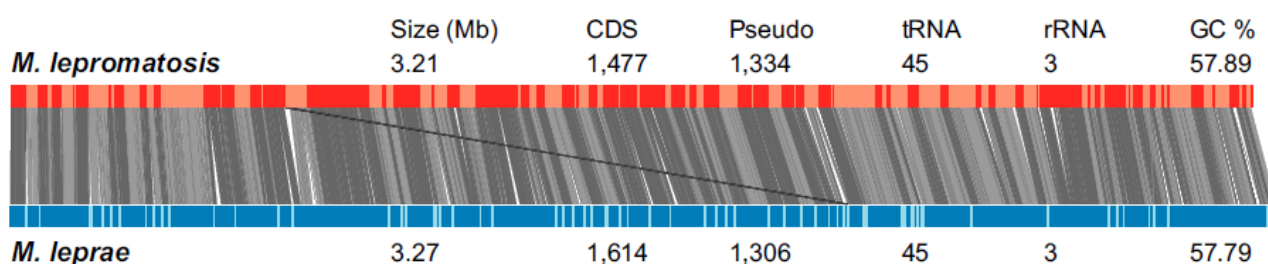
Tais propriedades microbiológicas são também atribuídas ao *M. lepromatosis*. Para tanto, a similaridade entre os dois microrganismos, tanto do ponto de vista microbiológico como clínico, levaram Singh e colaboradores a propor sua representação como "Complexo *M. leprae*", análogo às espécies que constituem o complexo *M. tuberculosis* (46).

### 2.4.3 O genoma de *M. leprae* e *M. lepromatosis*

Assumindo que o genoma de *M. leprae* foi topologicamente equivalente e semelhante em tamanho àqueles de todas as outras micobactérias (4,4 Mb) (47,48), uma extensa redução e rearranjo ocorreram durante sua evolução. A análise proteômica comparativa detectou apenas 391 tipos de proteínas solúveis, em comparação com as 1.800 de *M. tuberculosis*, indicando que os pseudogenes são translacionalmente inertes. Assim, o bacilo da hanseníase pode ter perdido mais de 2.000 genes (49–51).

A evolução reductiva do genoma de *M. leprae* ocasionou mudanças importantes, pois foram eliminados elementos de cadeia respiratória, anaeróbica, oxidativo, sistemas catabólicos e seus circuitos reguladores (52).

A redução genômica foi também observada no *M. lepromatosis* (Figura 02), por meio de recente estudo genômico, verificando-se uma estreita relação entre esses dois patógenos (117).



**Figura 2.** Sintenia genômica e principais características de *M. leprae* e *M. lepromatosis*. Os 126 contigs de *M. lepromatosis* distinguem-se com cores vermelhas e laranja. As listras azuis claras indicam as repetições dispersas em *M. leprae*. A linha preta indica uma variação estrutural confirmada entre *M. leprae* e *M. lepromatosis* (Singh *et al.* 2015).

A sequência completa do genoma de *M. leprae* é constituída por 3.268.203 pares de base (pb) com um conteúdo G+C de 57.8% e cerca de 1.604 genes codificantes. O genoma do *M. lepromatosis* possui 1477 genes codificantes para proteínas, 1334 pseudogenes e um conteúdo G+C de 57.89% (46).

Comparações funcionais sugerem que *M. lepromatosis* perdeu várias enzimas necessárias para a síntese de aminoácidos, enquanto *M. leprae* apresenta uma via *hemN* defeituosa. *M. leprae* tem um total de 199 kb de sequências (> 500 nucleotídeos) em seu genoma sem correspondência com *M. lepromatosis* (53).

## 2.5 Patogênese e formas clínicas da hanseníase

Em virtude do tempo lento de multiplicação (em média 16 dias), estudos demonstram um longo período de incubação do bacilo no hospedeiro, algo em torno de dois a sete anos até o surgimento dos sintomas (54,55).

Neste contexto, calcula-se que 95% dos indivíduos expostos aos bacilos são naturalmente resistentes à infecção. Nos 5% suscetíveis, a doença pode se manifestar de diferentes formas, dependendo de fatores relacionados ao indivíduo, tais como sexo, idade e susceptibilidade genética e/ ou a condições socioeconômicas e geográficas (9). No entanto, para essa pequena parcela da população considerada

suscetível geneticamente, a infecção pode evoluir para uma das formas clínicas sintomáticas (28).

A resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa, englobando as respostas celular e humoral. A resposta imune humoral é baseada na produção de anticorpos, sendo pouco eficiente na eliminação do bacilo, enquanto que, a resposta imune celular pode controlar a proliferação dessas micobactérias (45).

Tendo em vista os critérios clínicos, imunológicos e histológicos, os pesquisadores Ridley e Jopling em 1966 recomendaram uma classificação que define em cinco grupos distintos, constituídos por duas formas polares: a Tuberculóide-Tuberculóide (TT) e a Virchowiana-Virchowiana (VV), e três formas instáveis: a Dimorfa-Tuberculóide (DT), a Dimorfa-Dimorfa (DD) e a Dimorfa-Virchowiana (DV) (57).

A hanseníase nos indivíduos TT apresenta-se com poucas lesões de coloração castanha na pele, com perdas de sensibilidade, anidrose, queda de pêlos, bem localizadas e delimitadas, não ultrapassando 10 cm de diâmetro (57). As infiltrações são comuns aos pacientes com a forma VV, caracterizadas por pápulas, nódulos, tubérculos e placas dérmicas. Os danos causados aos nervos são graves e o exame histopatológico das lesões revelam a presença de grande quantidade de bacilos (37).

Os pacientes com a forma DT possuem as lesões maiores e em maior quantidade, podendo haver abscessos de nervo. Os DV possuem grande quantidade de lesões com simetria e tonalidade castanha, a contar com Índice Baciloscópico (IB) intensamente positivo (49).

Em 1982, um Comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação simplificada e operacional baseada na contagem do número de lesões na pele. Os pacientes foram agrupados em Paucibacilares (PB), sendo aqueles com baciloscopia negativa, com até 5 lesões cutâneas e sem acometimento de nervos periféricos e em Multibacilares (MB), pacientes com IB positivo, mais de 5 lesões ou acometimento de pelo menos um tronco nervoso (46).

## 2.6 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico clínico de um paciente com suspeita de hanseníase baseia-se em sinais dermatológicos e sintomas neurológicos (58). A principal característica da hanseníase são as lesões de pele, que em sua maioria, apresentam alterações de sensibilidade. Esta peculiaridade diferencia a hanseníase das lesões provocadas por outras doenças dermatológicas. As lesões podem ser decorrentes de processos inflamatórios dos nervos periféricos, ou seja, pela ação do bacilo nos nervos, devido a reação do organismo ao bacilo ou por ambas (58,59).

A pessoa afetada pela hanseníase pode apresentar um ou mais sinais e sintomas:

- A presença de manchas hipocrômicas, podendo ser esbranquiçadas, avermelhadas ou amarronzadas, em qualquer parte do corpo, com perda ou alteração de sensibilidade térmica e ao tato;
- Pele seca e com falta de suor, com queda de pelos, especialmente nas sobrancelhas;
- Espessamento dos nervos, dor e sensação de choque, fisgadas e agulhadas nos nervos dos braços e das pernas, inchaço de mãos e pés; diminuição da força dos músculos das mãos, pés e face;
- Nódulos no corpo, elevados ou não, de 1 a 3 cm de tamanho, úlceras em alguns casos avermelhadas e dolorosas, febre, dor nas articulações, constipação, sangramento, ferida e ressecamento do nariz, e ressecamento nos olhos.
- Alguns casos não apresentam lesões de pele, apenas comprometimento de nervos periféricos, ocasionando assim alterações de sensibilidade e força muscular.
- Infiltração: aumento da espessura e consistência da pele, com menor evidência dos sulcos, limites imprecisos, acompanhando-se, às vezes, de eritema

discreto. Resulta da presença na derme de infiltrado celular, às vezes com edema e vasodilatação.

O diagnóstico laboratorial pode ser apoiado por métodos laboratoriais, tais como a baciloscopia por meio do raspado intradérmico, o histopatológico, o PGL-I e as metodologias moleculares por meio da amplificação do DNA e do RNA.

Um método de avaliação da hanseníase pela determinação do Índice Baciloscópico (IB) foi proposto em 1962 por Ridley a partir da contagem de bacilos com escala logarítmica variando entre 0 a 6+. Esse exame de auxílio diagnóstico é realizado a partir do raspado intradérmico dos lóbulos das orelhas, cotovelos e em lesões aparentes (60).

A contagem dos bacilos presentes nestes raspados varia de 0 a 6+, com baciloscopia negativa (IB=0) nas formas tuberculóide e indeterminada, fortemente positiva na forma virchowiana, e com resultados variáveis na forma dimorfa (55).

O exame histopatológico de lesões de pele ou de nervos é um importante auxiliar no diagnóstico da hanseníase, permitindo também diferenciar as neuropatias. A característica do infiltrado inflamatório, assim como a presença de BAAR oferecem informações relevantes a partir dos achados clínicos dos pacientes avaliados (39).

Outra ferramenta utilizada no diagnóstico da hanseníase é a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM anti-glicolípido fenólico-1 (PGL-I), que é um antígeno específico do *M. leprae*. A titulação de IgM está associada com a forma clínica e com a atividade da doença. Na forma virchowiana, são descritos níveis elevados de anticorpos anti-PGL-I, os quais tendem a reduzir com o tratamento poliquimioterápico, enquanto que, na forma tuberculóide a produção destes anticorpos é inexistente (45).

Inúmeros testes moleculares para a detecção de *M. leprae* em amostras clínicas foram desenvolvidos nos últimos anos com a finalidade de melhorar a sua identificação mesmo na presença de um número pequeno de bactérias (61–63). Esses estudos envolveram desde sistemas mais simples até os mais específicos baseados na detecção de regiões gênicas que codificam para o antígeno de 36-kDa 31, de 18-kDa 32 ou de 65-kDa 33, assim como para outras sequências repetitivas 34 do *M. leprae* (64,65).

A partir de um painel de 227 amostras de pacientes com hanseníase da Venezuela, México, Mali e Brasil, uma PCR multiplex empregando os *primers* específicos da sequência repetitiva RLEP e *hemN* foi realizada, visando a

diferenciação das espécies *M. leprae* e *M. lepromatosis*, respectivamente. Em 221 casos foi detectado o DNA de *M. leprae* e em apenas seis casos o de *M. lepromatosis*, sem evidência de infecções mistas (46).

As metodologias para detecção do DNA do *M. leprae* apresenta importante limitação em virtude da sua inabilidade na distinção entre organismos viáveis e não-viáveis (123). Assim, métodos de detecção do RNA têm sido propostos como ferramenta promissora na discriminação de *M. leprae* viável e que possam contribuir para o correto prognóstico dos pacientes de hanseníase durante o tratamento, a suspeição de recidivas e sua diferenciação com as reações hansênicas (66,67).

Martinez et al. (2009) avaliaram biópsias de pacientes com hanseníase e cultura de células com *M. leprae* vivo, bem como a sua viabilidade num ensaio de qPCR pela detecção do gene rRNA 16S. Esse estudo contribuiu para um melhor entendimento sobre a estabilidade desses RNAs e mais particularmente da longevidade da mensagem do gene 16S rRNA. Um detalhe importante deste estudo foi a escolha da sequência repetitiva (RLEP) específica do *M. leprae* como enumerador molecular para uma rápida quantificação do número de bacilos na amostra (67).

A viabilidade do *M. leprae* avaliada em tecidos de animais nu/nu experimentalmente infectados e tratados com rifampicina e rifapentina se mostrou sensível e confiável para detectar bacilo viável em tecidos, sem a necessidade de isolamento bacteriano, tornando esta uma ferramenta importante a ser utilizada em amostras clínicas e em pesquisas de campo (17).

Recentemente para obter informações sobre a distribuição global de *M. lepromatosis*, um PCR multiplex foi implementado utilizando os *primers* específicos RLEP e *hemN* visando a diferenciação das espécies *M. leprae* e *M. lepromatosis*, respectivamente.

## **2.7 Tratamento da hanseníase**

A OMS instituiu em 1982 o uso da poliquimioterapia (PQT) no tratamento da hanseníase, como uma estratégia efetiva para controle da doença e que consiste na combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona (68). A rifampicina tem efeito bactericida impedindo a síntese de RNA, enquanto a dapsona atua como droga bacteriostática por inibir a síntese de DNA e proteínas. A clofazimina possui ação

bacteriostática e anti-inflamatória, embora seu mecanismo exato de atuação seja ainda desconhecido (69).

O Ministério da Saúde fornece os medicamentos em blísteres individuais, que contêm a dose mensal supervisionada e as doses diárias autoadministradas. Para os casos paucibacilares, o tratamento dura seis meses e para os multibacilares tem duração de doze meses. Podem ser administrados outros medicamentos para integrar o tratamento quando existe baixa eficiência contra o bacilo, como minociclina, oflaxacina (70).

## **2.8 Transmissão da hanseníase**

### **2.8.1 Pessoa a Pessoa**

Apesar do interesse empregado nas últimas décadas para identificar novos padrões de transmissão da hanseníase, a porta de entrada para o bacilo ainda permanece incerta, embora seja amplamente aceito que o bacilo tenha como porta de entrada o trato respiratório superior (5).

Pacientes multibacilares podem liberar milhões de bacilos por dia em suas secreções nasais. De fato, acredita-se que um paciente multibacilar possa apresentar cerca de 100 milhões de organismos vivos por dia em suas secreções nasais. Entretanto, a descarga nasal se torna bacteriologicamente negativa com a PQT, e esta observação tem grande importância no controle da endemia (71).

### **2.8.2 Casos autóctones e importados**

Nos Estados Unidos, a hanseníase ocorre especialmente em pessoas que migraram de países estrangeiros onde a doença é prevalente (72). Ao norte do Estado de Louisiana, onde não haviam casos de hanseníase autóctones, foram descritos seis casos novos entre 1982 e 1986, oriundos residentes rurais e sem exposição a contatos e viagens (73).

Além de Louisiana, foram descritos casos autóctones no Texas, na Geórgia e na Flórida, mas nenhum dos pacientes relataram exposição a comunicantes previamente infectados (74). Com base nessas informações, os estudiosos acreditam que a principal causa da hanseníase autóctone nos Estados Unidos é a migração

internacional. Em Orlando/ Flórida, por exemplo, em 2016 a população nascida no exterior era de 14,2% (408.137 imigrantes) (75).

Em 2016, alguns países não endêmicos como Alemanha (2 casos), Chile (1 caso), Emirados Árabes Unidos (40 casos), Japão (3 casos), Kuwait (6 casos), Qatar (36 casos), Holanda (5 casos), Portugal (4 casos) e o Reino Unido (5 casos) tiveram 100% de casos novos em pacientes estrangeiros (76).

Na Dinamarca, em 2015, foram diagnosticados 15 casos de hanseníase em pacientes predominantemente do sexo masculino e com média de idade de 28,6 anos sendo que 87% nasceram no sul e sudeste da Ásia, presumindo-se que a infecção ocorreu em seus países de origem (77).

Em estudo realizado em Madri (Espanha) avaliou 25 pacientes com hanseníase, que foram acompanhados dos quais 10 eram autóctones e 15 eram considerados alóctones. Quanto aos casos alóctones, a maioria foi diagnosticada em imigrantes latino-americanos (10/15) cuja a idade média foi de 42 anos. Não houve diferenças na distribuição por sexo e o tempo médio estimado desde a chegada na Espanha até a primeira consulta na unidade foi de 3 anos. Mais de 80% dos casos alóctones apresentavam doença multibacilar (78).

Devido ao longo período de incubação e com sintomas que ocorrem muito depois da imigração, os médicos em geral não conseguem fazer um diagnóstico preciso da doença. O amplo espectro de sintomas e de reações imunológicas complicam ainda mais o processo de diagnóstico levando ao atraso no início do tratamento e possibilitando o desenvolvimento de incapacidades motoras sérias (77,78).

### **2.8.3 Transmissão Zoonótica por animais silvestres**

Por décadas, os seres humanos são considerados os únicos reservatórios de *M. leprae*. A hanseníase em tatus selvagens da espécie *Dasypus novemcinctus* (*D. novemcinctus*), o chamado tatu de nove bandas, foi relatada pela primeira vez em 1975 (79), assim como foi descrita a transmissão natural entre tatus na parte sul dos Estados Unidos (80), sugerindo taxas de prevalência da doença nestes animais acima de 20% em alguns locais (72).

Nesse contexto de transmissão, um estudo realizado com 645 tatus em oito locais do sudeste dos Estados Unidos, identificaram 106 (16,4%) animais com

sorologia e PCR positivas para *M. leprae*. Foi também detectado o “SNP type 31” do bacilo em 35 tatus. Quando comparado com isolados de 52 pacientes da mesma região, 22 (42,3%) dos isolados estavam infectados com pelo menos uma das cepas de *M. leprae* associada aos tatus (81).

Um estudo realizado na Colômbia verificou que 9/ 22 tatus apresentaram PCR positiva para *M. leprae*. Destaca-se aqui que o consumo e o contato com o tatu *D. novemcinctus* são comuns, ignorando-se o fato deste animal ser um possível reservatório zoonótico do bacilo (82).

Em Curitiba, região sul do Brasil um estudo avaliou a frequência de consumo de carne de tatu entre pacientes com hanseníase e controles pareados por idade e gênero com outras dermatoses. Nenhuma associação entre o consumo de carne de tatu e o desenvolvimento de hanseníase foi observada. (83). No entanto em estudo recente, realizado em duas vilas do município de Belterra, região hiperendêmica no oeste do Estado do Pará, correlacionou-se o consumo da carne de tatu como fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase (84).

Inúmeros são os estudos envolvendo tatus selvagens infectados por *M. leprae*. Mesmo frente a avançadas técnicas de biologia molecular, testes sorológicos e histopatológicos, até o momento nenhum resultado permite a confirmação categórica de transmissão zoonótica (85,86). Sabendo-se da suscetibilidade natural do tatu e a sua eficiente propagação experimental do *M. leprae in vivo*, esse animal é visto como principal modelo de estudo da infecção e do desenvolvimento da hanseníase (87,88).

Além de tatus, em 2016 foi relatada a existência de esquilos-vermelhos (*Sciurus vulgaris*) com lesões características de hanseníase. Os testes sorológicos, histopatológicos e genômicos confirmaram a presença de *M. lepromatosis* nos esquilos da Inglaterra, Irlanda e Escócia e de *M. leprae* em esquilos da ilha de Brownsea, Inglaterra, sendo esses roedores considerados um reservatório ambiental da doença (89).

É possível obter também informações que sugerem a presença de *M. leprae* em solo contaminado (90,91), em água de poços (92), em plantas (93), assim, como o relato da infecção pelo bacilo em diferentes espécies animais, como em primatas, incluindo chimpanzés e outros macacos em cativeiros (94,95) e em ratos selvagens (96,97).

Nesse contexto, fica evidente a necessidade de um melhor entendimento do papel dos animais silvestres na epidemiologia das doenças infecciosas e nos

mecanismos de transmissão para o homem. O ambiente está em constante fluxo entre os patógenos, os seres humanos, os animais domésticos e animais selvagens, e esta troca é de natureza dinâmica e está em constante evolução (98).

