



**INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS
DE BOTUCATU**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRO-
ORGANISMOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA POR
MEIO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR) EM ANIMAIS
SILVESTRES MORTOS POR ATROPELAMENTO NO
INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Pâmela Merlo Marson

Orientador: Hélio Langoni

Co-orientadora: Virginia Bodelão Richini Pereira

AGOSTO/2016



**INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS
DE BOTUCATU**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRO-
ORGANISMOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA POR
MEIO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR) EM ANIMAIS
SILVESTRES MORTOS POR ATROPELAMENTO NO
INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Pâmela Merlo Marson

Orientador: Hélio Langoni

Co-orientadora: Virginia Bodelão Richini Pereira

Monografia apresentada para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas –
junto ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista Campus de
Botucatu - SP.

AGOSTO/2016

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Marson, Pâmela Merlo.

Detecção e quantificação molecular de micro-organismos de interesse em saúde pública por meio de PCR em tempo real (qPCR) em animais silvestres mortos por atropelamento no interior do Estado de São Paulo / Pâmela Merlo Marson. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Hélio Langoni

Coorientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira

Coorientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Capes: 20100000

1. Biologia molecular. 2. Animais silvestres. 3. Animais Mortos. 4. Epidemiologia molecular. 5. Toxoplasma gondii. 6. Leishmania. 7. Trypanosoma cruzi. 8. Reação em cadeia da polimerase. 9. Saúde pública.

Palavras-chave: Animais atropelados; Eco-epidemiologia; Leishmania spp.; Toxoplasma gondii; Trypanosoma cruzi.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 <i>Leishmania</i> spp.....	7
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.4 Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real	11
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Animais.....	11
3.2. Avaliação molecular	12
3.2.1. Extração de DNA.....	12
3.2.2. Quantificação de DNA	12
3.2.3 PCR convencional e eletroforese.....	12
3.2.4 PCR em tempo real.....	12
4. RESULTADOS	12
4.1. Animais avaliados e amostras coletadas.....	12
4.2 Amplificação do DNA.....	15
4.2.1 PCR convencional e Eletroforese	15
4.2.2 Teste de inibição da PCR.....	16
4.2.3 Quantificação por PCR em tempo real	16
5. DISCUSSÃO	18
6. REFERÊNCIAS	25

RESUMO

Diversos patógenos de importância em saúde pública tiveram origem em animais silvestres. Entretanto, estudos sobre eco-epidemiologia ainda são escassos, uma vez que a utilização desses animais em pesquisas é cada vez mais restrito, fato que dificulta a realização de estudos quanto à distribuição desses patógenos na natureza. As ferramentas moleculares têm-se mostrado altamente sensíveis e específicas e vem sendo cada vez mais empregadas em estudos epidemiológicos de diversos patógenos. O presente estudo quantificou, por meio de PCR em tempo real, patógenos importantes em saúde pública, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*, em exemplares de animais silvestres atropelados. Os dados moleculares obtidos a partir dos animais aqui avaliados, bem como informações sobre a ocorrência do patógeno causando enfermidades em seres humanos, possibilitaram o mapeamento de locais de ocorrência de micro-organismos de interesse em saúde pública. O conhecimento da distribuição desses patógenos permitirá a tomada de medidas preventivas frente a novos casos de infecções.

Palavras Chaves: *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, animais atropelados, eco-epidemiologia, biologia molecular.

ABSTRACT

Many public health important pathogens had their origin on wildlife animals. However, eco-epidemiological studies still remain scarce, once these animals use on researches are more and more restrict, what makes difficult studies about these pathogens' distribution on nature. Molecular tools have shown highly sensitive and specific, increasing their use in epidemiologic studies of many pathogens. The present study quantified through real time PCR, important pathogens of public health concern, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, and *Trypanosoma cruzi*, in road-killed wild animals' specimen. Molecular data obtained from the animals evaluated in this study, as well as the information about the occurrence of the pathogen causing disease in human made it possible to map the place of occurrence of microorganisms of public health interest. The knowledge of distribution of these pathogens will allow that preventive measures when new infection cases occur.

Key words: *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, road-killed wild animals, eco-epidemiology, molecular biology.

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 75% das doenças infecciosas emergentes em humanos são zoonoses. O aumento da interdependência humana com os animais e seus produtos pode ser o fator de risco mais crítico para a saúde humana e bem-estar em relação a doenças infecciosas (American Veterinary Medical Association, 2008).

O aumento populacional humano, a expansão das fronteiras agrícolas e a urbanização afetam o clima, as doenças e as interações homem x animal (Linthicum et al., 2008). O contato do homem com o animal se tornou maior através do desmatamento ocasionado pela agricultura, onde o homem invadiu o habitat silvestre e teve contato maior com diferentes espécies.

Devido ao aumento da população humana há a necessidade de maior produção de alimentos, construção de condomínios e rodovias próximos a áreas de mata, além da prática do eco-turismo, tendo novamente um cenário onde o homem se aproxima cada vez mais do habitat dos animais silvestres. A proximidade geográfica entre o homem e os animais permite o estabelecimento de um agente em outro hospedeiro, inclusive o homem (Brown, 2006), que é um dos fatores relacionados à emergência de doenças infecciosas de caráter zoonótico, além dos fatores de adaptação do agente a tal hospedeiro.

As zoonoses com origem em animais silvestres representam a mais significativa e crescente ameaça para a saúde global e todas as doenças infecciosas emergentes. Das doenças infecciosas emergentes, 60,3% são zoonoses, ou seja, com origem nos animais, sendo 71,8% oriundas de animais silvestres e 52% destas terem surgido na década de 90 (Jones et al., 2008).

1.1 *Leishmania* spp.