Importante aqui salientar que a inserção humana em áreas florestais tem levado à fragmentação das florestas, destruindo habitats e aumentando sua exposição a infecções zoonóticas (99) por meio de interações com reservatórios, a exemplo disso temos: a leishmaniose (100), a malária (101) a dengue (102), e com espécies silvestres, resultantes do contato direto e do consumo de carne de caça (103–105).

Esse é um aspecto relativamente novo no estudo da ecologia de infecções zoonóticas, que aponta o aparecimento de doenças em áreas afetadas pela fragmentação florestal por meio do aumento da densidade e do contato entre os indivíduos dentro dessas áreas (106).

Destacamos que a matriz de pastagem, ou a lavoura tornam-se os limitadores dos fragmentos florestais, que são assim aumentados pela pressão urbana (107,108), aos quais poucas espécies ultrapassam-no como, por exemplo, alguns grupos de roedores, marsupiais e cingulatas, que acabam por entrar em contato com o homem, seja indiretamente, ou pela ação da caça (109).

Brevemente destacamos alguns dos aspectos e características mais importantes das ordens cingulata, didelphimorphia e rodentia. A Ordem Cingulata inclui 20 espécies de tatus, os quais estão presentes em toda a América, desde o sudeste dos Estados Unidos até o norte da Argentina e sul do Brasil. A origem dos tatus supostamente vem da América do Sul, onde a maioria das espécies são encontradas, e *D. novemcinctus* é a única espécie encontrada no sudeste dos Estados Unidos (110).

As características fisiomorfológicas descritas a quase todas espécies de tatus são: armadura óssea que cobre cabeça, corpo e cauda. A dieta pode ser considerada onívora, pois baseia-se principalmente em insetos, frutos, e plantas, e em alguns casos em pequenos vertebrados (111).

Os tatus da espécie *D. novemcinctus* podem ser encontrados em campos abertos, florestas contínuas e fragmentos de matas. Estes animais são terrestres e vivem em tocas que podem medir de 3,5 metros de profundidade a 7,5 metros de comprimento (110,111).

Os animais da Ordem Didelphimorphia são um grupo de mamíferos com distribuição abrangente nas Américas, com provável origem na América do Sul. Atualmente, a família Didelphidae conta com mais de 95 espécies distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina, sendo este grupo com maior dispersão (112).

Os didelfídeos podem ser considerados sinantrópicos, dada sua interação com ambientes antropizados, pois, são animais que possuem alta resiliência às mudanças causadas pelo homem nas paisagens, como por exemplo a fragmentação de florestas. No meio urbano, podem ser encontrados em troncos de árvores, galpões e nos forros dos telhados de casas. Por serem animais generalistas, obtêm fontes proteicas nos restos de lixo (113,114).

No Brasil os didelfídeos são conhecidos como gambás e cuícas, sendo encontrados nos extratos terrestres, semiaquáticos, e arborícolas (115). As doenças parasitárias mais comuns aos didelfídeos são causadas por protozoários. Dentre os mais conhecidos são os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Além desses patógenos, podem também ser reservatórios de espécies do gênero *Babesia*, *Physaloptera*, *Capillaria*, *Gnathostoma*, *Acantocephala* e *Paragonimus* (116).

Há cerca de 4.000 espécies de mamíferos, dos quais, 1.500 pertencem à Ordem Rodentia. No Brasil, são listados 71 gêneros e 235 espécies de roedores de ocorrência em todo o território nacional (112). Devido à diversidade de espécies, os roedores podem ser encontrados em todos os extratos verticais nas florestas, com uma ampla distribuição pelos biomas. Muitas espécies de roedores são especializados em determinados ambientes, como áreas de rios, lagos e pântanos, ou extremos como as regiões áridas do nordeste (112).

O crescimento populacional dos roedores vem ocasionando um problema de saúde pública, por serem reservatórios de várias doenças (117). No Brasil, os casos de hantavirose (118,119) e leptospirose (120) são as doenças recorrentes causadas por roedores sinantrópicos, sendo necessárias medidas de controle desses animais (126).

### 3. JUSTIFICATIVA

Existem muitos questionamentos sobre o que ocorre quanto à transmissão de doenças e parasitas em áreas de interface entre humanos e animais silvestres. A epidemiologia e as relações entre o ambiente, hospedeiros, vetores e parasitas podem ser extremamente complexas. A presença humana está se intensificando em praticamente todos os ambientes, e a urbanização pode alterar a biologia de hospedeiros, vetores e patógenos.

Alguns podem pensar em aves invadindo uma granja de produção, outros em peões e rebanhos em suas rotas anuais pelo Pantanal, e alguns imaginam cenários tais como propriedades rurais no entorno de fragmentos da Mata Atlântica, ou vilas de ribeirinhos que vivem de caça e pesca na Amazônia, mas que também criam animais domésticos para complementar sua dieta. Todas as visões estão corretas e representam a interface, porém muitas facetas permeiam tais paisagens. Questões culturais, econômicas, ecológicas, conservacionistas e de saúde estão envolvidas, desde que humanos e seus animais domésticos começaram a fazer parte da paisagem do planeta (121,122).

*M. leprae* é considerado um patógeno humano obrigatório, com sua rota primária de transmissão sendo inter-humana. Evidências de transmissão zoonótica para humanos ganharam força a partir da identificação do tatu *D. novemcinctus* como um reservatório natural do bacilo no sul dos Estados Unidos (123). Recentes evidências de surto de infecção por *M. lepromatosis* em esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) relatado no Reino Unido (124) reforçam a necessidade de investigação da existência de hospedeiros não humanos ou reservatórios naturais desse bacilo.

Atualmente nos deparamos com muitas informações sobre a possibilidade de transmissão zoonótica de *M. leprae* e *M. lepromatosis*, com esse estudo buscou-se a presença de bacilo viável em outros reservatórios animais em potencial.

Esperamos com esses resultados uma compreensão mais apurada da distribuição desses patógenos em animais silvestres que habitam áreas de alta endemicidade da hanseníase.

## 4. OBJETIVOS

### 4. 1 Objetivo Geral

- Investigar a infecção natural de animais silvestres (Ordens Cingulata, Dilephimorphia e Rodentia) com *M. leprae* e *M. lepromatosis* e a possível ligação com a doença humana em uma área de hanseníase hiperendêmica na Amazônia meridional.

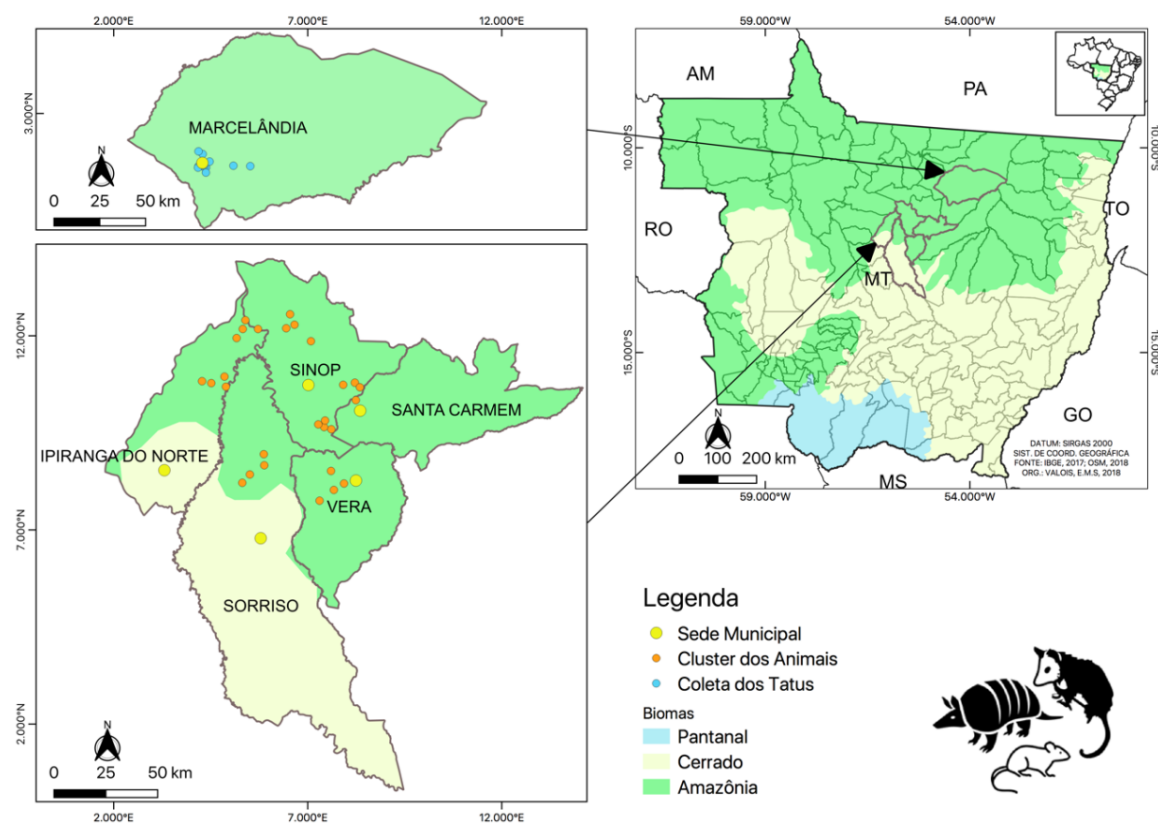
### 4. 2 Objetivos Específicos

- Realizar a detecção molecular de *M. leprae* por meio da sequência repetitiva RLEP (enumerador molecular) pela técnica de qPCR.
- Investigar infecção natural de *M. lepromatosis* em animais silvestres por PCR multiplex utilizando *primers* específicos *hemN* e *RLEP* (*M. leprae*) para diferenciação das espécies.
- Demonstrar a viabilidade de *M. leprae* a partir da análise do gene 16S RNAr pela técnica de qPCR em animais silvestres.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Desenho e área do Estudo

Trata-se de um estudo ecológico descritivo com amostras de animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia capturados em fragmentos florestais e matriz de pastagens na região Centro-Norte do Estado de Mato Grosso, entre a fronteira rural e o perímetro urbano dos municípios de Santa Carmem (Cluster B), Sinop (Clusters B, C e G), Sorriso (Cluster I), Ipiranga do Norte (Cluster F e J) e Vera (Cluster H). A ordem Cingulata é representada por tatus *Dasybus novemcinctus* que foram capturados em área urbana e rural do município de Marcelândia (Figura 03).



**Figura 3.** Mapa de localização da área de estudo, sedes municipais, área dos *clusters* de captura dos roedores e marsupiais, área de captura dos tatus *Dasybus novemcinctus* e Biomas no Estado de Mato Grosso, Centro-Oeste, Brasil.

O Estado do Mato Grosso está localizado na região Centro-Oeste do Brasil e é o terceiro maior do país, com área total de 903.378 km<sup>2</sup>, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (125). Está localizado entre as

coordenadas 9° 27' 28" e 17° 50' 04" S e 50° 30' 22" e 61° 27' 34" W. Dados de 2012 apresentam três biomas em sua área: o Pantanal (10% da área), Cerrado (40%) e Amazônia (50%).

Pela classificação de Köppen (126), o Estado de Mato Grosso apresenta dois tipos climáticos: Am (clima tropical úmido ou sub-úmido) localizado no norte; e Aw (clima tropical com inverno seco) localizado na região central do estado e no sul mato-grossense (127).

A temperatura média anual varia de 23°C a 32°C, sendo os meses de setembro a março os mais quentes. Possuem duas estações definidas sendo, “seca” entre maio e agosto com precipitação abaixo de 60 mm, e “chuvosa” de setembro a abril com precipitações médias de 2200 mm. A precipitação total de chuvas no ano entre os meses de outubro a abril é de 86%, e nos meses restantes a ocorrência é menos frequente (128). As condições climáticas da região dos municípios de estudo são tipicamente tropicais estando situados em zona de transição entre Cerrado e Amazônia.

## 5.2 Obtenção dos animais silvestres

As amostras de animais silvestres da Ordem Didelphimorphia e da Ordem Rodentia foram obtidas por meio da colaboração com a Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e a University of East Anglia – Reino Unido (UEA), como parte do projeto internacional **“Alterações no uso da terra: emergência de doenças infecciosas e parasitárias na Amazônia”** (em inglês: *Land use change: emerging infectious and parasitic diseases in Amazon*), fomentado pelo edital “Global Innovation Initiative (Início: 01/2015 Término: 11/2016)”.

A homologação para obtenção das amostras animais foi expedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO de acordo com a Instrução Normativa ICMBio, Nº: 7270-14 (Anexo 01), e também aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal - CEPA da Universidade Federal de Mato Grosso (Anexo 02).

### 5.2.1 Amostras de animais silvestres

No período de 2015 a 2016 foram coletadas 300 amostras de orelha, baço e fígado de 176 animais silvestres, dos quais 88 são da Ordem Rodentia e outros 88 da

Ordem Didelphimorphia. Informações sobre os animais silvestres podem ser encontradas na Tabela 01.

**Tabela 1.** Informação dos animais silvestres capturados e organizados em nível de Ordem e Gênero segundo os dados de estrato vertical, dieta, biomas e tipo de amostras coletadas.

Taxa	Estrato Vertical	*Dieta	**Biomas	Tipos de Amostras		
				Orelha	Baço	Fígado
<b>RODENTIA</b>						
<i>Calomys</i>	Sem dados	Sem dados	Sem dados	12	6	5
<i>Hylaeamys</i>	Terrestre	Fr/Gr	Am, Ma, Ce, Pt	2	0	2
<i>Neacomys</i>	Terrestre	Sem dados	Am, Ce	1	0	0
<i>Necomys</i>	Terrestre	Fr/On	Am, Ma, Ce, Ca, Pt, Pp	2	2	1
<i>Oecomys</i>	Arbóreo	Fr/Se	Am, Ce,Pt	8	2	2
<i>Proechimys</i>	Terrestre	Fr/Gr	Sem dados	58	27	18
<i>Rhipidomys</i>	Arbóreo	In/On	Am, Ma, Ce, Ca, Pt, Pp	5	3	3
<b>DIDELPHIMORPHIA</b>						
<i>Caluromys</i>	Arbóreo	Fr/On	Am, Ma, Ce, Pt	3	2	3
<i>Didelphis</i>	Escansorial	Fr/On	Am	8	2	2
<i>Marmosa</i>	Escansorial	In/On	Am, Ma, Ce, Pt	51	19	13
<i>Marmosops</i>	Escansorial	In/On	Am	13	1	2
<i>Metachirus</i>	Terrestre	In/On	Am, Ma, Ce, Pt	4	1	1
<i>Monodelphis</i>	Terrestre	In/On	Ce	9	4	3
<b>Total</b>				<b>(176)</b>	<b>(69)</b>	<b>(55)</b>
*Dieta: Frutívoro (Fr), Granívoro (Gr), Insetívoro (In), Onívoro (On), e Sementívoro (Se).						
**Biomas: Amazônia (Am), Caatinga (Ca), Cerrado (Ce), Mata Atlântica (Ma), Pantanal (Pt) e Pampas (Pp).						

## 5.2.2 Amostras de tatus silvestres (*Dasypus novemcinctus*)

Nos anos 2016 e 2017 foram recebidas amostras de 11 tatus do gênero *Dasypus novemcinctus* capturados na área rural e urbana do município de Marcelândia - Mato Grosso. As amostras foram obtidas de animais caçados para comercialização conjunta com produtos silvestres coletados da floresta de forma a complementar a renda familiar de moradores locais. Após a retirada das amostras, os animais foram devolvidos aos caçadores.

### 5.3 Sítio de coleta das amostras de biópsias dos animais silvestres

Dos animais silvestres foram coletados fragmentos de orelha, fígado e baço que foram armazenados em microtubos de 1,5 mL com 600 µL de solução estabilizadora de RNA (RNAlater Ambion®) e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Lauro de Souza Lima. As amostras foram estocadas a -20°C até o momento do seu processamento.

### 5.4 Extração de RNA e DNA das amostras de animais silvestres

O RNA de biópsias de animais silvestres foi extraído e purificado utilizando o *FastRNA Pro™ Blue kit* (116025050) – MP Biomedicals e o equipamento FastPrep 24 (MP-Biomedicals), segundo recomendado pela Quiagen.

Após a completa retirada da solução estabilizadora de RNA (RNAlater Ambion®), as biópsias foram congeladas e maceradas em nitrogênio líquido em uma base de aço inox (técnica de “*snapfreeze*”).

Cada biópsia macerada foi imediatamente colocada em um *FastPrep* Lysing Matrix tubes com 1 mL de *RNApro™ Solution* (incluso no kit) e em seguida homogeneizada no equipamento FastPrep 24 (MP-Biomedicals) por 40 segundos numa velocidade de 6,5m/s por duas vezes para romper a parede celular.

Os tubos foram retirados do equipamento e colocados em centrífuga por 15 minutos em uma velocidade de 13.200 rpm a 4°C. Após a centrifugação aproximadamente 700 µL de sobrenadante foi retirado e colocado em novo microtubo.

O material que ficou no *FastPrep* Lysing Matrix tubes foi guardado para posterior extração de DNA. Um volume de 600 µL de clorofórmio gelado foi adicionado em cada microtubo contendo amostras, misturado gentilmente por inversão e mantido em repouso por 1 minuto. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 15 minutos e a 4°C.

O sobrenadante (~200 µL) de cada amostra foi retirado e colocado em um novo microtubo. Foi adicionado então um volume de 600 µL de isopropanol e novamente misturado por inversão. Em seguida as amostras foram colocadas no freezer -20°C *overnight*.

No dia seguinte, os microtubos com as amostras foram centrifugados por 30 minutos a 13.200 rpm em 4°C. Todo o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de

RNA foram lavados em 600  $\mu\text{L}$  de etanol e em seguida centrifugados por 15 minutos em uma velocidade de 13.200 rpm a 4°C .

Todo volume de etanol foi descartado e os *pellets* de RNA foram eluídos em água DPEC Rnase/ Dnase/ free (Ambion®) e congelados em freezer -80°C.

O DNA de *M. leprae* foi então purificado a partir fase aquosa e da interfase (~500  $\mu\text{L}$ ) que permaneceu nos tubos *lysing matrix* FastPrep® ProBlue (MP-Biomedicals).

A extração do DNA foi realizada pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA 10mM (pH 8,0) e 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1) em cada microtubo com amostra e homogeneizados por duas vezes no instrumento PQ FastPrep 24. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.200 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante (~300  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra foi transferido para outro microtubo e precipitado com 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 30  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 0,3M e centrifugado novamente a 13.200 rpm por 10 minutos.

Em seguida todo sobrenadante foi descartado e o “pellet” de DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado de 10 minutos. Após a centrifugação o Etanol foi retirado e o *pellet* de DNA foi mantido em temperatura ambiente para secagem. Os *pellets* de DNA foram eluídos em um volume de água DPEC que variou de 40 a 150  $\mu\text{L}$  e armazenados a -20°C até o uso.

## 5.5 Tratamento das amostras de RNA

As amostras foram quantificadas em Nanodrop® (Thermo Scientific), observando-se a concentração do RNA obtido e sua qualidade por meio da relações da pureza. Após a quantificação, as amostras foram diluídas na concentração de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA em volume final de 40  $\mu\text{L}$  .