As leishmanioses são zoonoses de grande importância em saúde pública que persiste em vários continentes compreendendo principalmente as regiões tropicais e subtropicais. Está amplamente distribuída em 88 países com uma prevalência superior a 12 milhões de pacientes humanos, sendo que 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Who, 2005). Na América Latina, 90% dos casos de leishmaniose visceral são notificados no Brasil (Silva et al., 2010). Isto se deve além do grande território brasileiro e suas diferentes situações

epidemiológicas à notificação dos casos, o que pode não ocorrer em relação a outros países latino-americanos.

As leishmanioses cutâneas inclui um grupo de doenças comumente referidas por suas características clínico-patológicas como forma cutânea, cutâneo-mucosa e cutâneo difusa e no Velho Mundo são causadas pelas seguintes espécies: *Leishmania* (*Leishmania*) *tropica*, na Bacia do Mediterrâneo, Próximo e Médio Oriente, Ásia Central, Paquistão e Índia; *L. (L.) major* de distribuição rural na Ásia Central, Índia, Paquistão, Oriente Médio e Norte da África; *L. (L.) aethiopica* na África. No continente americano encontram-se, as espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *Leishmania(V.) lindenberg* e *L. (L.) amazonensis*. Também são conhecidas as espécies que raramente acomete o homem *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) colombiensis* e *L. (V.) naiffi* e outras espécies que até agora não são patogênicas ao homem *L. enrietti*, *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. sristidesi* e *L. forattinii* (Rey, 2001).

As espécies que causam leishmaniose visceral (LV) são: *L. donovani* e *L. infantum* (syn. *chagasi*). Estima-se que a cada ano 500.000 novos casos de LV e mais de 50.000 mortes, uma taxa que é somente superada pela malária entre as enfermidades causadas por parasitas (Mauricio et al., 2000; Lukes et al., 2007; WHO, 2010).

A espécie *L. donovani* é encontrada na África oriental e na Índia sendo caracterizada por infectar todos os grupos da população e a espécie *L. infantum* (syn. *chagasi*) é encontrada em parte do continente asiático, africano e europeu. Estudos recentes demonstram que no Novo Mundo, a espécie envolvida é *L. infantum* (syn. *chagasi*), foi importada da Europa durante a colonização portuguesa e espanhola. Essa espécie possui algumas características bioquímicas e moleculares semelhantes, tais como a existência para ambas de canídeos como reservatórios silvestres e domésticos, a prevalência maior da doença em crianças e imunossuprimidos e a semelhança da doença observada no homem e no cão (Kuhls et al. 2011, Leblois et al. 2011)

A transmissão da leishmaniose ocorre pela picada de fêmeas infectadas do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (Diptera: *Psychodidae*; *Phlebotominae*), com *Lutzomyia longipalpis* sendo o mais importante vetor do parasita no Brasil em hospedeiros susceptíveis como o homem e os cães. A transmissão ocorre enquanto houver o parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro (Brasil, 2005).

Até meados da década de 70 a LV era considerada uma enfermidade primariamente rural ou silvestre, mas nos últimos anos observou-se sua urbanização,

expansão de áreas endêmicas e aparecimento de novos focos (FUNASA, 2002; Brasil, 2006). Diversas modificações ambientais de origem natural ou antrópica colocaram o cão e o homem como alternativas mais acessíveis ao vetor e proporcionaram essa clara mudança na ecoepidemiologia da doença.

1.2 *Trypanosoma cruzi*

Desde o tempo da descrição do *Trypanosoma cruzi* e da doença de Chagas, muitos estudos tem tentado correlacionar as subpopulações distintas do parasita com espécies de mamíferos ou de insetos hospedeiros, a evolução da doença humana e / ou distribuição geográfica, mas, até agora, estas questões continuam em aberto (Miles et al., 1978, 1981).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* da família *Trypanosomatidae*, e ocorre no Continente Americano. Sua transmissão ocorre através de um vetor, o inseto *Triatoma infestans*, mais conhecido no Brasil como barbeiro. Seu ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros mamíferos, além de insetos comumente chamados barbeiros. Nos barbeiros, o *T. cruzi* multiplica-se no tubo digestório, sendo as formas infectantes eliminadas com suas fezes e urina, que uma vez depositadas perto da picada do inseto, podem entrar na circulação do vertebrado. No hospedeiro vertebrado, circula no sangue e sofre multiplicação nos tecidos (Coura, 2003). Outras formas de transmissão conhecidas estão, além da transmissão vetorial, a transmissão por transfusão sanguínea (Fong et al., 2014); por transplante de órgãos sólidos, ocorrendo principalmente em países não endêmicos para a tripanossomíase (Huprikar et al, 2013); por transmissão congênita (Carlier et al, 2015); por acidentes laboratoriais (Herwaldt, 2001); e a infecção transmitida pela ingestão de alimentos contaminados com fezes e/ou urina contendo as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Barbosa et al, 2012; Nóbrega et al, 2009; Souza-Lima et al, 2013; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012). O *Trypanosoma cruzi* é amplamente distribuído na América Latina e considerado um parasita eclético que circula em ambientes silvestres, peridomiciliares e doméstico (Garcia et al., 2007). Estudos epidemiológicos mostram a grande suscetibilidade do homem, do cão e gato. A modificação ambiental antrópica, principalmente a substituição da floresta natural por terra cultivada, passou a constituir um problema, ou seja, houve a domiciliação dos vetores, deslocados de seus ecótopos silvestres originais e também a adaptação de vertebrados silvestres, como os marsupiais e roedores a ecótopos artificiais (Walter, 2003). A importância dos

mamíferos no ciclo silvestre do *T. cruzi* é destacada por vários autores (Wells et al., 1981; Fujita et al., 1994; Cortez et al., 2006), sendo importante conhecer como os animais silvestres contribuem para a manutenção da endemia e a sua participação na transmissão para o homem.

Apesar de muitos estudos terem sido conduzidos em relação ao agente da Doença de Chagas, ainda pouco se sabe sobre o real papel dos animais silvestres na epidemiologia desta importante zoonose.

1.3 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* pertencente à família *Sarcocystidae* e de grande importância mundial. Tem como hospedeiro definitivo os felídeos domésticos e silvestres (Silva et al., 2001), em cujos intestinos tem a capacidade de reprodução sexuada para a eliminação de oocistos não esporulados, os quais, ao chegar ao ambiente em condições favoráveis de temperatura, umidade e oxigenação, esporulam tornando-se infectantes. A maioria dos mamíferos serve como hospedeiro intermediário, inclusive o homem, sendo uma doença infecciosa congênita ou adquirida (Urquhart et al., 1996).

Os susceptíveis podem se infectar pela ingestão de oocistos esporulados, sendo a única forma de transmissão para herbívoros (Langoni et al., 2001), e no caso de humanos, diretamente a partir das mãos contaminadas ou pela ingestão de água e alimentos também contaminados com oocistos (Hill e Dubey, 2002). Outra possibilidade é a ingestão de bradizoítos presentes na carne de hospedeiros intermediários, consumida mal cozida ou crua (Urquhart et al., 1996). A transmissão congênita acontece quando há infecção durante a gestação, pois a forma taquizoítica do agente atravessa a membrana placentária difundindo-se nos tecidos fetais com sérias consequências como aborto, hidrocefalia, retinocoroidite, entre outras alterações (Palmer et al., 1998).

Diversos estudos de soroprevalência de toxoplasmose foram realizados com animais silvestres, incluindo: felídeos (Silva et al., 2001; Ullmann et al., 2010), tatus (Silva et al., 2006), primatas não-humanos (Garcia et al., 2005), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (Aubert et al., 2010), entre outros. Porém, todos os estudos foram sorológicos e nenhum estudo foi realizado utilizando a técnica de PCR em tempo real.

1.4 Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

Os avanços da biologia molecular e a utilização de suas técnicas contribuem para o melhor entendimento dos estudos epidemiológicos e filogenéticos de parasitas importantes em saúde pública. As técnicas moleculares podem ser utilizadas na identificação e tipagem de patógenos, por técnicas como PCR (reação em cadeia da polimerase).

O surgimento da reação em cadeia de polimerase em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) promoveu um avanço no diagnóstico, uma vez que essa técnica é capaz de quantificar a carga parasitária (Kaltenboeck & Wang, 2005; Quaresma et al., 2009). Esse sistema é baseado no uso de fluoróforos ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento em tempo real do produto amplificado. Um fluoróforo bastante utilizado é o intercalante de DNA SYBR Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Desta forma, o presente estudo contribuirá não somente para a verificação do parasita nos animais, assim como possibilitará a utilização de técnicas quantitativas na detecção dos agentes.

2. OBJETIVOS

Quantificar, por meio de PCR em tempo real, a infecção com micro-organismos causadores de doenças de interesse em saúde pública, em exemplares de animais silvestres atropelados em rodovias da região centro-oeste do estado de São Paulo. Para tanto escolhemos os seguintes micro-organismos de interesse em saúde pública: *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram coletados 86 animais silvestres mortos por atropelamento de diversas espécies: *Callithrix penicillata*, *Cavia aperea*, *Cebus apella*, *Cerdocyon thous*, *Dasypus novemcinctus*, *Dasypus septemcinctus*, *Didelphis albiventris*, *Eira barbara*, *Euphractus sexcinctus*, *Galictis vittata*, *Hydrochoerus hydrochaeris*, *Leopardus tigrinus*, *Lepus europaeus*, *Lutreolina crassicaudata*, *Mazama gouazoubira*, *Myocastor coypus*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Procyon cancrivorus*, *Puma concolor*, *Rattus rattus*, *Sphiggurus spinosus* e *Tamandua tetradactyla*. Os animais foram necropsiados e

fragmentos dos tecidos foram congelados a -80°C . Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Instituição (nº 211/2008).

3.2. Avaliação molecular

3.2.1. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de tecidos dos animais foram realizadas utilizando-se o Kit Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation (GE Healthcare – Amersham Biosciences), segundo instruções do fabricante. O DNA foi estocado a -70°C e utilizado nos experimentos.

3.2.2. Quantificação de DNA

A quantificação foi avaliada em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e obtidos valores em nanogramas por microlitros (ng/uL).

3.2.3 PCR convencional e eletroforese

A amplificação do DNA foi realizada com os *primers* já descritos na literatura para *Leishmania* spp. da região ITS1 do DNA ribossomal LITSR e L5.8S (El Tai et al., 2001).

3.2.4 PCR em tempo real

Para a determinação da carga parasitária foi utilizado o sistema SYBR®Green, por meio do equipamento StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de ATTC em uma diluição seriada nas concentrações decrescentes de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 parasitas/mL. O número de parasitos por grama de tecido foi obtido pela fórmula $(\text{FN} \times 1000)/80$, onde o fator de normalização (FN) foi obtido por: $(\text{Concentração de DNA da curva-padrão} / \text{Concentração de DNA da amostra}) \times \text{número de amplicons na amostra}$. Inicialmente foram utilizados os *primers* já utilizados no nosso laboratório para *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

4. RESULTADOS

4.1. Animais avaliados e amostras coletadas

Foi realizada a avaliação de 86 amostras de animais silvestres atropelados encontrados mortos em beira de estrada, como mostra a tabela 1.