Em cada um dos tubos de amostra com 40  $\mu\text{L}$ , foi acrescentada uma mistura de 10  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}$  Buffer DNASE, 3  $\mu\text{L}$  DNASE® turbo, 2  $\mu\text{L}$  água DPEC®, perfazendo um volume total de 50  $\mu\text{L}$ .

Em seguida as amostras foram colocadas em um termociclador a 37° C por 1 hora. Após esse tempo, as amostras foram mantidas em gelo para resfriar e a elas foram acrescentados 6  $\mu\text{L}$  de inativador de DNASE turbo® em cada microtubo, que foram em seguida agitados e mantidos por 2 minutos em estante em temperatura ambiente.

Após esse tempo, o sobrenadante (~35  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para novo microtubo, tomando o extremo cuidado para não tocar no inativador que fica no fundo. As amostras foram guardadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.6 Transcrição reversa das amostras de RNA

Foram transcritos 2000 ng de RNA para cada amostra. Para cada amostra havia um microtubo transcrito (RT) e um outro não transcrito (NRT).

Aos microtubos com as amostras em duplicatas e previamente marcados foram acrescentados 11  $\mu\text{L}$  de RNA tratado, 1  $\mu\text{L}$  de *Random Primer* e 1  $\mu\text{L}$  de DNTP. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, e ao término foram mantidas em gelo para resfriar.

Em cada microtubo RT foram adicionados 7  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 4  $\mu\text{L}$  de Buffer 5x, 1  $\mu\text{L}$  de DTT, 1  $\mu\text{L}$  de Água DPEC, e 1  $\mu\text{L}$  de Superscript III e 4  $\mu\text{L}$  de Buffer 5x, 1  $\mu\text{L}$  de DTT, 2  $\mu\text{L}$  de Água DPEC para cada microtubo NRT. Todos os tubos foram homogeneizados delicadamente e mantidos por 5 minutos em temperatura ambiente.

Os microtubos RT e NRT foram incubados em termociclador a  $50^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos de inativação da reação com aumento da temperatura para  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após resfriar em gelo, foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de água DPEC em cada microtubo. Após a transcrição, as amostras foram novamente quantificadas e diluídas para uma concentração de 25ng/  $\mu\text{L}$  e em seguida estocados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

### 5.7 Ensaio de viabilidade: Detecção de *M. leprae* por qPCR

Os níveis de 16S RNAr de *M. leprae* foram determinados usando *primers* e sondas do gene 16S RNAr específico para *M. leprae* utilizando os ensaios *TaqMan* (Quadro 01), a partir de uma mix com volume total de 25 µL para cada amostra contendo solução 2X de *TaqMan* master mix, 500 nM de cada primer e 100 nM da sonda. O volume de cDNA para cada amostra variou de 2 a 10 µL.

**Quadro 01.** *Primers* e Sondas do gene 16S RNAr específico para *M. leprae* utilizados nos ensaios *TaqMan*.

Alvo	Descrição	Primer	Sequência de Primers
RNAr 16S	RNAr 16S	MLRNAr16S - F	5'-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC - 3'
		MLRNAr16S - R	5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT - 3'
		MLRNAr16S probe	5'-CAT CCT GCA CCG CA - 3'

Fonte: Martinez *et al* (2009).

A sequência repetitiva *RLEP* baseado em DNA foi o enumerador bacteriano utilizado como normalizador dos níveis de 16S RNAr (Quadro 02). Para este ensaio foram utilizados volumes de DNA que variaram de 2 a 10 µL, adicionados a uma mistura de 25 µL para cada amostra, contendo 2X *TaqMan* master mix, 200 nM de cada primer e 100 nM da sonda.

As reações de qPCR, para os genes 16S RNAr e *RLEP* foram submetidas a uma ciclagem de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto utilizando equipamento StepOnePlus™ (*Real Time PCR Systems – Life Technologies*). Todas as análises foram realizadas em triplicata, controle negativo (mix sem DNA e cDNA) e positivo (DNA e cDNA da cepas referencia Thai-53).

**Quadro 02.** *Primers* e Sondas da sequência repetitiva *RLEP* específica para o *M. leprae* utilizados nos ensaios *TaqMan*.

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

Fonte: Martinez *et al* (2009).

### 5.8 PCR multiplex para detecção de *M. leprae* e *M. lepromatosis*

Para esta análise foram utilizados o sistema de primers *LPM244* que amplifica um fragmento de 244 pb do gene *hemN* de *M. lepromatosis* que foi perdido pelo *M. leprae*, e os primers *RLEP 7* e *RLEP 8* que amplificam um fragmento de 450 pb da sequência repetitiva *RLEP* de *M. leprae* (Quadro 03).

**Quadro 03.** Sequência de *Primers* específicas utilizadas nos ensaios para detecção da presença de *M. leprae* e *M. lepromatosis*.

Alvo	Primer	Sequência de Primers
<i>M. lepromatosis</i>	LPM244 - F	5'- GTT CCT CCA CCG ACA AAC AC – 3'
	LPM244 - R	5'- TTC GTG AGG TAC CGG TGA AA – 3'
<i>M. leprae</i>	RLEP - 7	5'- TGA GGC TTC GTG TGC TTT GC – 3'
	RLEP - 8	5'- ATC TGC GCT AGA AGG TTG CC – 3'

Fonte: Singh *et al* (2015).

As reações de PCR foram realizadas para um volume de 25 µL por reação contendo 2,5 µL de Buffer 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µL de DNTP, 1,5 µL para cada primer (2 µM), 2 µL de Betaína (Opcional), 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 5,5 µL de água destilada estéril. A cepa Thai-53 foi utilizada como controle positivo e como controle negativo uma alíquota da reação sem DNA.

As reações de PCR, para os genes *hemN* e *RLEP* foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 40 segundos de hibridização a 58°C e extensão de 30 segundos a 72°C, seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos amplificados foram analisados por meio da análise em eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris/ Ácido Bórico/ EDTA) 0,5% a 140 V por 3 horas. A visualização dos produtos foi feita por meio do corante *GelRed* (*GelRed Nucleic Acid Gel Stain*, 10.000X /Uniscience do Brasil) em um transiluminador UV.

## 5.9 Método de Georreferenciamento

As coordenadas dos pontos amostrais em graus decimais foram importadas ao ArcGIS 10.5 - ESRI utilizando para isso o Datum SIRGAS 2000 no Sistema de Coordenadas Geográficas SIRGAS 2000.

O *Shapefile* com o limite dos municípios de Mato Grosso adquirido no site do IBGE foi importado ao mesmo software utilizando-se o mesmo sistema de coordenadas dos pontos amostrais.

Os mapas de calor para as variáveis *RLEP* e 16S foram gerados no ArcGIS utilizando-se o interpolador de *Kernel* com raio adaptativo e saída de valores em densidade.

Os mapas de distribuição das variáveis *RLEP* e 16S para as diferentes amostras foram gerados por meio da classificação da quantidade pelo método da graduação de símbolos e salvos no formato TIFF com 300 dpi de resolução.

## 6. RESULTADOS

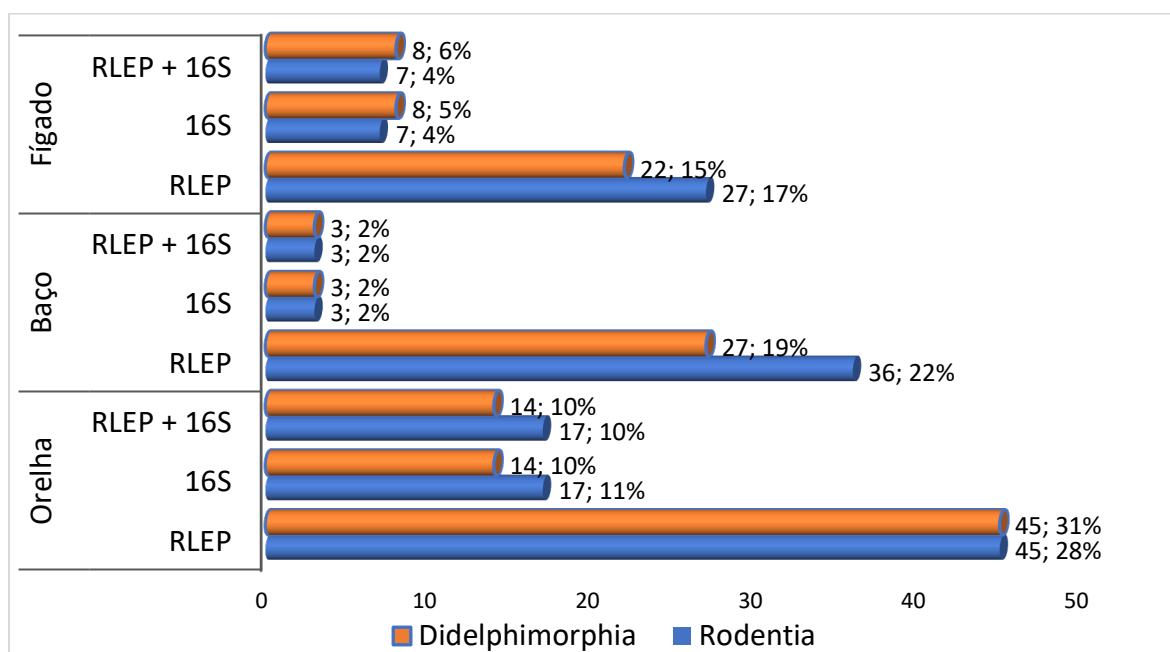
### 6.1 Animais silvestres: marsupiais e roedores

Partindo de um total de 300 amostras obtidas de marsupiais e roedores, um total de 227 amostras foram recuperadas, distribuídas em 108 orelhas (47,58%), 66 baços (29,07%) e 53 fígados (23,35%) foram submetidas a extração de RNA e DNA. Durante a etapa de extração de RNA foram perdidas 68 amostras de orelhas (38,6%), três de baço (4,34%) e dois de fígado (3,63%). A perda expressiva de 73 amostras de orelhas se deve ao fato de serem peças muito pequenas.

### 6.2 Detecção de *M. leprae* em amostras de animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia: enumeração e viabilidade molecular

Das amostras positivas de animais silvestres submetidas à qPCR para detecção de *M. leprae* por enumeração e viabilidade molecular foram observadas segundo as Ordens com 101 amostras positivas (44,5%) da ordem Didelphimorphia (marsupiais) e 126 (55,5%) positivas da ordem Rodentia (roedores).

Na figura 04 observam-se as duas ordens distribuídas por tipo de amostra e positividade para os marcadores *RLEP* (enumerador bacilar), 16S RNAr (viabilidade bacilar) e a combinação de ambos *RLEP*+16S RNAr.



**Figura 4.** Detecção molecular de *M. leprae* para sequência repetitiva *RLEP* (enumerador bacilar), 16S RNAr (viabilidade) e *RLEP*+16SRNAr em amostras de orelha, fígado e baço oriundas de animais silvestres das Ordens Didelphimorphia e Rodentia.

Nas amostras de orelha, baço e fígado, a faixa de detecção do gene 16S RNAr variou entre os Ciclos de *Threshold* ( $C_T$ ) 28 a 37, 32 a 36 e 33 a 37, respectivamente. A detecção da sequência repetitiva *RLEP*, os  $C_T$  variaram de 6 a 39, 29 a 38 e 27 a 37 para orelha, baço e fígado, respectivamente. Foram consideradas amostras positivas apenas aquelas com  $C_t$  abaixo de 37.

No painel de amostras avaliado, a Ordem Didelphimorphia foi representada por seis gêneros de marsupiais conforme a Tabela 02.

O maior número de ampliações positivas para *RLEP* ocorreram em orelhas dos gêneros *Marmosa* com 60,47% e *Monodelphis* com 13,95%. Nas amostras de fígado e baço, o gênero *Marmosa* apresentou uma positividade de 52,17% e 64,00% respectivamente. Nos ensaios de viabilidade do gene 16S RNAr, as amostras de orelhas do gênero *Marmosa* foi de 66,67% e pela combinação de ambos marcadores (*RLEP*+16S RNAr) foi observado 63,64% de positividade.

**Tabela 2.** Frequência da positividade de *M. leprae* em amostras de animais silvestres por gênero e tipo de amostras da Ordem Didelphidae

	qPCR	<i>Caluromys</i> (%)	<i>Didelphis</i> (%)	<i>Marmosa</i> (%)	<i>Marmosopis</i> (%)	<i>Metachirus</i> (%)	<i>Monodelphys</i> (%)
ORELHA	RLEP	1 (8,33%)	4 (33,33%)	<b>26 (34,66%)*</b>	<b>4 (36,36%)*</b>	2 (28,57%)	<b>6 (35,29%)*</b>
	16S	1 (8,33%)	1 (8,33%)	<b>8 (10,66%)*</b>	1 (9,09%)	0 (0,00%)	1 (5,88%)
	RLEP+16S	1 (8,33%)	1 (8,33%)	<b>7 (9,33%)*</b>	1 (9,09%)	0 (0,00%)	1(5,88%)
FÍGADO	RLEP	3(25,00%)	2(16,66%)	12 (16,00%)	2(18,18%)	2(28,57%)	2(11,76%)
	16S	1(8,33%)	1(8,33%)	2(2,66%)	1(9,09%)	1(14,28%)	1(5,88%)
	RLEP+16S	1(8,33%)	1(8,33%)	2(2,66%)	1(9,09%)	1(14,28%)	1(5,88%)
BAÇO	RLEP	2(16,66%)	2(16,66%)	<b>16(21,33%)*</b>	1(9,09%)	1(14,28%)	3(17,64%)
	16S	1(8,33%)	0(0,00%)	1(1,33%)	0(0,00%)	0(0,00%)	1(5,88%)
	RLEP+16S	1(8,33%)	0(0,00%)	1(1,33%)	0(0,00%)	0(0,00%)	1(5,88%)

\*Em negrito são observadas as amostras com maior positividade nas análises de detecção de *M. leprae* por qPCR

Na Tabela 03, a representatividade da Ordem Rodentia foi observada pela presença de sete gêneros. A detecção de *M. leprae* pela sequência repetitiva *RLEP* em amostras de orelhas apresentou maior positividade nos animais do gênero *Proechimys* (53,85%) e *Calomys* (28,21%). No ensaio de viabilidade para o gene 16S RNAr, os gêneros *Proechimys* e *Calomys* foram também os mais positivos com 63,16% e 21,05% respectivamente.

Na detecção combinada de *RLEP*+16S RNAr, a positividade foi 30% para *Calomys* e 60% para *Proechimys*. Nas amostras de fígado e baço, os animais do gênero *Proechimys* foram os mais positivos tanto para *RLEP* como para 16S RNAr.

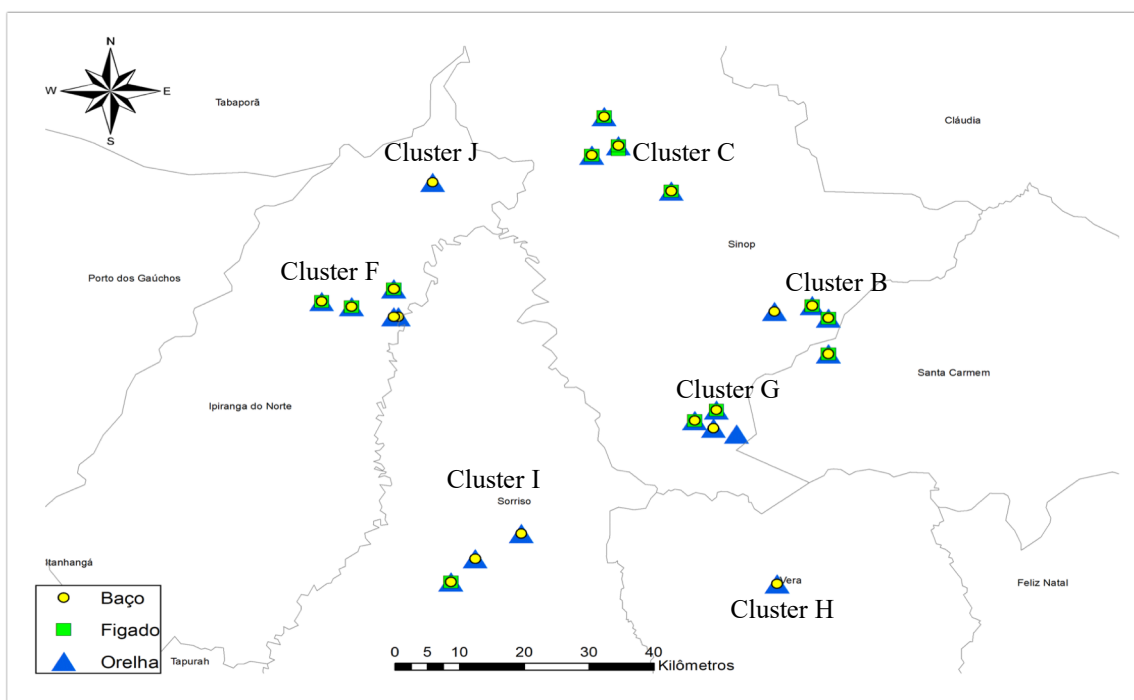
**Tabela 3.** Frequência da positividade de *M. leprae* em amostras de animais silvestres por gênero e tipo de amostras da Ordem Rodentia utilizando os marcadores RLEP e 16S RNAr

	qPCR	<i>Calomys</i> (%)	<i>Hylaeamys</i> (%)	<i>Necomys</i> (%)	<i>Neacomys</i> (%)	<i>Oecomys</i> (%)	<i>Proechimys</i> (%)	<i>Rhipidomys</i> (%)
ORELHA	RLEP	<b>11 (39,28%)*</b>	0 (0,00%)	<b>2 (28,57%)*</b>	0 (0,00%)	<b>3 (30,00%)*</b>	<b>21 (22,58%)*</b>	2 (18,18%)
	16S	<b>4 (14,28%)*</b>	0 (0,00%)	<b>1 (14,28%)*</b>	0 (0,00%)	1 (10,00%)	<b>12 (12,90%)*</b>	1 (9,09%)
	RLEP+16S	<b>3 (10,71%)*</b>	0 (0,00%)	<b>1 (14,28%)*</b>	0 (0,00%)	0 (0,00%)	<b>6 (6,45%)*</b>	0 (0,00%)
FÍGADO	RLEP	<b>4 (14,28%)*</b>	2 (100%)	<b>1 (14,28%)*</b>	0 (0,00%)	2 (20,00%)	<b>16 (17,20%)*</b>	2 (18,18%)
	16S	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (10,00%)	4 (4,30%)	1 (9,09%)
	RLEP+16S	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (10,00%)	4 (4,30%)	1 (9,09%)
BAÇO	RLEP	<b>6 (21,42)*</b>	0 (0,00%)	<b>2 (28,57%)*</b>	0 (0,00%)	2 (20,00%)	<b>26 (24,73%)*</b>	2 (18,18%)
	16S	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (2,15%)	1 (9,09%)
	RLEP+16S	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (2,15%)	1 (9,09%)

\*Em negrito são observadas as amostras com maior positividade nas análises de detecção de *M. leprae* por qPCR