Animal	ordem	família	Espécie	Nome popular	sexo	Localização geografica	Órgãos coletados
A1	Carnivora	Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i>	mão-pelada	M	22° 59'46.02''S 47° 27' 50.61''W	P, F, R, C, L.M.
A2	Rodentia	Erethizontidae	<i>Sphiggurus spinosus</i>	ouriço cacheiro	F	23° 01' 53.00''S48° 04' 53.19''W	P, F, B, R, C.
A3	Rodentia	Cavidae	<i>Cavia aperea</i>	preá	M	22° 56' 39.26''S48° 23' 10.64''W	P, F, B, R, C, L.M., A.
A4	Carnivora	Canidae	<i>Cerdocyon thous</i>	cachorro-do-mato	M	23° 02' 46.85''S48° 31' 14.66''W	P, F, B, R, C, L.M., L.SUBM.
A5	Carnivora	Mustelidae	<i>Galictis vittata</i>	furão	M	22° 50' 16.64''S48° 30' 58.44''W	P, F, B, R, C.
A6	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22° 51' 02.34''S48° 30' 00.43''W	P, F, B, R, C, L.M.
A7	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22° 56' 35.64''S48° 23' 01.33''W	P, F, B, R, C.
A8	Carnivora	Mustelidae	<i>G. vittata</i>	furão	M	23° 01' 58.08''S48° 04' 14.68''W	P, F, B, C.
A9	Carnivora	Procyonidae	<i>P. cancrivorus</i>	mão-pelada	M	22° 50' 51.83''S48° 30' 09.69''W	P, F, B, R, C, L.M.
A10	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	#	22° 53' 36.49''S48° 28' 35.76''W	P, F, B, R, C, L.M.
A11	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	F	22° 54' 02.20''S48° 29' 25.11''W	P, F, B, L.M.
A12	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>D. albiventris</i>	gambá	F	22° 43' 01.56''S48° 20' 29.14''W	P, F, B, L.M.
A13	Carnivora	Mustelidae	<i>Eira barbara</i>	irara	M	22° 49' 10.08''S48° 25' 40.03''W	P, F, B, C, L.M.
A14	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	tatu galinha	F	23° 00' 46.64''S48° 30' 28.59''W	P, F, B, R, C, L.M.
A15	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço cacheiro	M	23° 00'35.78''S 48° 30' 00.28''W	P, F, R.
A16	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22° 46' 18.17''S48° 32' 25.74''W	P, B, C, L.M.
A17	Rodentia	Cavidae	<i>C. aperea</i>	preá	M	22° 36' 19.20''S48° 09' 50.93''W	P, F, C, L.M.
A18	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus septemcinctus</i>	tatu 7 bandas	M	22° 01' 55.25''S48° 31' 02.13''W	P, F, B, R, C, L.M.
A19	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	#	23° 02' 14.35''S48° 30' 59.53''W	P, F, B, R, C, L.M.
A20	Rodentia	Cavidae	<i>C. aperea</i>	preá	F	23° 01' 38.64''S48° 05' 18.57''W	P, F, B, R, C, L.M.
A21	Cingulata	Dasypodidae	<i>D. novemcinctus</i>	tatu galinha	#	23°04'00.58''S 47°36'24.50''W	P, C.
A22	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço-cacheiro	#	22°59'52.91''S 47°27'16.02''W	P, F, B, R, C.
A23	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá mirim	M	23°02'38.94''S 48°31'10.59''W	P, F, B, C, L.M.
A24	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço-cacheiro	F	22°49'58.71''S 48°25'24.75''W	F, B, R, C, L.M.
A25	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	F	22°50'16.00''S 48°25'18.58''W	P, F, B, C.
A26	Cingulata	Dasypodidae	<i>D. novemcinctus</i>	tatu galinha	M	22°53'09.20''S 48°27'35.59''W	P, F, B, R, C, L.M.
A27	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°58'38.55''S 47°20.59.12''W	P, F, B, C, L.M.
A28	Carnivora	Procyonidae	<i>P. cancrivorus</i>	mão-pelada	#	22°43'20.41''S 48°37'49.99''W	P, F, R, C.
A29	Carnivora	Felidae	<i>Puma concolor</i>	onça-parda	#	22°40'51.76''S 48°40'55.80''W	P, F, C.
A30	Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama gouazoubina</i>	Veado catingueiro	M	22°53'28.87''S 48°28'26.63''W	P, F, B, R, C, L.M.
A31	Primata	Cebidae	<i>Cebus apella</i>	macaco-prego	#	23°05'00.57''S 48°36'22.38''W	P, F, B, R, C, L.M.
A32	Lagomorpha	-	-	lebre	#	22°52'41.12''S 48°28'54.19''W	P, F, B, C, L.M.
A33	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>D. albiventris</i>	gambá	M	22°53'22.06''S 48°29'18.76''W	P, F, B.
A34	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	cuíca	M	22°53'25.52''S 48° 28'24.73''W	P, F, B.
A35	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>L. crassicaudata</i>	cuíca	M	22°53'28.55''S 48° 29'29.25''W	P, F, B, L.M.
A36	Rodentia	Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	ratão-do-banhado	M	22°55'53.74''S 48°24'57.55''W	F.
A37	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	22°55'57.01''S48°20'34.05''W	P, F, B, L.M.
A38	Cingulata	Dasypodidae	<i>Euphractus sexcinctus</i>	tatu-peba	M	22°46'8.09''S48° 33'45.80''W	P, F, B, R, C, L.M., A.
A39	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>M. tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	F	23°1'51.18''S 48°30'47.26''W	F, B.
A40	Primata	Callitrichidae	<i>Callithrix penicillata</i>	sagui	M	22°19'35.40''S48°57'42.06''W	P, F, B, L.M.
A41	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°19'26.41''S48°57'41.95''W	F, B, L.M.
A42	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	22°56'55.51''S48°15'29.35''O	P,F,B,L.M.,C,Ce,R
A43	Carnivora	Felidae	<i>Leopardus trigrinus</i>	gato do mato	F	22°43'39.95''S48°22'40.12''O	P, F, B, L.M.,C,Ce,R.
A44	Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado catingueiro	M	22°48'35.15''S48°08'33.45''O	P,F,B,L.M.,R,A,C,Ce