### 6.3 Análise Geoespacial de animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia

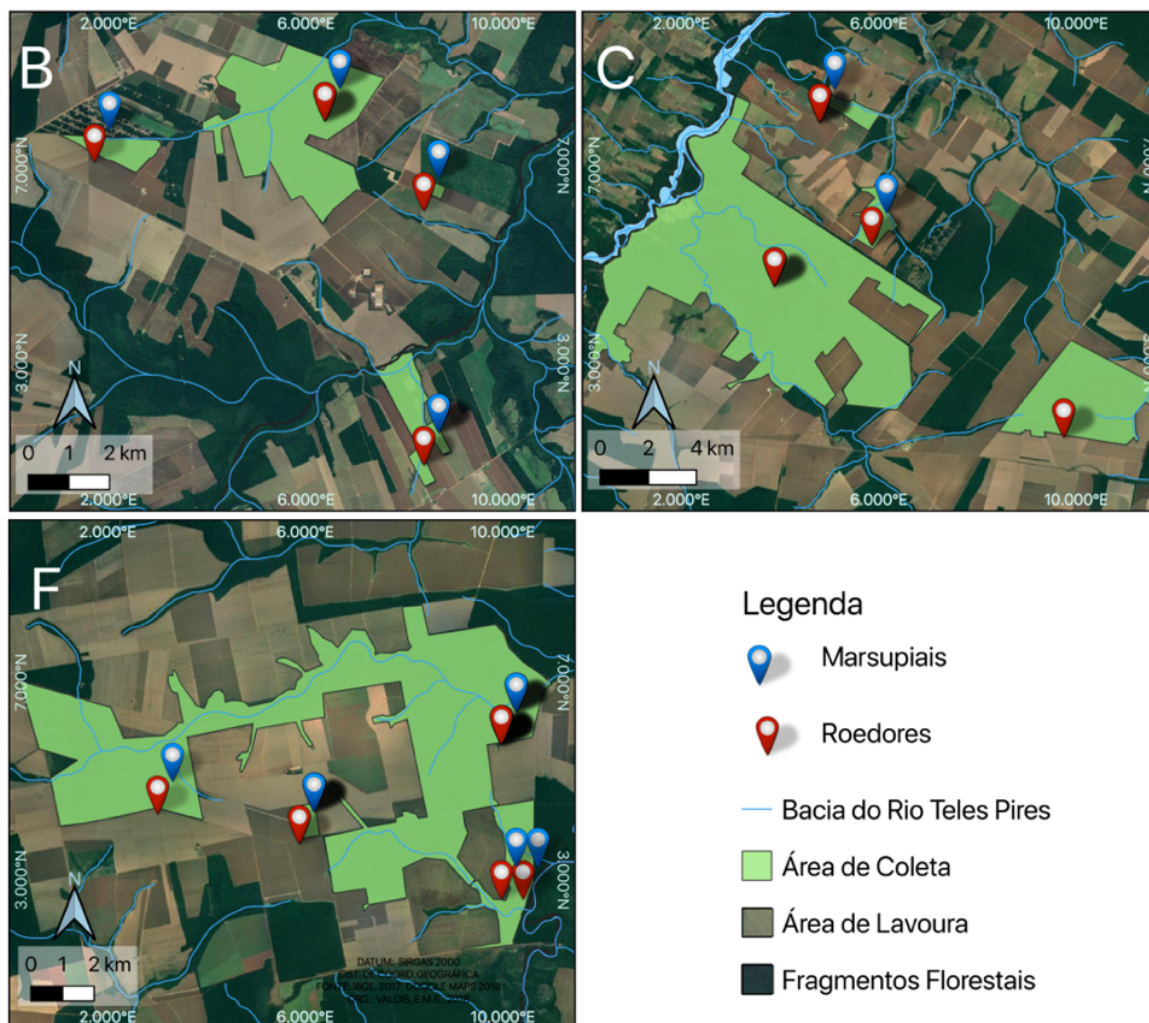
A distribuição dos animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia cujas amostras de baço, fígado e orelhas foram obtidas, pertencem a áreas de fragmentos próximos a perímetros urbanos onde a hanseníase apresenta situação hiperendêmica de casos novos, segundo a classificação adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (Figura 05) (129).



**Figura 5.** Mapa da área geográfica do Estado do Mato Grosso onde estão localizados os municípios de captura e coleta das amostras de baço, fígado e orelha de animais silvestres.

Em 2018, a taxa de detecção de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes foi de 593, 300, 531, 153 e 46 para os municípios de Ipiranga do Norte, Santa Carmem, Sinop, Sorriso e Vera, respectivamente.

As áreas de fragmentos florestais foram divididas em sete *Clusters*, sendo 17 animais no **Cluster B**, 17 no **Cluster C**, 36 no **Cluster F** (Figura 06) e 19 no **Cluster G**, 4 no **Cluster H**, 17 no **Cluster I** e 01 no **Cluster J** (Figura 07).



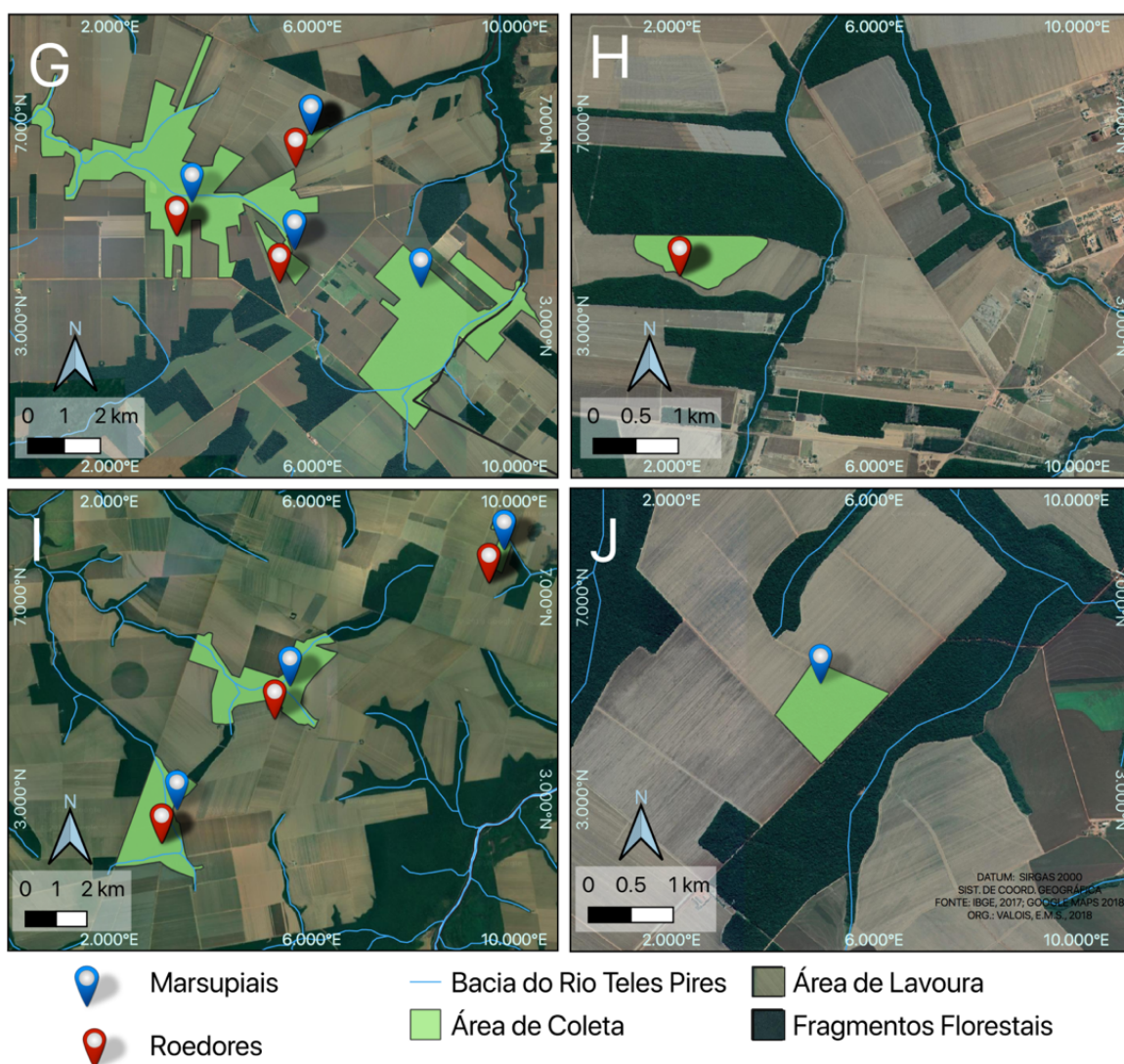
**Figura 6.** Mapas de localização dos *Clusters* B, C e F nas áreas de fragmentos florestais onde foram capturados os animais silvestres da ordem Didelphimorphia e Rodentia.

O *Cluster B* compreende a área que faz fronteira com os municípios de Sinop-MT e Santa Carmem-MT entre os Rios Azul e Mafalda. Os fragmentos florestais estão localizados a leste da cidade de Sinop e no entorno existem empreendimentos imobiliários como por exemplo, o condomínio de chácaras Taiamã e também empresas do setor agrícola. Nesse cluster foi observado um resultado positivo de 17 (100%) para RLEP e 2 (11,7%) 16S RNAr quando da detecção de *M. leprae*.

O *Cluster C* está localizado a oeste do bairro Camping Clube “Portal da Amazônia” em Sinop-MT, entre a Rodovia Federal BR-163 (Cuiabá-Santarém) e a Estadual MT-220 (Sinop-Juara). Os fragmentos florestais estão localizados ao redor de condomínios de chácaras, empreendimentos industriais agrícolas, mineração e uma Aldeia Indígena Kayabi. Localizados também na margem

esquerda do Rio Teles Pires e conectados em uma área de mata semi contínua devido à “área de preservação permanente (APP)”. Na detecção de *M. leprae* houve amplificação de 17 (100%) e 4 (23,5%) por RLEP e 16S RNAr respectivamente.

No município de Ipiranga do Norte-MT entre as estradas estaduais MT-222 e MT-010 está localizado o *Cluster F*, e os fragmentos de mata compreendem as áreas isoladas entre as lavouras e as matas semi contínuas as margens do Rio Verde afluente do Rio Teles Pires. Foi observada amplificação de 36 (100%) e 10 (27,7%) para RLEP e 16SRNAr, respectivamente.



**Figura 7.** Mapas de localização dos Clusters G, H, I e J nas áreas de fragmentos florestais onde foram capturados os animais silvestres da ordem Didelphimorphia e Rodentia.

No *Cluster G*, os fragmentos florestais são áreas isoladas por campos de soja e mata semi contínua em APPs do “Córrego Rossana” afluente do Rio Teles Pires e está situado no lado direito do bairro Alto da Glória a sudeste de Sinop-MT na fronteira com Santa Carmem-MT. Esta região fica às margens da Rodovia Federal BR-163 (Cuiabá-Santarém).

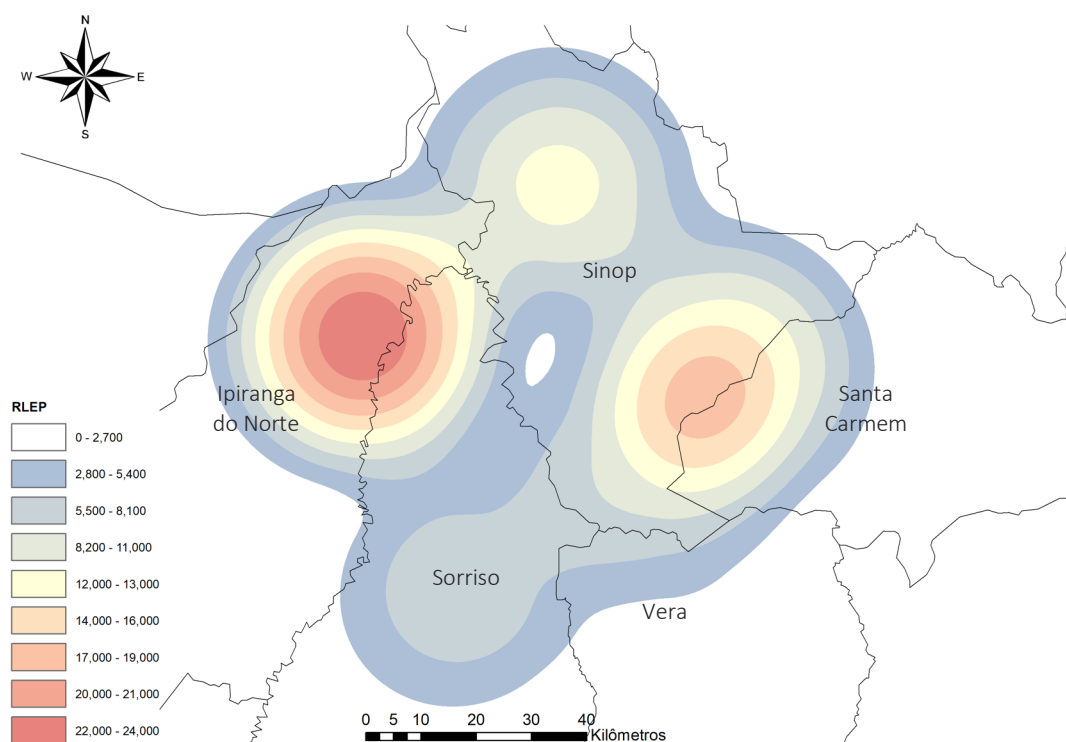
O fragmento florestal representado pelo *Cluster H*, está situado no município de Vera-MT à aproximadamente 7 km da sede municipal entre as estradas estaduais MT-225 e MT-140. Aqui existe a separação do fragmento da área contínua por uma barreira antrópica (estrada ou carreador) e a região é banhada pelos afluentes do Rio Caiabi. Apenas quatro amostras de roedores foram avaliadas, sendo três positivas para *RLEP* e quatro para 16S RNAr.

A área de coleta do *Cluster I* está situada no município de Sorriso-MT, que tem ligação com áreas contínuas, corredores ecológicos e APPs do Córrego Alves e afluentes em direção ao Rio Teles Pires e ao Rio Verde. Está cercado por grandes lavouras de soja e próximo a Rodovia Estadual Geraldo Francisco Cella (MT-242). A positividade para *RLEP* foi de 17 (100%) e 14 (82,3%) para 16S RNAr.

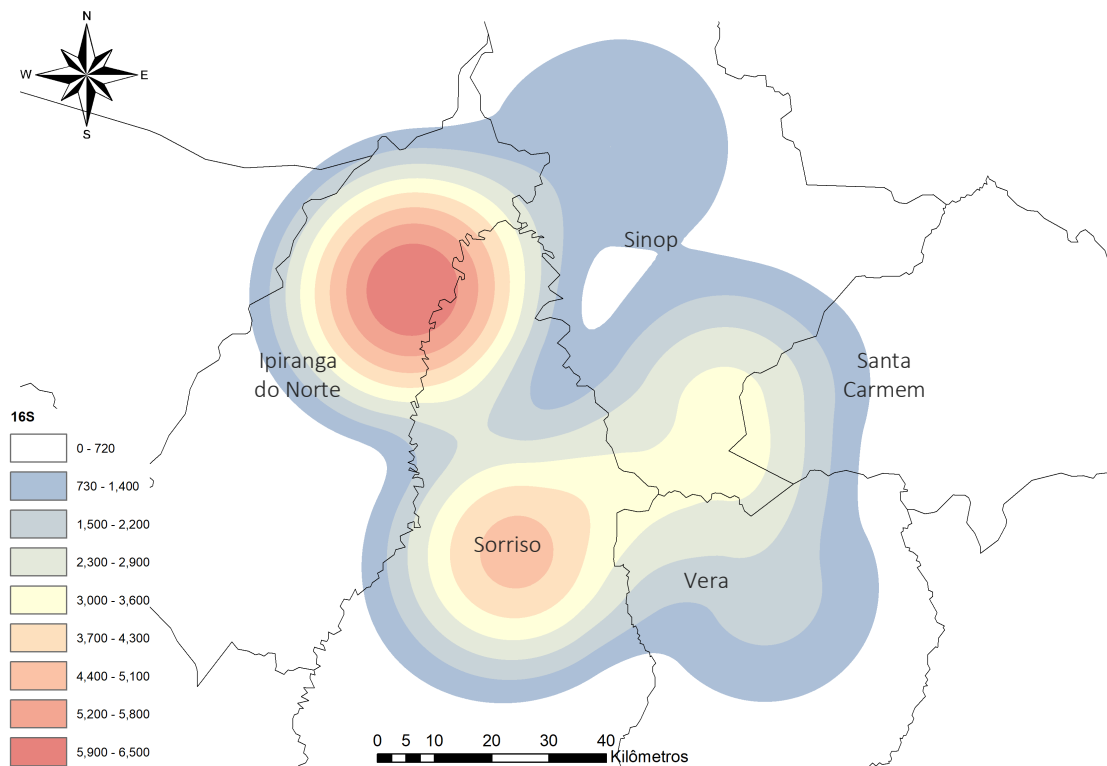
O *Cluster J* está situado ao norte do município de Ipiranga do Norte-MT, tem um fragmento isolado por campos de soja e com estreita ligação com a floresta contínua. É banhado pelo Córrego Vaivém e afluentes do Rio Teles Pires a margem da Estrada MT-220. Somente um animal foi analisado e o mesmo foi positivo para *RLEP* e 16S RNAr.

Destacamos a seguir os mapas de calor gerados para as variáveis *RLEP* (Figura 08) e 16S RNAr (Figura 09) utilizando-se o interpolador de *Kernel* com raio adaptativo e saída de valores em densidade que podem ser visualizados por cores que representam a intensidade de pontos das áreas encontradas com animais infectados com *M. leprae*.

Os valores das escalas referem-se aos resultados dos cálculos da interpolação entre as distâncias e a quantidade de pontos, o que significa dizer que quanto mais vermelho, maior a quantidade de animais infectados naquela área.



**Figura 8.** Mapa de calor gerado para a variável RLEP mostrando a intensidade de animais infectados entre a fronteira rural e o perímetro urbano dos municípios de Santa Carmem, Sinop, Sorriso, Ipiranga do Norte e Vera. A representação das áreas corresponde ao ponto de coleta dos animais.

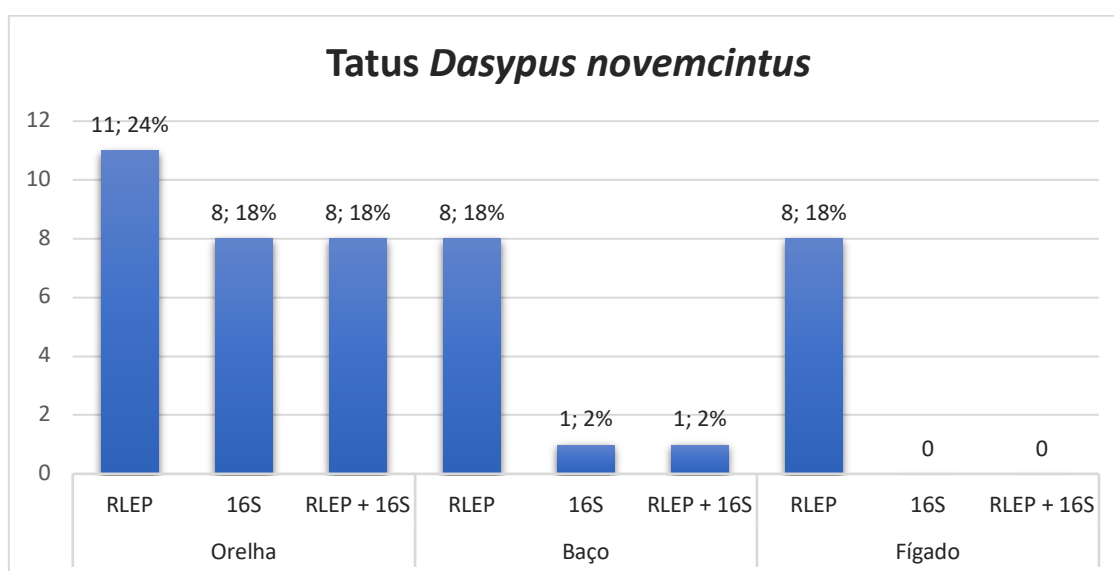


**Figura 9.** Mapa de calor gerado para a variável 16S RNAr mostrando a intensidade de animais infectados entre a fronteira rural e o perímetro urbano dos municípios de Santa Carmem, Sinop, Sorriso, Ipiranga do Norte e Vera. A representação das áreas corresponde ao ponto de coleta dos animais.

#### 6.4 Detecção de *M. leprae* em amostras de animais silvestres da espécie *Dasypus novemcinctus*: enumeração e viabilidade molecular

Nesse estudo os 11 tatus da espécie *D. novemcinctus* apresentaram 100% de positividade nas amostras de orelha para a sequência repetitiva RLEP. Nas orelhas de tatu foram positivas 72,7% e em amostras de baço 12,5% para o gene 16S RNAr.

Na análise para RLEP, as amostras de fígado e baço apresentaram 100% de positividade. Para 16S RNAr uma única amostra de baço foi positiva. Somente em oito animais foram coletadas amostras de fígado e baço. Os dados estão representados na Figura 10.



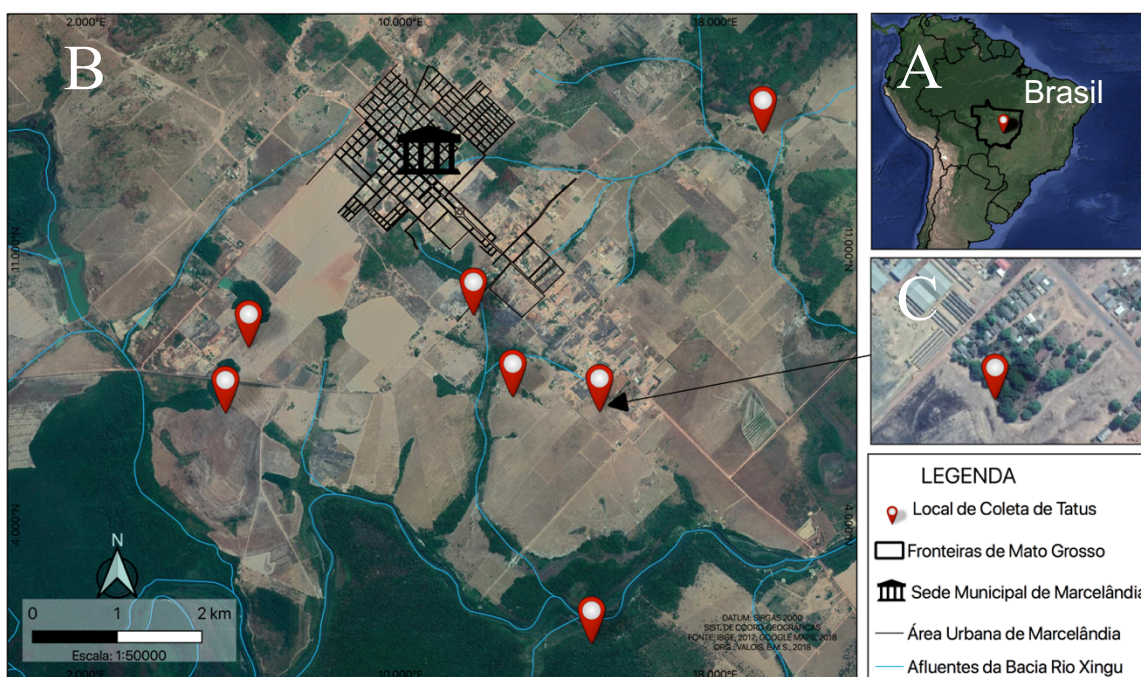
**Figura 10.** Detecção molecular de *M. leprae* para RLEP (presença), 16S RNAr (viabilidade) e RLEP+16SRNAr em amostras de orelha, fígado e baço oriundas de tatus da espécie *Dasypus novemcinctus*.

O ensaio RLEP mostrou ser o mais sensível (100%) em todas as amostras de tecido de tatu (Ct variando de 25 a 35. Nenhuma amplificação foi obtida nas amostras de fígado. Os resultados foram Cts variou de 31 a 35 nas orelhas e em uma única amostra de baço foi obtida uma Ct 35.

O ensaio 16S rRNA / RLEP identificou a presença de *M. leprae* em oito das 11 orelhas de tatus avaliadas e foram consideradas amostras positivas aquelas com Ct abaixo de 37.

### 6.5 Localização espacial da área de coleta de tatu *Dasypus novemcinctus* no município de Marcelândia - Mato Grosso.

Os tatus foram coletados por caçadores em chácaras e áreas urbanas e todos os animais destinavam-se ao consumo próprio ou ao comércio informal como fonte de renda. A região de captura possui várias fábricas para o beneficiamento de madeira de exportação. Esse setor industrial fica afastado do centro da cidade, por isso mantém residências para os funcionários vizinhas aos empreendimentos madeireiros (Figura 11).

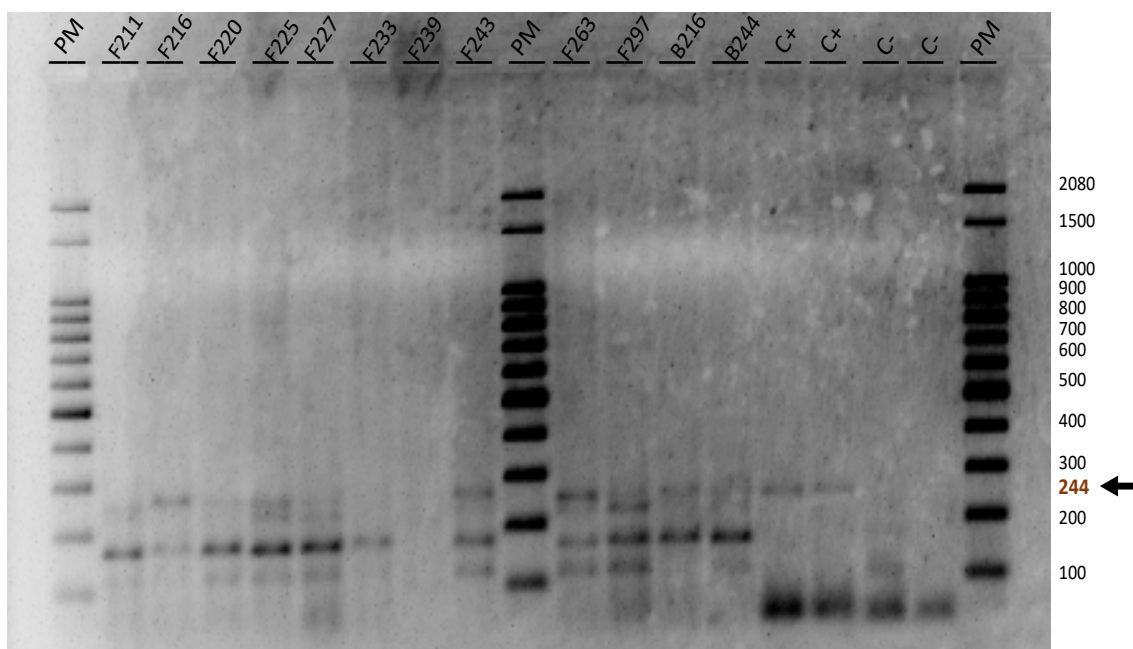


**Figura 11.** Imagem de satélite do Estado de Mato Grosso, Brasil (A); área de captura dos tatus (*Dasypus novemcinctus*) no município de Marcelândia – MT (B); destaque para local de coleta em pomar de perímetro urbano (C).

### 6.6 Detecção de *M. lepromatosis* por PCR Multiplex

Um total de 176 amostras de animais silvestres das ordens Didelphimorphia e Rodentia foram avaliados por PCR multiplex para os genes hemN e RLEP para a detecção de *M. lepromatosis*.

Nenhuma amostra de animal silvestre testada foi positiva para o marcador RLEP na PCR multiplex. Em relação aos sítios de coleta, as biopsias de orelhas foram negativas, no entanto, 12 amostras de fígado e 14 amostras de baço (figura 12) foram positivas para o marcador hemN com 244 pb referentes a espécie *M. lepromatosis*. Os gêneros *Proechimys* e *Marmosa* apresentaram positividade para o marcador henM que representa presença do bacilo *Mycobacterium lepromatosis*.



**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação do fragmento de 244 pb para *M. lepromatosis* em amostras de fígado e baço.

## 7. DISCUSSÃO

Transformações antropogênicas do ambiente natural, sintetizadas na destruição e na fragmentação de *habitat* naturais obrigam os animais silvestres a refúgios cada vez menores, descontínuos, mais vulneráveis e, fronteiros com entornos urbano (130). A expansão humana sob as florestas tropicais é um fator de risco para saúde, devido ao surgimento de zoonoses emergentes ou reemergentes (12).

As doenças zoonóticas mais comuns no Brasil são leishmaniose, hantavirose, doença de Chagas, febre-amarela e chikungunya (131). Assim, tais doenças são estudadas, visando prevenir possíveis surtos epidêmicos (132,133).

Considera-se há mais de três décadas a existência de animais naturalmente infectados por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) (134), e o reconhecimento de reservatórios não-humanos para o bacilo tem por finalidade contribuir com o entendimento dos padrões de transmissão da doença em regiões tropicais (135).

A espécie *M. leprae* é considerado um parasita essencialmente de humanos (136), assim, investigar a presença de animais silvestres infectados com o bacilo pode contribuir para um importante avanço na epidemiologia e no controle da hanseníase (137,138).

Este estudo avaliou a presença e a viabilidade do *M. leprae* em animais silvestres de área hiperendêmica no Centro-Norte do Estado de Mato Grosso, na região amazônica. Destaca-se que essa região vem mantendo os maiores números de casos novos, com índice de detecção geral de 88,9/100 mil habitantes em 2016 (9).

A área de coleta situa-se na Amazônia e em parte no Cerrado. Trata-se de uma região altamente antropizada, com mudanças na paisagem ambiental em virtude do desmatamento e extração de madeira, da redução da biodiversidade vegetal por monoculturas como algodão, milho, sorgo, soja, entre outros (74–76).

Além disso, a fragmentação da floresta caracteriza um distúrbio ecológico que intensifica a relação dos animais silvestres nessas áreas com animais

domésticos e com o homem, potencializando a ocorrência de surtos zoonóticos (88,92,93).

A utilização de metodologias moleculares com marcadores específicos tem contribuído na investigação mais aprofundada da relação do *M. leprae* com o ambiente. Assim, vários estudos têm demonstrado a presença do bacilo no ambiente destacando os possíveis reservatórios e/ou fontes de infecção (81,86,139,140).

Métodos moleculares para a determinação da viabilidade do *M. leprae*, utilizando como alvo o gene 16S RNAr e elementos repetitivos de DNA/RLEP do *M. leprae* como enumerador bacilar (67), favoreceram o estabelecimento de um teste rápido para avaliar o bacilo viável em biópsias de pele, assim como monitorar a eficácia da PQT (53), além de intensificar as investigações do bacilo no ambiente (91).

Esse estudo utilizou-se de marcadores *RLEP* e 16S RNAr para detecção do *M. leprae* em 14 gêneros de animais silvestres das Ordens Cingulata, Didelphimorphia e Rodentia. Estes animais foram capturados em remanescentes florestais com diferentes tamanhos, conectividade com a mata e proximidade com grupos populacionais humanos na região Centro-Norte do Estado de Mato Grosso.

Tendo em vista que, a ingestão da carne de animais silvestres como obtenção de proteína animal é cultural no Brasil, em especial na Região Amazônica (141,142), existe a preocupação ambiental de que a caça e o consumo de animais silvestres tenha estreita relação zoonótica (98,143,144).

Neste contexto, também é descrito a zooterapia, que consiste no uso medicinal de animais para diversas enfermidades, como asma, bronquite, reumatismo, picada de cobras, trombose, entre outras (145,146). Apesar da caça de animais selvagens ser proibida no Brasil (147), a carne ou derivados desses animais são comercializados de forma irregular em conjunto com produtos silvestres coletados da floresta de forma a complementar a renda familiar (146,148).

No Brasil, a caça e o consumo de tatus-galinha, tatu peba, tatu canastra (Ordem Cingulata), capivaras, pacas, cotias, mocó (Ordem Rodentia), mucuras, cuícas (Ordem Didelphimorphia) entre outros são habituais (138,149).

Entre os grupos de animais avaliados neste trabalho, destacam-se os didelfídeos (Ordem Didelphimorphia), pois, são reconhecidos como reservatórios de doenças comuns ao homem, como Chagas (116,150), Leishmaniose (151) e Leptospirose (152,153).

Por serem animais generalistas e ocuparem diferentes estratos verticais, os didelfídeos são comumente encontrados em fragmentos florestais (154,155) e próximos à áreas urbanas, sendo caracterizados como animais sinantrópicos (131,156), o que representa um alto nível de resiliência desse grupo aos impactos causados pelo homem (115).

Em relação à infecção por *M. leprae* em didelfídeos, foram avaliados seis gêneros da Ordem Didelphimorphia, sendo que o gênero *Marmosa* (60,47%) apresentou a maior positividade nas amostras de orelhas para os genes *RLEP* e 16S RNAr, fato corroborado pela literatura, em virtude da predileção do bacilo por áreas mais frias do corpo do hospedeiro (157).

Um detalhe importante, é que os gêneros *Marmosa* e *Monodelphis* podem ser reservatórios do *M. leprae* pois a positividade do gene 16S RNAr nas amostras de orelha, confirma que o bacilo tem seu maquinário celular ativo e esta se multiplicando. Esse dado sugere um fator de risco para infecção em seres humanos que vivem áreas de alta endemia de hanseníase, principalmente em locais onde a carne desses animais são consumidas ou utilizadas para fins terapêuticos (138,148,149).

Outro grupo avaliado para detecção de *M. leprae* nesse estudo foram os roedores (Ordem Rodentia), que assim como os didelfídeos e cingulatos, são animais presentes em fragmentos florestais (115,154), que podem ser encontrados desde as áreas de campos, matas de galeria e perímetro urbano, pois ocupam estratos verticais diversificados (158–160).

Os roedores têm grande importância em saúde pública, visto que, tendem a manter patógenos zoonóticos em animais domésticos e o homem, em alguns casos servindo como vetores e/ou reservatórios de doenças, tais como leptospirose (152,161), hantavirose (162,163) e leishmanioses (164–166).

Dado a sinantropia de roedores como *Rattus rattus*, esses animais são frequentemente associados a doenças causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium* (167–169).

Dos sete gêneros de roedores analisados, seis tiveram positividade nas amostras de orelhas para RLEP e/ou 16S RNAr, com destaque de maior positividade nos gêneros *Proechimys* e *Calomys*.

Nas amostras de fígado e baco, o gênero *Proechimys* apresentou maior positividade para ambos os marcadores. Esses dados revelam que o bacilo segue o mesmo padrão de infecção relatados em tatus (*Dasypus novemcinctus*) encontrados no sul dos Estados Unidos (61,154,167).

Entre 2011 e 2015, tatus *D. novemcinctus* capturados no sul dos Estados Unidos apresentavam infecção por *M. leprae* e por meio de análises genotípicas de amostras coletadas dos tatus e de pessoas infectadas, foi possível constatar que ambos possuíam a mesma cepa do bacilo (81,86).

Como mencionado anteriormente, o consumo de carne de animal silvestre no Brasil, como a do tatu da espécie *D. novemcinctus* está relacionado a necessidade de ingestão de uma fonte de proteína animal por grupos populacionais humanos na Amazônia (170,171).

Estudos evidenciam uma possível transmissão zoonótica do *M. leprae* a partir do contato com tatu (*D. novemcinctus*), uma vez que, animais infectados poderiam transmitir o bacilo ao homem pelo manuseio de sua carne (84,172,173).

No presente estudo, foram analisados amostras de orelha, fígado e baço de 11 tatus *D. novemcinctus* com a finalidade de verificar a infecção e a presença de *M. leprae* viável, visto que a literatura científica apresenta evidências de tatus naturalmente infectados por *M. leprae*, mas no Brasil há poucos estudos que mostram essa infecção e nenhum estudo que evidencie a replicação do bacilo em tatus no território brasileiro (172,174).

Na análise de qPCR RLEP, as amostras de orelhas (direita e esquerda) dos 11 tatus, apresentaram 100% de positividade para a detecção do DNA do *M. leprae*, 54,5% positivos para amostras de fígado e 72,7% em amostras de baço. Estudo realizado no Município de Belterra, no Pará, dos 16 tatus analisados 62% foram positivos na detecção do *M. leprae* (84).

Salientamos que as coletas feitas em Belterra-PA foram de capturas realizadas em área de floresta, enquanto que, em nossa pesquisa todos os animais foram capturados em área urbana ou chácaras. Este fato sugere que

a dispersão do bacilo, pode acontecer a partir de animais infectados em áreas endêmicas da hanseníase.

Assim destacamos, o resultado de positividade de 72,7% na viabilidade do gene 16S RNAr em orelhas dos 11 tatus avaliados. Apenas uma amostra de baço foi positiva para esse marcador. Esses dados reforçam a presença de *M. leprae* viável, ou seja permanece metabolicamente ativo e, portanto, capaz de causar infecção.

Observou-se que as amostras de baço e fígado apresentaram menor ou nenhuma positividade para o RNAr 16S em relação às amostras de orelha. A viabilidade reduzida nessas amostras podem estar relacionadas à quantidade de lipídeos observada nas amostras durante a extração, visto que a concentração de RNA foi menor que a observada nas orelhas.

O projeto apresentou limitações importantes relacionados ao tempo de abate pelos caçadores, a chegada do animal para coleta das biópsias a serem mantidas em veículo de manutenção para a preservação do RNA. Além disso, não é possível mensurar as perdas por exposição a temperatura ambiente em bancada e transporte, como também as falhas na extração em decorrência do tamanho das peças extraídas.

As infecções por *M. leprae* em tatus são descritas em vários estudos, mas recentemente roedores do tipo *Rattus rattus* foram associados a hanseníase causada pelo bacilo *M. lepromatosis*. Tais dados foram publicados em um estudo realizado em Novo Leon, México, sendo as infecções relacionadas ao consumo da carne de roedores (96). Do mesmo modo que, foram encontrados esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) com hanseníase na Escócia, sendo os bacilos identificados como *M. lepromatosis* (124).