A45	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	M	22°51'38.70''S48°09'59.69O	P,F,B,L.M.,R,C,Ce
A46	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	M	22°53'35.49''S48°26'48.50''O	P,F,B,R,Ce
A47	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	M	22°53'13.75''S48°26'39.79''O	P,F,B,R,Ce
A48	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	M	22°53'17.01''S48°26'35.90''O	P,F,B,R,Ce
A49	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	23°31'23.71''S47°26'03.64''O	R,F,B
A50	Rodentia	Hydrochaeridae	<i>Hydrochoerus hydrochoeris</i>	capivara	F	22°38'21.12''S48°34'00.96''O	P,F,B,R,C,L.M.
A51	Rodentia	Hydrochaeridae	<i>Hydrochoerus hydrochoeris</i>	capivara	F	22°38'21.12''S48°34'00.96''O	P,F,B,R,L.M.,C
A52	Rodentia	Muridae	<i>Rattus rattus</i>	Rato preto	M	22°53'30.14''S48°26'57.59''O	R
A53	Rodentia	Muridae	<i>Rattus rattus</i>	Rato preto	M	22°53'30.15''S48°26'56.98''O	P, F, B, L.M.,C, R
A54	Carnívora	Canidae	<i>Cercopithecus thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°45'20.70''S47°51'43.38''O	P,F,B,L.Subm.,C
A55	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	22°56'56.56''S48°14'59.95''O	P,F,B,L.M.,R,C,Ce
A56	Lagomorpha	Leporidae	<i>Lepus europaeus</i>	lebre	M	22°43'28.63''S48°01'18.41''O	P,F,L.M., R,C
A57	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	M	22°53'27.65''S48°29'14.05''O	P,F,B,R,C,Ce
A58	Carnívora	Canidae	<i>Cercopithecus thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°46'44.49''S48°07'07.56''O	P,F,C,Ce
A59	Carnívora	Canidae	<i>Cercopithecus thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°47'28.34''S48°08'00.47''O	P,F,B,R, C, Ce
A60	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	22°56'41.09''S48°17'24.83''O	P,F,B,R,C,L.M.
A61	Lagomorpha	Leporidae	<i>Lepus europaeus</i>	lebre	F	22°43'48.83''S47°48'47.66''O	P,F,B,L.M.,C,Ce
A62	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	M	22°41'52.51''S47°40'23.01''O	F,B,R, C, Ce
A63	Rodentia	Caviidae	<i>Cavia aperea</i>	preá	M	22°31'29.20''S47°46'05.74''O	P,F,B, R,C
A64	Lagomorpha	Leporidae	<i>Lepus europaeus</i>	lebre	F	22°45'08.46''S47°51'39.11''O	P,F,B, R, C,Ce
A65	Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	veado catingueiro	-	Região Jaboticabal	P,F,B,L.M.,R,C
A66	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	-	Região Jaboticabal	P,F,B,L.M.,R,C
A67	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	M	Jaboticabal	P,F,B,L.M.,R,C
A68	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	F	Jaboticabal	P,F,B,L.M.,R,C
A69	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	F	Jaboticabal	P,F,B,L.M.,R,C
A70	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	F	Monte Alto	P,F,B,L.M.,R,C
A71	Carnívora	Canidae	<i>Pseudalopex vetulus</i>	Raposa do campo	M	Araraquara	P,F,B,L.M.,R,C
A72	Carnívora	Canidae	<i>Pseudalopex vetulus</i>	Raposa do campo	F	Sertãozinho	P,F,B,L.M.,R,C
A73	Carnívora	Felidae	<i>Leopardus tigrinus</i>	gato do mato	M	Taquaritinga	P,F,B,L.M.,R,C
A74	Primata	Cebidae	<i>Callicebus personatus</i>	Macaco saua	F	Sta. Rita Passa 4	P,F,B,L.M.,R,C
A75	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	Taquaritinga	P,F,B,L.M.,R,C
A76	Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado catingueiro	F	Ribeirão Preto	P,F,B,L.M.,R,C
A77	Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado catingueiro	M	Ribeirão Preto	P,F,B,L.M.,R,C
A78	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	tatu galinha	M	Ribeirão Preto	P,F,B,L.M.,R,C
A79	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	Cuíca	M	Taquaritinga	P,F,B,L.M.,R,C
A80	Primata	Atelidae	<i>Alouatta spp.</i>	Bugio	M	Jaboticabal	P,F,B,L.M.,R,C
A81	Carnívora	Canidae	<i>Cercopithecus thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°53'27.09''S 48°29'31.62''O	P,F,B,L.Subm.,R,C
A82	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	Cuíca	M	22°53'27.52''S 48°29'28.73''O	P,F,B,L.M.,R,C,A
A83	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço cacheiro	M	22°52'54.29''S 48°29'08.77''O	P,F,B,L.M.,R,C
A84	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	Gambá	M	22°53'14.83''S 48°29'43.89''O	P,F,B,L.M.,R,C,L.Subm
A85	Pilosa	Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	22°56'40.08''S 48°17'23.69''O	P,F,B,L.M.,R,C
A86	Carnívora	Felidae	<i>Puma concolor</i>	onça-parda	F	23°06'44.51''S48°16'23.50''O	P,F,B,L.M.,R,C, L.Subm

Tabela 1: órgãos coletados P = Pulmão, F = fígado, B = Baço, L.M = Linfonodo mesentérico, R = Rim, C = Coração, L. Subm. = Linfonodo Submandibular, Ce = Cérebro;

4.2 Amplificação do DNA

4.2.1 PCR convencional e Eletroforese

Foi realizada a PCR convencional para a triagem do material que foi submetido a PCR em tempo real (apenas os positivos). Os dados das amostras dos animais positivos para PCR convencional e seus agentes estão na tabela 2.

Tabela 2: Quantificação de DNA e PCR das amostras positivas de animais silvestres atropelados para *T. gondii*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp. e *Leishmania chagasi*.

Amostras	Quantificação DNA	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania</i> spp.	<i>Leishmania chagasi</i>
A1 – Rim	231ng	-	-	+	-
A2 – Pulmão	59ng	+	-	-	-
A2 – Baço	98ng	+	-	-	-
A2- Rim	187ng	+	-	-	-
A4 - Coração	101ng	-	-	-	-
A4 – L. Mesen	65ng	-	-	-	-
A6 – Baço	45ng	-	-	+	-
A6 – Coração	33ng	-	-	+	-
A7 – Coração	97ng	-	-	+	-
A9 – Rim	30ng	+	-	-	-
A10 –Coração	35ng	+	-	-	-
A17 –Coração	54ng	-	-	+	-
A18 – Fígado	315ng	-	-	+	-
A22 – Fígado	124ng	-	-	+	-
A22 – Baço	190ng	-	-	+	-
A23 – Pulmão	37ng	-	-	+	-
A23 – Fígado	236ng	-	-	+	-
A23- L.Mesen	68,5ng	-	-	+	-
A24 – Fígado	362ng	+	-	+	-
A24 – Baço	877ng	-	-	+	-
A24 – Rim	463ng	-	-	+	-
A24- L.Mesen	175ng	+	-	-	-
A24 –Coração	1000ng	-	-	+	-
A25- Fígado	27ng	+	-	-	-
A35 -L. Mesen	413ng	+	-	-	-
A37- Baço	299ng	+	-	-	-
A39 – Pulmão	931ng	+	-	-	-
A39 – Fígado	683ng	+	-	-	-
A39 -L. Mesen	905ng	+	-	-	-
A39 –Coração	506ng	+	-	-	-
A39 – Rim	599ng	+	-	-	-
A41 -L. Mesen	11ng	-	-	+	-
A41- Fígado	45ng	-	-	+	-
A42 – Pulmão	75ng	+	-	+	-
A42 – Fígado	79ng	+	-	-	-
A42 – Baço	120ng	+	-	-	-
A42 -L. Mesen	127ng	+	-	+	+
A42- Coração	161ng	+	-	+	-
A42 – Rim	112ng	+	-	+	-
A46 – Fígado	159ng	+	-	+	-
A46 – Baço	57ng	-	-	+	-
A46 – Rim	24ng	-	-	+	-
A47 – Pulmão	23ng	-	-	+	-
A50 – Pulmão	23ng	-	-	+	-
A52-Rim	35ng	-	-	-	-
A53-Rim	83ng	-	-	-	-
A54 – Pulmão	26ng	-	-	+	-

A54 – Baço	74ng	-	-	+	-
A60 – Pulmão	22ng	+	-	+	-
A65 – Fígado	14ng	-	+	-	-
A70 – Pulmão	139ng	+	-	-	-
A70 -L. Mesen	511ng	+	-	-	-
A70 - Adrenal	82ng	+	-	-	-
A71- L. Mesen	95ng	-	-	+	+
A71 – Pulmão	27ng	-	-	+	-
A71 – Baço	19ng	-	-	+	-
A72 – Pulmão	305ng	-	-	+	-
A72 – Fígado	101ng	-	-	+	-
A72 – Baço	133ng	-	-	+	-
A76- Coração	27ng	-	+	-	-
A78 – Pulmão	241ng	+	-	-	-
A81 - L. Subm	21ng	-	-	+	-
A81-Rim	44ng	-	-	-	-
A83-Pulmão	44ng	-	-	+	+
A83-Fígado	445ng	-	-	+	+
A83-Baço	447ng	-	-	+	+
A83-Coração	130ng	-	-	+	+
A83-L.subm	247ng	-	-	+	+
A84-Fígado	19ng	+	-	-	-
A85-Pulmão	70ng	-	-	+	-
Total de Amostras		28	2	42	7
Total de Animais		14	2	20	3

4.2.2 Teste de inibição da PCR

Todas as amostras de DNA de tecido animal com resultado negativo para PCR foram amplificadas com controle de DNA positivo do micro-organismo de interesse. Houve amplificação em todas as amostras avaliadas, comprovando que nas amostras não haviam inibidores interferindo no processo.

4.2.3 Quantificação por PCR em tempo real

Nas figuras 1 a 4 estão representadas as quantificações por PCR em tempo real para os micro-organismos analisados em amostras de tecido dos animais silvestres mortos por atropelamento segundo os órgãos avaliados.

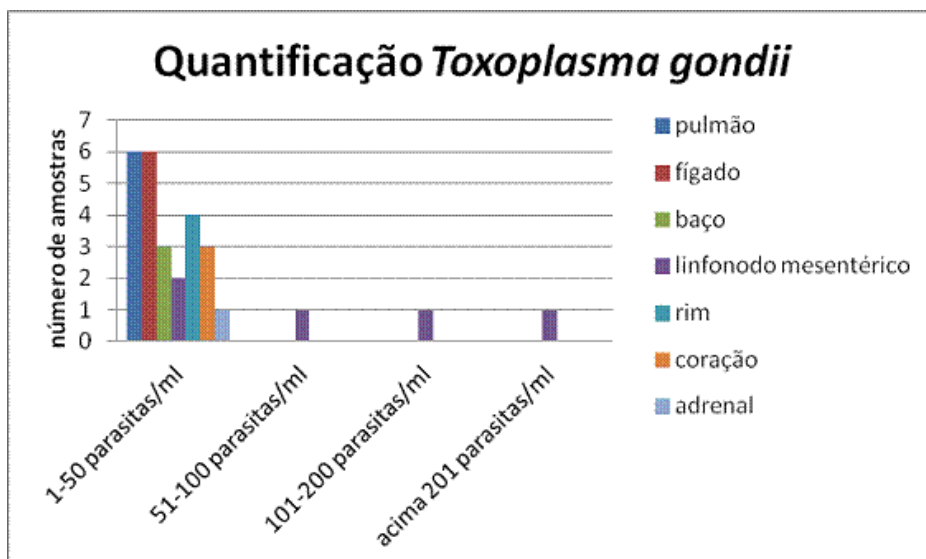


Figura 1: Distribuição das 28 amostras positivas segundo a quantificação de DNA de *T.gondii* em cada órgão.