Em nosso estudo, também foi detectada a presença do *M. lepromatosis* em biópsias de fígado e baço de roedores e marsupiais, utilizando a PCR multiplex para o gene *hemN* específico para o bacilo. Apesar de ser um resultado importante, para fins de publicação ainda será necessário realizar o sequenciamento das amostras por se tratar de informações relevantes para a epidemiologia da doença.

Na Amazônia, os roedores possuem grande relevância para ribeirinhos (149), seja para obtenção de proteína, para medicamentos, uso como amuletos, e também na produção de artesanatos (146). Dessa maneira, alertamos para a

possibilidade de que essas comunidades, por meio da cultura local poderiam potencializar a manutenção e da disseminação de hanseníase, pela utilização de animais previamente infectados por *M. leprae* e *M. lepromatosis*.

Cabe aqui novamente o destaque para os dados inéditos que apresentamos, pois nenhum estudo publicado até o momento apresentou a detecção e a viabilidade de *M. leprae* em animais silvestres das Ordens Didelphimorphia e Rodentia no Brasil.

Nesse estudo a análise espacial dos *clusters* definidos para a captura e coletas das amostras de animais selvagens evidencia que os fragmentos florestais estão localizados dentro de fazendas ou nas bordas de sítios e chácaras. Além do mais, os *clusters* estavam próximos de estradas estaduais e rodovias federais de grande tráfego como a BR-163, que liga Cuiabá-MT à Santarém-PA, evidenciando a presença contínua do homem nessas áreas.

No entanto, o ambiente dos fragmentos florestais como esses da área de coleta e o material decorrente da senescência de plantas e árvores depositadas no solo forma um microclima com temperaturas máximas de 28,5 °C no período 'chuvoso' e 32,6 °C na 'seca' (180). Essas condições climáticas podem permitir que o bacilo se mantenha por tempo suficiente dentro das áreas de mata, favorecendo a infecção de animais silvestres.

Animais silvestres, como por exemplo os roedores e marsupiais são constantemente encontrados em remanescentes florestais (175). O uso do estrato vertical na mata parece ser bem distribuído entre essas espécies, pois habitam apenas o solo ou tocas (terrestre), as copas das árvores e sub-bosques (arborícola) ou ambos estratos (escansorial) (175,176).

Em nosso estudo, foi também verificado que os gêneros com maiores percentuais de infecção foram *Proechimys* (roedor), e *Marmosa* (marsupial), e esses compartilham do mesmo nicho alimentar, buscando artrópodes, frutos e sementes na liteira, que é uma camada de deposição no solo dentro das florestas (160,176).

A liteira representa importante fonte de recursos para os animais silvestres nos fragmentos e as possíveis descargas bacilares, tanto de animais silvestres infectados, como de pessoas doentes que circulam por esses ambientes, podendo favorecer uma ampla dispersão do patógeno. A literatura

científica destaca várias hipóteses para explicar a infecção nesses animais, assim como a presença de bacilos viáveis em solo (177,178) e água (179–181).

Em relação à espécie *D. novemcinctus*, esses animais não se limitam apenas aos fragmentos florestais, e podem ser encontrados nos mais variados ambientes (182). Neste estudo, todos os tatus coletados estavam em áreas próximas às residências de chácaras e perímetro urbano do município de coleta. Portanto, a existência de animais infectados por *M. leprae* nessa região sugere potencial risco de transmissão da doença para humanos (74,183).

No caso de infecção natural em animais silvestres até o momento não há estimativas para o adoecimento, podendo permanecer incubado por longo período (184). Pressupomos que seria raro encontrar animais tipicamente multibacilares, visto que, em decorrência da debilidade tornar-se-iam presas ou ficariam impossibilitados de buscar alimentos.

Devido a curta longevidade dos roedores silvestres, que podem variar de dois a no máximo três anos (185), dos didelfídeos de 2,6 a 4,2 anos (159,186) e tatus (*D. novemcinctus*) entre 8 a 12 anos (110). Os animais positivos para RLEP/16S, representam uma dinâmica de dispersão ativa e recente, pois, em comparação com humanos, os sintomas podem surgir entre dois a sete anos após a infecção (187).

Após a infecção de *M. leprae* nesses animais de forma experimental é possível fazer uma estimativa de aparecimento de sinais por volta dos 15 meses (167, 194), mas no caso de infecção natural até o momento não sabemos estimar o tempo de adoecimento.

O tempo de incubação do *M. leprae* pode levar mais de sete anos, como por exemplo, no caso de uma chimpanzé em cativeiro no Japão que apresentou os sintomas da hanseníase 30 anos após ter saído do seu habitat natural na África Ocidental, e o caso foi confirmado por meio da detecção do gene 16S (112).

A origem de infecção por *M. leprae* e *M. lepromatosis* nesses animais ainda não fica clara com esse estudo. Estariam esses bacilos distribuídos de forma ubiquitária na Amazônia? Ou a presença humana nesses fragmentos representa o principal fator para a dispersão dos bacilos, por meio de descargas bacilares de pessoas com hanseníase?

Os ecossistemas naturais encontram-se sob forte e crescente pressão humana, sofrendo fragmentação, redução e destruição de grandes áreas nativas em decorrência do avanço da agricultura, pecuária entre outras atividades produtivas de caráter antrópico. Essa pressão com o consequente desequilíbrio ambiental tem promovido a emergência de patógenos, como parasitos, bactérias, fungos e vírus em todo o mundo (130).

O melhor conhecimento e a compreensão das possíveis fontes não humanas de *M. leprae* é um passo importante para o controle da hanseníase e possibilita explicar os padrões de infecção na população, promovendo com isso o seu controle.

Atualmente, de posse de metodologias mais robustas, é possível direcionar perguntas que abordem a questão da relação do ambiente com *M. leprae* e trazer respostas para preencher a lacuna que existe no conhecimento sobre a sua transmissão.

## 8. CONCLUSÕES

Os grupos de roedores e marsupiais avaliados nesse estudo representam uma parcela de animais frequentemente encontrados em fragmentos de mata, variando em número e diversidade de espécies a depender da região, pois, estes animais possuem alta resiliência e plasticidade aos impactos causados pelo homem.

A presença de animais infectados pelos bacilos causadores de hanseníase em remanescentes florestais sugerem indícios da existência de transmissão bacilar ativa e recente, mesmo frente a curta longevidade desses animais e o tempo de multiplicação do patógeno.

A presença frequente do homem nos fragmentos florestais onde foram encontrados animais silvestres positivos para *M. leprae* ou *M. lepromatosis*, aumenta a possibilidade do risco de uma infecção zoonótica. Um exemplo disso são os tatus com detecção de bacilo viável obtidos de caça realizada próxima a área urbana em região endêmica para hanseníase.

A metodologia de qPCR por meio do gene 16S rRNA foi efetiva para demonstrar a presença de *M. leprae* viável em animais silvestres.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de controle da hanseníase. 3a edição. 2002. 89 p.
2. Brasil. Ministério da Saúde. GUIA PRÁTICO SOBRE A HANSENÍASE
3. Grzybowski A, Sak J, Pawlikowski J, Iwanowicz-Palus G. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912)-The 100th anniversary of the death of the discoverer of *Mycobacterium leprae*. Clin Dermatol. 2013;31(5):653–5.
4. Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Sittiwakin T, Likanonsakul S, Pasadorn S, et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;54(2):263–70.
5. Brasil MDS. Controle da Hanseníase na Atenção Básica. GUIA PRÁTICO PARA PROFISSIONAIS DA EQUIPE DE SAÚDE DA FAMÍLIA. Bras Ministério da Saúde Secr Políticas Saúde Dep Atenção Básica [Internet]. 2001;1–86.
6. Brasil FN de S. Manual de controle de roedores. Man Control roedores [Internet]. 2002;132.
7. WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2018;(16):201–20.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico - Hanseníase, verminoses e tracoma têm cura - a experiência de uma campanha integrada. Bol Epidemiológico. 2016;47(21):1–10.
9. Brasil. Caracterização da situação epidemiológica da hanseníase e diferenças por sexo, Brasil, 2012-2016. Bol epidemiológico [Internet]. 2018;49(4):0–11.
10. da Costa Martins AC, Miranda A, de Oliveira MLW del R, Bühner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. Braz J Otorhinolaryngol. 2010;76(5):579–87.
11. BRATSCHI MW, STEINMANN P, WICKENDEN A, GILLIS TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. Lepr Rev [Internet]. 2015;86:142–55.
12. Zanella JRC. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância

- para saúde e produção animal. *Pesqui Agropecu Bras.* 2016;51(5):510–9.
13. White LA, Forester JD, Craft ME. Disease outbreak thresholds emerge from interactions between movement behavior, landscape structure, and epidemiology.
  14. Domingues MS, Bermann C. O arco de desflorestamento na Amazônia: da pecuária à soja. *Ambient Soc [Internet]*. 2012;15(2):1–22.
  15. DESIKAN K V., SREEVATSA. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev [Internet]*. 1995;66(4):287–95.
  16. Kerr-Pontes LRS, Barreto ML, Evangelista CMN, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: Results of a case-control study. *Int J Epidemiol.* 2006;35(4):994–1000.
  17. Davis GL, Ray NA, Lahiri R, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Williams DL, et al. Molecular Assays for Determining *Mycobacterium leprae* Viability in Tissues of Experimentally Infected Mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8).
  18. Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1352–6.
  19. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc [Internet]*. 2004 Aug;13(2):76–88.
  20. Robbins G, Mushrif Tripathy V, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One.* 2009;4(5):1–8.
  21. Schuenemann VJ, Avanzi C, Krause-Kyora B, Seitz A, Herbig A, Inskip S, et al. Ancient genomes reveal a high diversity of *Mycobacterium leprae* in medieval Europe. *PLoS Pathog.* 2018;14(5):1–17.
  22. GHA. H. On the etiology of leprosy. *Klin Monbl Augenheilkd Augenarztl Fortbild [Internet]*. 1950;117(6):573–8.
  23. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc.* 2004;13(2):76–88.
  24. VIRMOND M. a Hanseníase Como Doença De Baixa Prevalência.

- Hansenol Int. 1995;20(2):27–35.
25. BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de leprologia. 1960;192.
  26. Nsagha DS, Bamgboye EA, Assob JCN, Njunda AL, Kamga HLF, Bissek ACZK, et al. Elimination of Leprosy as a public health problem by 2000 AD: An epidemiological perspective. *Pan Afr Med J*. 2011;9:1–10.
  27. Oliveira CR De. Prevenção de incapacidades na Hanseníase. :259–96.
  28. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G, Foss NT, Fitness J, Floyd S, et al. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop [Internet]*. 2002;8(3):209–28.
  29. WHO. Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 [Internet]. Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020. 2016. 23 p.
  30. OPAS. OPAS/OMS aponta estigma como obstáculo para eliminar hanseníase [Internet]. 31 de janeiro de 2018. 2018 [cited 2018 Nov 21].
  31. Plano Estratégico de Enfrentamento da Hanseníase em Mato Grosso Cuiabá. 2018;
  32. Nunzie E, Ortega Cabrera L V, Macanchi Moncayo FM, Ortega Espinosa PF, Clapasson A, Massone C. Lucio Leprosy with Lucio's phenomenon, digital gangrene and anticardiolipin antibodies. *Lepr Rev [Internet]*. 2014;85(3):194–200.
  33. Velarde-Félix JS, Alvarado-Villa G, Vera-Cabrera L. “Lucio's phenomenon” associated with mycobacterium lepromatosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(3):483–4.
  34. Ward AC, Ne T. Lehmann and Neumann 1896, 363. 2015.
  35. Rindi L, Garzelli C. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol [Internet]*. 2014;21:375–83.
  36. Lee SY, Kim BJ, Kim H, Won YS, Jeon CO, Jeong J, et al. *Mycobacterium paraintracellulare* sp. Nov., for the genotype INT-1 of *Mycobacterium intracellulare*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(8):3132–41.
  37. Tortoli E, Kohl TA, Brown-Elliott BA, Trovato A, Leï SC, Garcia MJ, et al. Emended description of mycobacterium abscessus *Mycobacterium abscessus* subsp. *Abscessus* and mycobacterium abscessus subsp. *bolletii* and designation of mycobacterium abscessus subsp. *massiliense* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(11):4471–9.
  38. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren

- RM, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, M. Mungi. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(8):1296–9.
39. Riojas MA, McGough KJ, Rider-Riojas CJ, Rastogi N, Hazbón MH. Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *mycobacterium bovis*, *mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of mycob [Internet]. Vol. 68, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society; 2018 [cited 2018 Nov 15]. p. 324–32.
  40. Scollard DM. Infection with *Mycobacterium lepromatosis*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Sep 7;95(3):500–1.
  41. Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG. *Leprosy*. 1988;1(3):330–48.
  42. Alves ED, Ferreira TL, Ferreira IN. HANSENÍASE: AVANÇOS E DESAFIOS. Coleção PR. NESPROM, editor. Brasília - DF: Universidade de Brasília - UnB; 2014. 492 p.
  43. Chokkakula S, Elyass ME, Pv KB, Attitalla IH, Mahdi AA. Clinical Biotechnology and Microbiology Single Nucleotide Polymorphisms ( SNPs ) in *Mycobacterium leprae* and their role in strain typing of leprosy bacilli. 2016;1(1):11–5.
  44. Lastória JC, de Abreu MAMM. *Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1*. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):205–18.
  45. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2006 Apr;19(2):338–81.
  46. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015;112(14):4459–64.
  47. Brosch R, Gordon S V., Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. *Res Microbiol*. 2000;151(2):135–42.
  48. Philipp WJ, Schwartz DC, Telenti A, Cole ST. *Mycobacterial genome*

- structure. Electrophoresis. 1998.
49. Marques MAM, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MC V. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1998;66(6):2625–31.
  50. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: Towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*. 1999;33(6):1103–17.
  51. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007–11.
  52. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* [Internet]. 2001;409(6823):1007–11.
  53. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Apr 7;112(14):4459–64.
  54. Pontes A, Almerida M, Xavier M, Quaresma J, Youssi E. Detecção do DNA de *Mycobacterium leprae* em secreção nasal. *Biologia (Bratisl)*. 2008;61:734–7.
  55. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de procedimentos técnicos [Internet]. 2010.
  56. Araujo S, Monteiro M, Rezende F, Carrijo D, Sousa R De, Rosa MR, et al. Major Article Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination , anti-phenolic glycolipid I serology , and Mitsuda test response : 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):739–45.
  57. Ridley, D. S; Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255–73.
  58. Bombarda S, Chimara É, Seiscento M, Oliveira M de LV, Ferrazoli L, Galesi VMN. Recomendações para o diagnóstico e tratamento das micobacterioses não tuberculosas no estado de são paulo. 2011;1–15.
  59. Cunha AZS Da. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico,

- tratamento e controle. Cien Saude Colet. 2002;7(2):235–42.
60. RIDLEY DS, JOPLING WH. A classification of leprosy for research purposes. Lepr Rev [Internet]. 1962 Apr;33:119–28.
  61. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. J Clin Microbiol. 1990;28(9):1913–7.
  62. De Wit MYL, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. J Clin Microbiol. 1991;29(5):906–10.
  63. Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona R V., Fajardo TT, et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. J Clin Microbiol. 1993;31(4):895–9.
  64. Santos AR, Filho JTG, 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(2):113–20.
  65. Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo MEN, Filho JTG, Suffys PN, et al. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. J Med Microbiol. 1997;46(2):170–2.
  66. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Supapakul P, Wachapong S, Mahotarn K, Brennan PJ. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;48(3):319–28.
  67. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2124–30.
  68. Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy : Steps Along the Journey of Eradication. Public Health Rep. 2008;123(April):198–205.
  69. R C-S. Tratamento da hanseníase. Lyon S, Grossi MAF Hansen Rio Janeiro Medb. 2013;
  70. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n 3125. 2010;7 de outub.
  71. Davey, TF; Rees R. The Nasal Discharge in Leprosy: Clinical and

- Bacteriological Aspects. *Lepr Rev.* 1974;
72. Villada G, Zarei M, Romagosa R, Forgione P, Fabbrocini G, Romanelli P. Autochthonous borderline tuberculoid leprosy in a man from Florida. *Lepr Rev* [Internet]. 2016 Mar;87(1):101–3.
  73. West BC, Todd JR, Lary CH, Blake LA, Fowler ME, King JW. Leprosy in six isolated residents of northern Louisiana. Time-clustered cases in an essentially nonendemic area. *Arch Intern Med.* 1988;148(9):1987–92.
  74. 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;
  75. Rendini T, Levis W. Autochthonous leprosy in the eastern United States is from international migration, not from armadillos. *JAAD Case Reports* [Internet]. 2017;3(4):370.
  76. WHO. Weekly epidemiological record. World Health organization Geneva. 2017.
  77. Aftab H, Nielsen SD, Bygbjerg IC. Leprosy in Denmark 1980-2010: A review of 15 cases Case Reports. *BMC Res Notes.* 2016;9(1):1–9.
  78. Norman FF, Fanciulli C. Imported and autochthonous leprosy presenting in Madrid ( 1989 e 2015 ): A case series and review of the literature. 2016;
  79. Binford CH, Storrs EE, Walsh GP. Leprosy in the armadillo: a new model in leprosy research. *Am J Pathol.* 1975;
  80. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Leprosy: A zoonosis. *Lepr Rev.* 1981;
  81. Sharma R, Singh P, Loughry WJ, Lockhart JM, Inman WB, Duthie MS, et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Dec;21(12):2127–34.
  82. Cardona-Castro N, Beltrán JC, Ortiz-Bernal A, Vissa V. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the Andean region of Colombia. *Lepr Rev.* 2009;80(4):424–31.
  83. Schmitt JV, Dechandt IT, Dopke G, Ribas ML, Cerci FB, Viesi JMZ, et al. Armadillo meat intake was not associated with leprosy in a case control study, Curitiba (Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):857–62.
  84. da Silva MB, Portela JM, Li W, Jackson M, Gonzalez-Juarrero M, Hidalgo AS, et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks

- associated with human contact or consumption of armadillos. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(6).
85. Truman R. Leprosy in Wild Armadillos. Lepr Rev. 2005;76(3):198–208.
  86. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. N Engl J Med [Internet]. 2011;364(17):1626–33.
  87. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. Dis Model Mech [Internet]. 2013;6(1):19–24.
  88. Balamayooran G, Pena M, Sharma R, Truman RW. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. Clin Dermatol [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 25];33(1):108–15.
  89. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. Science [Internet]. 2016 Nov 11;354(6313):744–7.
  90. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. Infect Genet Evol. 2008;8(5):627–31.
  91. Turankar RP, Pandey S, Lavania M, Singh I, Nigam A, Darlong J, et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. Int J Mycobacteriology [Internet]. 2015;4(1):54–9.
  92. Wahyuni R, Adriaty D, Prakoeswa CRS. *Mycobacterium leprae* in Daily Water Resources of Inhabitants Who Live in Leprosy Endemic Area of East Java. 2010;1(2):65–8.
  93. Kazda J, Irgens LM, Kolk AH. Acid-fast bacilli found in sphagnum vegetation of coastal Norway containing *Mycobacterium leprae*-specific phenolic glycolipid-I. IntJLeprOther MycobactDis. 1990;
  94. Fukunishi Y, Meyers WM, Binford CH, Walsh GP, Johnson FB, Gerone PJ, et al. Electron microscopic study of leprosy in a mangabey monkey (natural infection). Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1984;
  95. Honap TP, Pfister LA, Housman G, Mills S, Tarara RP, Suzuki K, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman