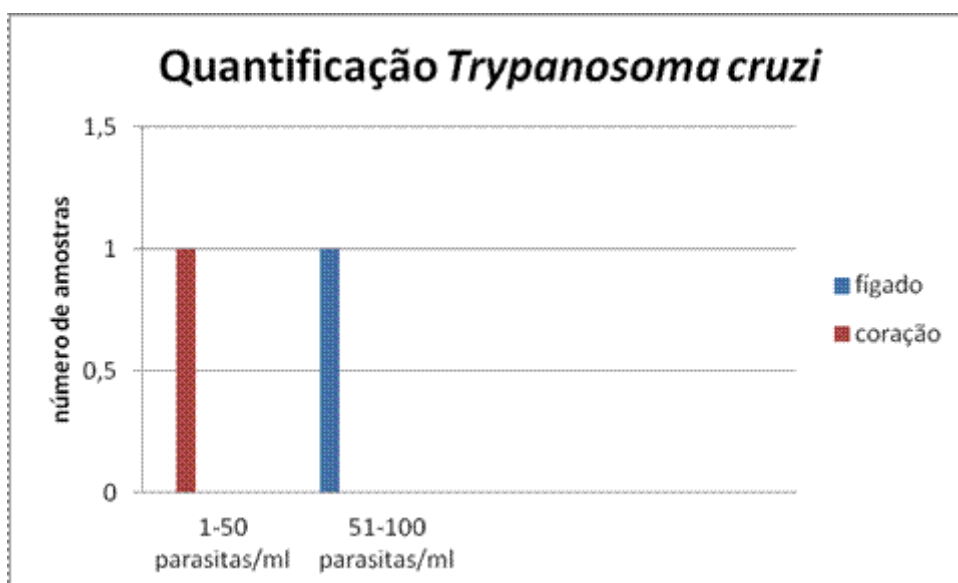


Figura 2: Distribuição das 2 amostras positivas segundo a quantificação de DNA de *T.cruzi* em cada órgão.

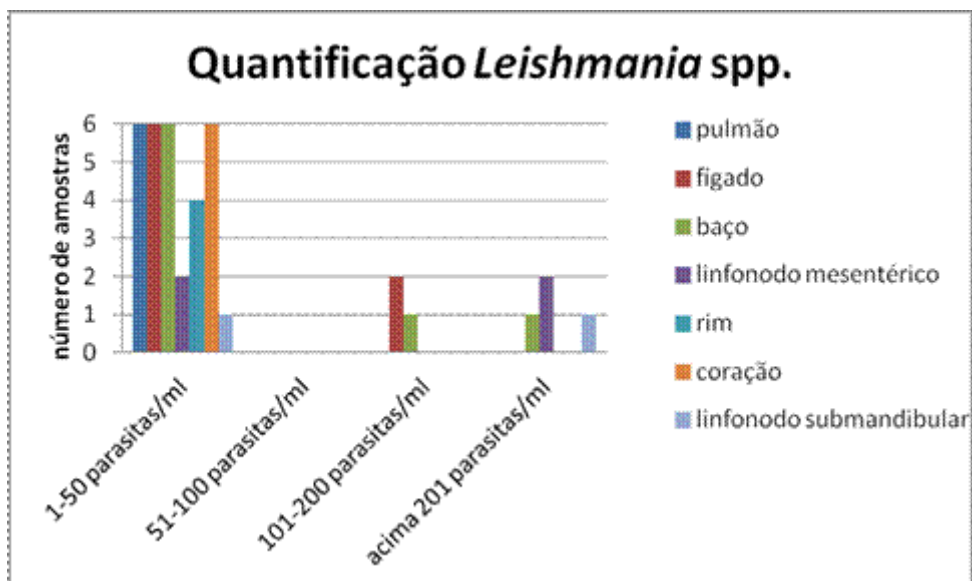


Figura 3: Distribuição das 42 amostras positivas segundo a quantificação de DNA de *Leishmania* spp. em cada órgão.

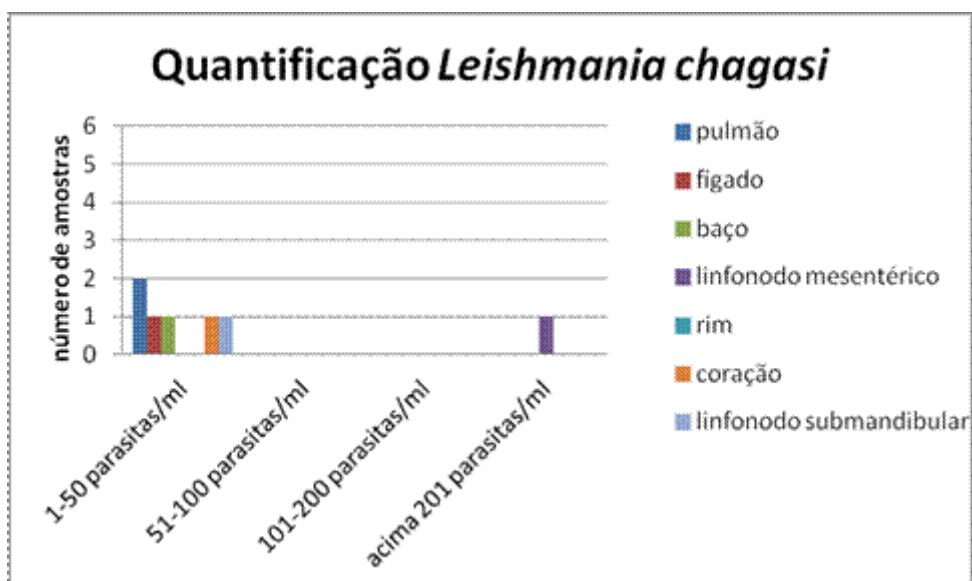


Figura 4: Distribuição das 7 amostras positivas segundo a quantificação de DNA de *L. chagasi* em cada órgão.