- primates. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(1):1–17.
96. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes W, Ocampo-Garza SS, Ocampo-Candiani J, Molina-Torres CA, Avanzi C, et al. *Mycobacterium lepromatosis* infections in Nuevo León, Mexico. J Clin Microbiol. 2015;53(6):1945–6.
  97. Lima MF, Lima LNGC, Martins LC, Souza AP, Santos EC, Alves MM, et al. A detecção do DNA do *Mycobacterium leprae* em roedores silvestres da região amazônica . 2016;
  98. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Volume I. Bacterioses and mycoses. PAHO Sci Tech Publ No 580. 2005;l(3rd edition):378pp.
  99. Jones BA, Grace D, Kock R, Alonso S, Rushton J, Said MY, et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2013;110(21):8399–404.
  100. Meneguzzi VC, Dos Santos CB, Leite GR, Fux B, Falqueto A. Environmental niche modelling of phlebotomine sand flies and Cutaneous leishmaniasis identifies *Lutzomyia intermedia* as the main vector species in Southeastern Brazil. PLoS One. 2016;11(10):1–16.
  101. Bauch SC, Birkenbach AM, Pattanayak SK, Sills EO. Public health impacts of ecosystem change in the Brazilian Amazon. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2015;112(24):7414–9.
  102. Young KI, Mundis S, Widen SG, Wood TG, Tesh RB, Cardoso J, et al. Abundance and distribution of sylvatic dengue virus vectors in three different land cover types in Sarawak, Malaysian Borneo. Parasit Vectors [Internet]. 2017;10(1):406.
  103. Wolfe ND, Daszak P, Kilpatrick AM, Burke DS. Bushmeat hunting, deforestation, and prediction of zoonotic disease emergence. Emerg Infect Dis. 2005;11(12):1822–7.
  104. Bonwitt J, Kandeh M, Dawson M, Ansumana R, Sahr F, Kelly AH, et al. Participation of women and children in hunting activities in Sierra Leone and implications for control of zoonotic infections. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1–21.
  105. Myers SS, Gaffikin L, Golden CD, Ostfeld RS, H. Redford K, H. Ricketts T, et al. Human health impacts of ecosystem alteration. Proc Natl Acad Sci

- [Internet]. 2013;110(47):18753–60.
106. Wilcox BA, Gubler DJ. Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environ Health Prev Med* [Internet]. 2005;10(5):263–72.
  107. Laurance WF, Camargo JLC, Luizão RCC, Laurance SG, Pimm SL, Bruna EM, et al. The fate of Amazonian forest fragments: A 32-year investigation. *Biol Conserv*. 2011 Jan;144(1):56–67.
  108. Laurance WF, Vasconcelos HL. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na amazônia. *Oecologia Bras* [Internet]. 2009;13(03):434–51.
  109. Peres CA. Synergistic effects of subsistence hunting and habitat fragmentation on amazonian forest vertebrates. *Conserv Biol*. 2001;
  110. FAO. De Los Llanos Orientales. 2008. 1-13 p.
  111. IUCN RL. *Dasyopus novemcinctus*,. 2014;8235.
  112. REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; FREGONEZI, M. N.; ROSSANEIS BK. Mamíferos do Brasil 1 ed. Mamíferos do Bras [Internet]. 2006;31(4):231–76.
  113. Amorim TOS, Andriolo A. Variáveis ambientais e ocorrência de marsupiais didelfídeos em um fragmento de Mata Atlântica , no município de Juiz de Fora , MG : uma amostragem por armadilhas fotográficas. 13:87–101.
  114. Fernanda É, Gomes G, Aparecida D. *albiventris* ( Lund 1840 ) em fragmentos de Cerrado na Fazenda Cervinho , Bandeirantes , MS , Brasil Survey and characterization of *Didelphis albiventris* ( Lund 1840 ) in fragments of Cerrado in Cervinho. 2013;(Lund 1840).
  115. Melo GL, Miotto B, Peres B, Cáceres NC. Microhabitat of small mammals at ground and understorey levels in a deciduous, southern Atlantic forest. *An Acad Bras Cienc*. 2013;85(2):727–36.
  116. Lopes CMT, Menna-Barreto RFS, Pavan MG, Pereira MC de S, Roque ALR. *Trypanosoma janseni* n. Sp. (trypanosomatida: Trypanosomatidae) isolated from *didelphis aurita* (mammalia: Didelphidae) in the atlantic rainforest of rio de janeiro, brazil: Integrative taxonomy and phylogeography within the *trypanosoma cruzi* clade. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(1):45–55.
  117. Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y,

- Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6).
118. Teixeira BR, Loureiro N, Strecht L, Gentile R, Oliveira RC, Guterres A, et al. Population ecology of hantavirus rodent hosts in Southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(2):249–57.
  119. Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Sousa RP, et al. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2127–34.
  120. Fornazari F, Langoni H, Marson PM, Nóbrega DB, Teixeira CR. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. *Acta Trop* [Internet]. 2018;178:205–12.
  121. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: Pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2001;356(1411):991–9.
  122. Kock R a. What is this Infamous “Wildlife/Livestock Disease Interface?” A Review of Current Knowledge for the African Continent. *Conserv Dev Interv Wildlife/Livestock Interface Implic Wildlife, Livest Hum Heal* [Internet]. 2005;1–13.
  123. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med*. 2011;364(17):1626–33.
  124. Meredith A, Pozo J Del, Smith S, Milne E, Stevenson K, McLuckie J. Leprosy in red squirrels in Scotland. *Vet Rec* [Internet]. 2014 Sep 20;175(11):285–6.
  125. IBGE. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016.
  126. Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Zeitschrift*. 2006;
  127. Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, De Moraes Gonçalves JL, Sparovek G. Köppen’s climate classification map for Brazil. *Meteorol Zeitschrift*. 2013;22(6):711–28.
  128. Souza AP De, Lima L, Zamadei T, Martim CC, Almeida FT De, Paulino J. Classificação Climática E Balanço Hídrico Climatológico No Estado De Mato Grosso in Mato Grosso. *Nativa* [Internet]. 2013;1(1):34–43.

129. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Apoio à Gestão Estadual do SUS. In: CONASS. 2016. p. 177–96.
130. Gerais EDM. EPIDEMIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG. 2014;72:1–79.
131. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância em saúde : zoonoses. Cad Atenção Básica, n 22. 2009 Apr;1(2):224.
132. Halliday JEB, Allan KJ, Ekwem D, Cleaveland S, Kazwala RR, Crump JA. One health: Endemic zoonoses in the tropics: A public health problem hiding in plain sight. Vet Rec. 2015;176(9):220–5.
133. Braga FR, Mendoza De Gives P, Paz Silva A, Soares FEDF, Araújo JV De. Zoonotic neglected tropical diseases: New approaches to combat old enemies. Biomed Res Int. 2014;2014:3–5.
134. Howerth EW, Stallknecht DE, Davidson WR, Wentworth EJ. Survey for leprosy in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) from the southeastern United States . JWildIDis . 1990;26(0090-3558):112–5.
135. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. J Leukoc Biol. 1986;40(5):645–56.
136. WHO. WHOTreatmentGuide.pdf. 1998. p. 28.
137. Alves RRN, Rosa IL. Zotherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. J Ethnopharmacol. 2007;113(3):541–55.
138. Azevedo DA. Common opossum ( *Didelphis marsupialis* Linnaeus , 1758 ): food and medicine for people in the Amazon Common opossum ( *Didelphis marsupialis* Linnaeus , 1758 ): food and medicine for people in the Amazon. 2014;
139. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. Int J Lepr Other Mycobact Dis [Internet]. 2001;69(1):1–12.
140. Truman R, Fine PEM. “Environmental” sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. Lepr Rev [Internet]. 2010 Jun;81(2):89–95.
141. Peres CA. Society for Conservation Biology Effects of Subsistence Hunting on Vertebrate Community Structure in Amazonian Forests Published by : Wiley for Society for Conservation Biology Stable URL :

- <http://www.jstor.org/stable/2641923> Linked references are availab.  
 Conserv Biol. 2000;14(1):240–53.
142. Rosas GKC, Drumond PM. Caracterização da Caça de Subsistência em Dois Seringais Localizados no Estado do Acre (Amazônia, Brasil). Embrapa. 2007;33.
  143. Barriga O, Priago R M, Acha PN. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals Volume III Pan American Sanitary Bureau , Regional Office of the. Pan Am Heal Organ. 2003;III(580):162–5.
  144. Cantlay JC, Ingram DJ, Meredith AL. A Review of Zoonotic Infection Risks Associated with the Wild Meat Trade in Malaysia. Ecohealth. 2017;14(2):361–88.
  145. Silva AL da. Animais medicinais: conhecimento e uso entre as populações ribeirinhas do rio Negro, Amazonas, Brasil. Bol do Mus Para Emílio Goeldi Ciências Humanas [Internet]. 2008;3(3):343–57.
  146. Alves RRN, Oliveira TPR, Medeiros MFT. Trends in Medicinal Uses of Edible Wild Vertebrates in Brazil. Evidence-based Complement Altern Med. 2017;2017.
  147. Brasil. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Diário Of da União. 2012;
  148. Alves RRN, Gonçalves MBR, Vieira WLS. Caça, uso e conservação de vertebrados no semiárido Brasileiro. Trop Conserv Sci [Internet]. 2012;5(3):394–416.
  149. Cajaiba RL, Da Silva WB, Piovesan PRR. Animais silvestres utilizados como recurso alimentar em assentamentos rurais no município de Uruará, Pará, Brasil. Desenvolv e Meio Ambient [Internet]. 2015;34:157–68.
  150. Ruiz-Piña HA, Cruz-Reyes A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(5):613–20.
  151. Arias JR, Naiff R, Ma M, Aa DS. The opossum , *Didelphis ' marsupialis* ( Marsupial ia : Didelphidae ), reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amaion of Brazil as a Basin IM-77 IM-79. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981;75(4):537–41.
  152. Corrêa SHR, Vasconcellos SA, Morais Z, Teixeira ADA, Dias RA, Guimarães MADBV, et al. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Brazilian J Vet

- Res Anim Sci. 2004;41(3):189–93.
153. Jorge S, Hartleben CP, Seixas FK, Coimbra MAA, Stark CB, Larrondo AG, et al. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil. *Acta Trop* [Internet]. 2012 Nov;124(2):147–51.
  154. Rocha MF, Passamani M, Louzada J. A small mammal community in a forest fragment, vegetation corridor and coffee matrix system in the brazilian atlantic forest. *PLoS One*. 2011;6(8).
  155. Albuquerque HG, Martins PF, Pessôa FS, Carvalho T, Luz JL, Raíces DSL, et al. Chec List Mammals of a forest fragment in Cambuci municipality , state of Rio de Janeiro , Brazil. 2013;9(6):1505–9.
  156. Cardia DFF, Camossi LG, Fornazari F, Babboni SD, Teixeira CR, Bresciani KDS. First report of *Strongyloides* sp. (Nematoda, Strongyloididae) in *Lutreolina crassicaudata* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Braz J Biol* [Internet]. 2016;76(4):884–7.
  157. Kirchheimer WF, Storrs EE, Binford CH. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post mortem findings in lepromatoid leprosy in the armadillo. *Int J Lepr* [Internet]. 1972;40(3):229–42.
  158. Gentile R, Cardoso TS, Costa-Neto SF, Teixeira BR, D’Andrea PS. Community structure and population dynamics of small mammals in an urban-sylvatic interface area in Rio de Janeiro, Brazil. *Zoologia* [Internet]. 2018;35:1–12.
  159. Cunha A a., Vieira M V. Age, season, and arboreal movements of the opossum *Didelphis aurita* in an Atlantic rain forest of Brazil. *Acta Theriol (Warsz)*. 2005;50(4):551–60.
  160. Camargo NF de. Uso dos estratos verticais por pequenos mamíferos em formações florestais do Cerrado brasileiro: padrões de diversidade, relação com a disponibilidade de recursos, seleção de hábitat e habilidade de locomoção arborícola das espécies. *Teses e Diss*. 2015;142.
  161. Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health [Internet]. Vol. 35, *Critical Reviews in Microbiology*. 2009. 221-270 p.
  162. KÖRTING KS, FLACH J, GUNTHER, HONSCHA, MARTINEZ AMB DE.

- Hantavirose : Patologia E Registro No Brasil. Vittalle. 2008;20(1):39–50.
163. Hamdan NES, Ng YL, Lee W Bin, Tan CS, Khan FAA, Chong YL. Rodent species distribution and hantavirus seroprevalence in residential and forested areas of Sarawak, Malaysia. *Trop Life Sci Res.* 2017;28(1):151–9.
  164. Navea-Pérez HM, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, Merino-Espinosa G, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol Res.* 2015;114(6):2363–70.
  165. Echchakery M, Chicharro C, Boussaa S, Nieto J, Carrillo E, Sheila O, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. *Parasites and Vectors.* 2017;10(1):1–8.
  166. Caldart ET, Freire RL, Ferreira FP, Ruffolo BB, Sbeghen MR, Mareze M, et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): New evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2017;26(1):17–27.
  167. Durnez L, Eddyani M, Mgode GF, Katakweba A, Katholi CR, Machang'u RR, et al. First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(3):768–73.
  168. Durnez L, Katakweba A, Sadiki H, Katholi CR, Kazwala RR, MacHang'U RR, et al. Mycobacteria in terrestrial small mammals on cattle farms in Tanzania. *Vet Med Int.* 2011;2011.
  169. Cavanagh R, Begon M, Bennett M, Ergon TH, Graham IM, de Haas PEW, et al. *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations: a potential reservoir for pulmonary tuberculosis in humans. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3281–5.
  170. Ayres José Márcio, Ayres C. Aspectos da caça no alto rio Aripuanã. *Acta Amaz.* 1979;9(2):287–98.
  171. Bonaudo T, Le Pendu Y, Albuquerque' N. Caça de animais silvestres na Rodovia Transamazônica Wildlife hunting along the Transamazonian Highway. 2000;338–43.
  172. Deps PD, Alves BL, Gripp CG, Aragao RL, Guedes B, Filho JB, et al.

- Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study . *Indian J Dermatol Venereol Leprol* . 2008;74(0973–3922 (Electronic)):338–42.
173. Kerr LRFS, Kendall C, Sousa CAB de, Frota CC, Graham J, Rodrigues L, et al. Human-armadillo interaction in Ceará, Brazil: Potential for transmission of *Mycobacterium leprae*. *Acta Trop* [Internet]. 2015;152:74–9.
  174. Deps PD, Antunes JMADP, Tomimori-Yamashita J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML Flow test. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(1):86–7.
  175. Abreu MSL, De Oliveira LR. Patterns of arboreal and terrestrial space use by non-volant small mammals in an Araucaria forest of southern Brazil. *An Acad Bras Cienc*. 2014;86(2):807–19.
  176. Vieira EM, de Camargo NF. Uso do espaço vertical por marsupiais brasileiros. *Os Marsupiais do Bras*. 2012;(July):348–66.
  177. Lavania M, Jadhav R, Turankar RP, Singh I, Nigam A, Sengupta U. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015;36:256–61.
  178. Turankar R, Lavania M, Singh M, Sengupta U, Siva Sai K, Jadhav R. Presence of viable *Mycobacterium leprae* in environmental specimens around houses of leprosy patients. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2016;34(3):315.
  179. Mohanty P, Naaz F, Katara D, Misba L, Kumar D, Dwivedi D, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian J Dermatology, Venereol Leprol* [Internet]. 2016;82(1):23.
  180. Prakoeswa CRS, Herwanto N, Wahyuni R, Iswahyudi I, Adriaty D, Agusni I, et al. Genotyping Analysis of *Mycobacterium leprae* isolated in Water Environment of Leprosy Endemic Places in Lamongan, East Java. *KnE Life Sci* [Internet]. 2017;3(6):356.
  181. Arraes MLB de M, De Holanda MV, Lima LNGC, Sabadia JAB, Duarte CR, Almeida RLF, et al. Natural environmental water sources in endemic regions of northeastern Brazil are potential reservoirs of viable

- Mycobacterium leprae*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(12):805–11.
182. Smith P. NINE-BANDED ARMADILLO *Dasybus novemcinctus* Linnaeus, 1758. Mamm Paraguay. 2007;(8):1–30.
183. Capellão RT, Lazar A, Bonvicino CR. Infecção natural por agentes zoonóticos em tatus ( Mammalia : Cingulata ) na América do Sul. Bol Bras Mastozool. 2016;73(AUGUST 2015):23–36.
184. Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Miyamura T, Ishii N. Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. Future Microbiol. 2011;6(10):1151–7.
185. Adami ANDREOLLO N, Freitas dos SANTOS E, Rachel ARAÚJO M, Roberto LOPES L, Adami Andreollo N. Rat's age versus human's age: what is the relationship? ABCD Arq Bras Cir Dig. 2012;25(1):49–51.
186. Kajin M, Cerqueira R, Vieira M V., Gentile R. Nine-year demography of the black-eared opossum *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) using life tables. Rev Bras Zool [Internet]. 2008;25(2):206–13.
187. Brasil MDS. Controle da Hanseníase na Atenção Básica. GUIA PRÁTICO PARA PROFISSIONAIS DA EQUIPE DE SAÚDE DA FAMÍLIA. Bras Ministério da Saúde Secr Políticas Saúde Dep Atenção Básica. 2001;1–86.

## 10. ANEXOS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DE *Mycobacterium leprae* EM ÁREA ENDÊMICA DO CENTRO-OESTE DO BRASIL

**Pesquisador:** Élderson Valois

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 53919116.3.0000.5475

**Instituição Proponente:** Instituto Lauro de Souza Lima

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.457.189

**Apresentação do Projeto:**

O projeto tem formato claro e objetivo. Apresenta uma introdução abrangente sobre o assunto em estudo e justificativa que destaca de forma clara a relevância da pesquisa.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos propostos atendem a realização de um estudo de diversidade genética e epidemiológico, que visa a compreensão da dinâmica de transmissão da hanseníase.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De modo geral, a pesquisa não apresenta riscos aos sujeitos, e por sua vez pode trazer contribuições científicas importantes para o entendimento da transmissão da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos de apresentação obrigatória atendem perfeitamente aos critérios vigentes na resolução 466/12.

**Recomendações:**

Sem comentários.

**Endereço:** Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

**Bairro:** Caixa Postal 3021

**CEP:** 17.034-971

**UF:** SP

**Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3103-5855

**Fax:** (14)3103-5963

**E-mail:** etica@iisl.br

INSTITUTO LAURO DE SOUZA  
LIMA



Continuação do Parecer: 1.457.189

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem comentários.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_667087.pdf	07/03/2016 11:16:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Caso_e_Contatos.doc	07/03/2016 11:14:55	Élderson Valois	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Elderson_Valois.pdf	07/03/2016 11:06:22	Élderson Valois	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/03/2016 11:03:42	Élderson Valois	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BAURU, 18 de Março de 2016

---

**Assinado por:**  
**Ida Maria Foschiani Dias Baptista**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

**Bairro:** Caixa Postal 3021

**CEP:** 17.034-971

**UF:** SP

**Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3103-5855

**Fax:** (14)3103-5963

**E-mail:** etica@iisl.br

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE TRANSMISSÃO DE Mycobacterium leprae EM ÁREA ENDÊMICA DO CENTRO-OESTE DO BRASIL

**Pesquisador:** Élderson Valois

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 53919116.3.0000.5475

**Instituição Proponente:** Instituto Lauro de Souza Lima

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.081.749

**Apresentação do Projeto:**

O presente projeto já obteve aprovação neste CEP sob nº 1.457.189/ CAAE: 53919116.3.0000.5475.

A solicitação atual refere-se a mudança de título sugerida em Banca de qualificação, tratando-se portanto de um projeto de doutoramento.

**Objetivo da Pesquisa:**

Sem comentários

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Sem comentários

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O adendo possui informações claras e objetivas a cerca da solicitação de alteração do título do projeto.

**Recomendações:**

Sem comentários

**Endereço:** Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

**Bairro:** Caixa Postal 3021

**CEP:** 17.034-971

**UF:** SP

**Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3103-5855

**Fax:** (14)3103-5963

**E-mail:** etica@iisl.br

Continuação do Parecer: 3.081.749

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O título inicial era "Avaliação da Dinâmica de Transmissão de Mycobacterium leprae em Área Endêmica do Centro-Oeste do Brasil".

Dessa forma, concluímos pela autorização de alteração para "Detecção molecular da viabilidade de Mycobacterium leprae em animais silvestres e possível associação na manutenção da transmissão da doença em região hiperendêmica da Amazônia meridional", conforme informado ao pesquisador.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme adendo enviado pelo pesquisador para este CEP, o título atual será: "Detecção molecular da viabilidade de Mycobacterium leprae em animais silvestres e possível associação na manutenção da transmissão da doença em região hiperendêmica da Amazônia meridional".

Em reunião ordinária por unanimidade autorizamos a alteração de título.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_126733_8_E1.pdf	29/11/2018 14:43:57		Aceito
Outros	NovoTitulo.pdf	29/11/2018 14:33:03	Élderson Valois	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Caso_e_Contatos.doc	07/03/2016 11:14:55	Élderson Valois	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Elderson_Valois.pdf	07/03/2016 11:06:22	Élderson Valois	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/03/2016 11:03:42	Élderson Valois	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

**Bairro:** Caixa Postal 3021

**CEP:** 17.034-971

**UF:** SP

**Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3103-5855

**Fax:** (14)3103-5963

**E-mail:** etica@iisl.br

INSTITUTO LAURO DE SOUZA  
LIMA



Continuação do Parecer: 3.081.749

BAURU, 13 de Dezembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Ida Maria Foschiani Dias Baptista**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226

**Bairro:** Caixa Postal 3021

**CEP:** 17.034-971

**UF:** SP

**Município:** BAURU

**Telefone:** (14)3103-5855

**Fax:** (14)3103-5963

**E-mail:** etica@iisl.br



**Registro de Expedição**  
**Licença permanente para coleta de material zoológico**

<b>Número: 7270-1</b>	<b>Data da emissão: 01/06/2015 17:22</b>
<b>Número da solicitação: 10987</b>	<b>Data da expedição: 03/06/2015 à 30/11/2015</b>

**Dados do titular**

Nº de Registro: 614211	Nome: Manoel dos Santos Filho	CPF: 383.531.721-00
Instituição : UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO		CNPJ: 01.367.770/0001-30

**Equipe**

#	Nome	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade	*Responsável
1	Patrick Ricardo de Lázari	049.961.489-50	87868605 SSP-PR	Brasileira	Sim

\* O titular será o responsável pela equipe caso não designe alguém para exercer tal função.

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

#	Localidade	UF	Município
1	Fazendas de plantações de soja	MT	SINOP

**Táxons autorizados**

Táxon(s)	
Outros mamíferos	Didelphimorphia, Rodentia







**Registro de Expedição**  
**Licença permanente para coleta de material zoológico**

<b>Número: 7270-1</b>	<b>Data da emissão: 01/06/2015 17:22</b>
<b>Número da solicitação: 10987</b>	<b>Data da expedição: 03/06/2015 à 30/11/2015</b>

**Dados do titular**

Nº de Registro: 614211	Nome: Manoel dos Santos Filho	CPF: 383.531.721-00
Instituição : UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO		CNPJ: 01.367.770/0001-30

\* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**



Protocolo nº \_\_\_\_\_ (uso do CEPA)

Data da Entrega \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (uso do CEPA)

**Interessado: Roberta Vieira de Moraes Bronzoni**

**Unidade: UFMT – Campus de Sinop**

**Departamento/Setor: Hospital Veterinário – Instituto de Ciências da Saúde**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**



**COMPROVANTE DE ENTREGA DE PROTOCOLO DE PESQUISA**  
(uso exclusivo do CEPA)

Protocolo nº \_\_\_\_\_ (uso do CEPA)

Data da Entrega \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (uso do CEPA)

**Rubrica do Funcionário:** \_\_\_\_\_



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Protocolo n.º

PROCOLO PARA USO DE ANIMAIS

**Atenção: este formulário deverá ser preenchido eletronicamente**

1. **Finalidade:**  Pesquisa     Ensino     Controle de qualidade químico/biológico

2. **Data:**                      Início: 01/2015    Término: 11/2016

3. **Pesquisador(es):**

Executor:

Nome do Orientador: Roberta Vieira de Morais Bronzoni – SIAPE: 1737511

Faculdade/Instituto: Instituto de Ciências da Saúde – UFMT – Campus de Sinop

Departamento:

Fax:                              Ramal: 66 3531 1663                      E-mail: robertabronzoni@gmail.com

Colaboradores:

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Canale (UFMT-Sinop)

Prof. Dr. Manoel Santos-Filho (UNEMAT-Cáceres)

Prof. Dr. Marliton Rocha Barreto (UFMT-Sinop)

Prof. Dr. Luiz Tadeu Morais Figueiredo (FMRP-Ribeirão Preto)

Ms. Eriana Serpa Barreto (UFMT-Sinop)

Alexandre Nascimento Faria (UFMT-Sinop)

Ms. Sirlei Franck Thies (UFMT)

Prof. Dr. Carlos Peres (UEA-Inglaterra)

Prof. Dr. Taal Levi. Oregon State University

Agência Financiadora: Global Innovation Initiative

4. **Título do Projeto:**

(em português): Alterações no uso da terra: emergência de doenças infecciosas e parasitárias na Amazônia

(em inglês): Land use change: emerging infectious and parasitic diseases in Amazon

5. **Objetivo(s) da Pesquisa:**

Esta pesquisa tem a finalidade de verificar se o desmatamento e fragmentação florestal aumentam a densidade da população de mamíferos hospedeiros e vetores na Amazônia e consequentemente aumentando o risco de infecções por doenças zoonóticas como Leishmanioses, Arboviroses e Hantaviroses. Para tanto, será realizado o levantamento e determinação da abundância de espécies de animais silvestres e vetores, bem como a pesquisa de *Leishmania*, arbovírus e *Hantavirus* em pequenos mamíferos silvestres, cães domésticos e vetores oriundos de áreas florestais e peri-florestais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



## 6. Equipe do Projeto

### 6.1. Qualificação da equipe

#### Experiência prévia:

Sim       Não

Por quanto tempo: mais de 15 anos      Especificar: Todos os participantes do projeto apresentam renomada experiência em suas respectivas áreas.

#### Treinamento:

Sim       Não

Por quanto tempo: 1 mês.      Especificar: os discentes da equipe (a serem selecionados) serão treinados para a realização dos trabalhos de campo e laboratoriais.

## 7. Informações sobre o Modelo Animal Experimental

### 7.1. Descrição

Espécie utilizada:       Camundongo       Rato       Coelho       Cão  
                                  Hamster       Gerbil       Primata–Não Humano  
                                  Carneiro       Outros Vertebrados: pequenos mamíferos silvestres,  
como roedores e marsupiais.

Linhagem: \_\_\_\_\_

Procedência: municípios de Nova Mutum, Sorriso, Sinop, Cláudia, Marcelândia, União do Sul, Itaúbas, Feliz Natal, Vera e Colíder.

Padrão sanitário do animal na procedência:

Convencional       SPF       Gnobiótico  
 Germe Free       Sem Padrão Sanitário

Sexo:  Macho       Fêmea       Prenhe      Idade: [ qualquer idade ]

Peso: [      ]      Unidade: [ ] g [ X ] kg

Existe planejamento estatístico?       Sim       Não

#### Qual o critério usado para definir o tamanho da amostra?

Sem critério estabelecido

Número de animais/grupo:

Nº de grupos: 2

#### Especificar cada Grupo:

1. Cães domésticos
2. Animais silvestres: pequenos mamíferos

Quantidade total de animais: aproximadamente 300 animais

### 7.2. Condições de manutenção

Local onde será mantido o animal:

Cães domésticos: os animais serão abordados no local de residência.

Animais silvestres serão contidos em gaiolas até a recuperação anestésica.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Número de animais/gaiola: 1 animal/gaiola

Ambiente de contenção:  gaiola  baia  jaula  Outro: \_\_\_\_\_

Especificar dimensões: 70 x 35 x 40cm (6kg); 45 x 17,5 x 15 cm (1Kg)

Tipo de cama:  maravalha  estrado  Outra: \_\_\_\_\_

Água:

Filtrada  Sim  Não  
Clorada  Sim  Não  
Autoclavada  Sim  Não

Alimentação:

Ração industrial  Sim  Não Qual:  
Suplemento  Sim  Não Qual:

Dieta Específica: \_\_\_\_\_  
(especificar)

### 8. Procedimentos Experimentais:

Jejum  Sim  Não Duração: \_\_\_\_\_ (horas)  
Especificar

Restrição hídrica  Sim  Não Duração: \_\_\_\_\_ (horas)  
Especificar

O experimento impedirá o animal de se movimentar?  Sim  Não

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

Justificar: \_\_\_\_\_

Será utilizado pré-anestésico?  Sim  Não  
Acepromazina (5-10 mg/kg), nos animais silvestres

Será utilizado anestésico  Sim  Não  
Quetamina (10-30 mg/kg), nos animais silvestres

Haverá Cirurgia?  Sim  Não

Recuperação pós-cirúrgica  Sim  Não Duração: \_\_\_\_\_ (horas)

Antibiótico  Anti-inflamatório

Dose:

Via e duração da administração: \_\_\_\_\_



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Usará analgésico?

Sim  Não

Dose: \_\_\_\_\_

Via e duração da administração: \_\_\_\_\_

Justificar o não uso do analgésico:

Não há necessidade para a colheita de sangue e *swab* conjuntival nos animais domésticos. Todos os animais silvestres serão anestesiados para a coleta de material.

O experimento é específico para:

Dor  Sim  Não

Estresse  Sim  Não

Anorexia  Sim  Não

**Observação:**

Para qualquer um dos três itens acima envie cópia de 2 (dois) trabalhos referentes a mesma metodologia empregada, preferencialmente de autores não envolvidos nesse projeto.

Resumo do procedimento experimental e justificativa da finalidade do uso de animais em caso de executar experimentos que envolvem dor, estresse ou anorexia:

\_\_\_\_\_

Exposição a agentes químico/físico/biológico/mecânico:

Sim  Não Qual: \_\_\_\_\_  
Especificar

Dose/Tempo: \_\_\_\_\_  
Especificar

Extração de fluídos:

Sim  Não Qual: Sangue de todos os animais

Via: Punção venosa (animais domésticos); Punção cardíaca (animais silvestres)

Volume: 2-5mL

Extração de órgãos:

Sim  Não Qual(is): Somente dos animais silvestres sacrificados (10 machos e 10 fêmeas de cada espécie encontrada/área de coleta). Amostras teciduais de pele, fígado, baço, rim, coração e pulmão.



Inoculação de substâncias, drogas, medicamentos ou outros:

[ ] Sim [ X ] Não Qual: \_\_\_\_\_  
Especificar  
Via: \_\_\_\_\_ Dose/frequência: \_\_\_\_\_  
Especificar Especificar

### 9. Destino dos Animais:

Re-aproveitado [ x ] Sim [ ] Não Como:

Cães domésticos: ficarão com os responsáveis.

Animais silvestres: após coleta de amostra sanguínea, os animais serão marcados (picote na orelha, sob anestesia) e aguardarão recuperação anestésica em gaiola. Após recuperação, serão soltos próximo ao local de captura.

Re-aproveitado [ ] Sim [ X ] Não Como:

Animais silvestres: após coleta de amostra sanguínea, os animais (10 machos e 10 fêmeas de cada espécie encontrada/área de coleta), ainda sob efeito da anestesia geral, serão sacrificados com injeção intravenosa de Cloreto de Potássio (KCl).

### 10. Eutanásia:

[ ] Aprofundamento da anestesia [ X ] Perfusão sob anestesia [ ] Exsangüinação sob anestesia

[ ] CO<sub>2</sub> [ ] Decapitação [ ] Deslocamento cervical

Outros: \_\_\_\_\_ Justificar método: \_\_\_\_\_

### 10. Resumo do Procedimento Experimental:

#### 1. Captura e coleta de amostras clínicas de mamíferos

##### 1.1. Mamíferos silvestres

Pequenos mamíferos serão capturados usando armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman, as quais serão distribuídas ao longo dos transectos. Iscas serão usadas para atrair os animais e serão constituídas de uma mistura de manteiga de amendoim, banana, aveia e bacon. As armadilhas serão visitadas diariamente pela manhã para minimizar o tempo de retenção dos animais. Os pequenos mamíferos serão anestesiados com injeção intramuscular de Quetamina (10-30 mg/kg) combinada com Acepromazina (5-10 mg/kg), na proporção de 9:1. Após coleta de amostra sanguínea, os animais (10 machos e 10 fêmeas de cada espécie encontrada/área de coleta), ainda sob efeito da anestesia geral, serão sacrificados com injeção intravenosa de Cloreto de Potássio (KCl). O restante dos animais será marcado (picote na orelha, sob anestesia) e aguardará recuperação anestésica em gaiola. Após recuperação, o animal será solto próximo ao local de captura. Aproximadamente 2-5 ml de sangue total serão coletados por punção cardíaca. O sangue será coletado em tubo contendo EDTA como solução anticoagulante. Todos os tubos serão identificados e mantidos em estante dentro de caixa isotérmica, a 4°C, do momento da coleta até serem submetidos à centrifugação para separação do plasma. Aliquotas de sangue e plasma serão separadamente armazenadas em tubos tipo *ependorf* estéreis de 1,5 ml e conservadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.



Os animais serão identificados por características morfológicas, análises citológicas e genéticas. Amostras teciduais de pele, fígado, baço, rim, coração e pulmão serão coletados assepticamente e conforme normas preconizadas de biossegurança. As amostras serão armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

### 1.2. Cães domésticos

Os cães domésticos amostrados serão selecionados sob os critérios de viverem livres em fazendas ou habitações humanas em áreas próximas aos pontos escolhidos para capturas de animais silvestres e vetores. Todos serão contidos fisicamente com ajuda e permissão dos proprietários. Será realizado exame clínico para sinais de Leishmaniose, seguido de coleta de amostras clínicas. Os dados individuais dos cães serão anotados.

Aproximadamente 5ml de sangue total serão coletados da veia cefálica ou jugular dos cães domésticos em tubo contendo EDTA como solução anticoagulante. Todos os tubos serão identificados e mantidos em estante em caixa isotérmica, a 4°C, do momento da coleta até serem submetidos à centrifugação para separação do plasma. Aliquotas de sangue e plasma serão separadamente armazenadas em tubos tipo *ependorf* estéreis de 1,5 ml e conservadas a -20°C até o momento do uso.

Amostras da conjuntiva de ambas as oculares dos animais serão obtidas com o auxílio de *swab* microbiológico. Será utilizado um *swab* para cada ocular. A extremidade do *swab* contendo a amostra será cortada e acondicionada em microtubo esterilizado de 1,5 mL. Os microtubos serão acondicionados em isopor até a chegada ao laboratório, onde serão armazenados a -70° C até o momento do uso.

## 2. Testes laboratoriais

### 2.1. Pesquisa de *Leishmania*

Após extração do DNA, *Nested-PCR* será usado para a amplificação do segmento do gene SSUrRNA, conservado entre as espécies de *Leishmania*. Amostras de plasma serão submetidas aos métodos de Teste Rápido (DPP) e ELISA segundo recomendações do Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral e Ministério da Saúde.

### 2.2. Pesquisa de Arbovírus

Grupos de aproximadamente 30 mosquitos serão macerados em solução tamponada contendo antibióticos. Após centrifugação a 3000 rpm a 4° C, durante 10 minutos, a solução será filtrada e acondicionada a -70°C até a realização de testes moleculares e de isolamento viral. O RNA viral será extraído do macerado de mosquitos utilizando, para tanto, o Qiamp Viral RNA Kit (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os métodos de M-N-PCR serão realizados conforme descrito por Bronzoni e colaboradores (2004 e 2005) utilizando *primers* gênero e espécie-específicos para a detecção e identificação de *Alphavirus*, *Flavivirus* e do vírus Oropouche.

Amostras positivas serão testadas no isolamento viral. Para tanto, o macerado de mosquitos será adicionado à cultura de células de *Aedes albopictus* (clone C6/36). As células serão observadas durante 14 dias, após este período, a cultura será colhida e testada por Imunofluorescência usando anticorpos específicos contra *Alphavirus*, *Flavivirus* e vírus Oropouche.

### 2.3. Pesquisa de Hantavírus

Todas as atividades de diagnóstico de Hantavírus serão realizadas em laboratório BSL-3, localizado no Centro de Pesquisas em Virologia da FMRP-Ribeirão Preto, SP. O RNA viral será extraído do pool de órgãos de cada roedor utilizando, para tanto, o método de Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Reações de RT-PCR serão realizadas conforme previamente descrito (Moreli et al., 2004).

### 2.4. Análise dos produtos amplificados

Inicialmente, os produtos amplificados serão analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, após coloração GelRed (Uniscience). As amostras positivas serão purificadas pelo QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA), de acordo com as especificações do fabricante, e encaminhadas para sequenciamento nucleotídico. As sequências obtidas serão comparadas com sequências depositadas no GenBank, utilizando os programas BLASTN e BLASTX ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Os alinhamentos das



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



sequências de nucleotídeos serão feitos com o auxílio dos programas Clustal W. Árvores filogenéticas serão construídas por métodos de máxima verossimilhança PAUP4b10.

**11. Termo de Responsabilidade:**

Eu asseguro à CEPA/UFMT que:

11.1. Li os Princípios Éticos da experimentação Animal elaborado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e concordo plenamente com suas exigências durante a vigência deste protocolo;

11.2. Este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe que participa deste projeto foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos nesse protocolo;

11.3. Comprometo-me a solicitar nova aprovação deste protocolo sempre que ocorra alteração significativa nos experimentos aqui descritos;

11.4. Tudo o que foi declarado nesse protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estou ciente que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de minha total responsabilidade (pesquisador principal) e que estarei sujeito às punições previstas na legislação em vigor.

Nome do Executor:

Nome do Orientador: Roberta Vieira de Moraes Bronzoni

Data: 06/11/2014

Assinatura: \_\_\_\_\_