5. DISCUSSÃO

O atropelamento de animais silvestres em beiras de estradas, embora seja um problema atual de preservação, representa um grande potencial para estudos eco-epidemiológicos de patógenos. No presente estudo, foram coletados 86 exemplares de animais silvestres mortos por atropelamento. A utilização dos animais silvestres

atropelados para detecção molecular de micro-organismos representa uma alternativa viável para o uso de animais em pesquisas.

Vários estudos relatam a presença de *T. gondii* em roedores silvestres e domésticos, membros das ordens Carnivora, Didelphimorphia e Xenarthra (Dabritz et al., 2008, da Silva et al., 2008; Al-Kappany et al., 2010; Aubert et al., 2010; Jittapalapong et al., 2010; Yin et al., 2010; Costa et al., 2012), da mesma forma que *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres, incluindo roedores, carnívoros, primatas e marsupiais (Alexander et al., 1998; Travi et al., 1998; Curi et al., 2006; Luppi et al., 2008; Papadogiannakis et al., 2010).

A importância dos mamíferos no ciclo silvestre do *T. cruzi* é destacada por vários autores (Wells et al., 1981; Fujita et al., 1994; Cortez et al., 2006). Foram avaliados 5 exemplares da Ordem Artiodactyla, Família Cervidae, espécie *Mazama gouzoubira*. Esta espécie tem porte mediano, pesando entre 17 a 23 Kg, vivendo em florestas, matas de galeria, bordas de mata, campos, cerrados, caatingas e áreas alteradas com vegetação de capoeira. No nosso estudo foi possível a detecção molecular de amostras de apenas 2 animais positivos da mesma espécie (*Mazama gouzoubira* – veado catingueiro) da região de Ribeirão Preto e Jaboticabal. Este fato pode ser devido principalmente a região de Botucatu não ser endêmica para o patógeno ou características ambientais que proporcionaram a diminuição da população de triatomíneos.

Das espécies analisadas da Ordem Carnívora, foram avaliados 13 exemplares da espécie *C. thous* (cachorro-do-mato). Estes animais podem ser encontrados em vários tipos de ambiente, do cerrado à Mata Atlântica (Nowak, 1999) e sua abundância é devida, em parte, ao seu hábito alimentar generalista, preferencialmente noturno, deslocando-se por trilhas, em bordas de mata e sobrevivendo em áreas degradadas e antrópicas (Rocha et al., 2004). Podem ser observados frequentemente em beiras de estradas à procura de alimentos como os restos de outros animais atropelados, por esse motivo o *C. thous* é a espécie de carnívoro que apresenta elevado índice de atropelamento (Marinho-Filho, 1992; Vieira, 1996; Pinowski, 2005; Cherem et al., 2007). No presente estudo, esta espécie foi a mais encontrada. Foi possível detectar DNA de *T. gondii* em amostra de dois exemplares. Na literatura encontramos resultados semelhantes quanto à positividade, porém utilizando o método sorológico. Catenacci et al. (2010) realizaram sorologia para *T. gondii* em amostras de 52 *C. thous*, verificando positividade em 10 (19,2%) amostras para anticorpos anti *T. gondii*, já Gennari et al.

(2004) encontraram 60% de positividade em amostras de animais provenientes do estado do Paraná e São Paulo. Em relação à detecção de *Leishmania* spp., encontramos DNA do parasita em amostras de cinco exemplares de *C. thous* assim como em outros dois canídeos *P. vetulus* (raposa-do-campo), sendo detectada a espécie *L. chagasi* em amostras de um animal desta espécie. *P. vetulus* é comumente atacada por cães domésticos em fazendas e áreas periurbanas e podem se infectar por patógenos por meio do contato com espécies domésticas (Lemos & Azevedo, 2009). Como já se sabe o cão doméstico é considerado reservatório do parasita e este achado mostra a importância dos canídeos silvestres como fonte de infecção tão eficiente para os flebotomíneos quanto canídeos domésticos, como já reportado anteriormente por Lainson et al. (1990).

Em relação aos membros da família Procyonidae, obteve-se a detecção de DNA de *Leishmania* spp. no animal A1 e *T. gondii* em amostra do exemplar A9 de *P. cancrivorus* (mão-pelada). Essa espécie animal ocorre nas Américas, habitando florestas equatoriais e tropicais, sempre próximos a rios, brejos, pântanos e mangues. Possui hábitos noturnos, é um bom nadador e escalador. Sua dieta é onívora e consiste basicamente em frutos silvestres, invertebrados e pequenos vertebrados (Nowak, 1999), porém está entre as espécies de carnívoros brasileiros menos estudados (Morato et al., 2004).

A família Mustelidae foi representada por um exemplar de *E. barbara* (irara) e dois exemplares *G. vitatta* (furão). A irara tem hábito arbóreo, são ótimas escaladoras, frequentemente vistos em árvores altas. Já *G. vitatta* (furão), possui hábito terrestre, e é comumente encontrado ocupando tocas de tatus (Eisenberg & Redford, 1999). Porém nenhum exemplar dessas espécies apresentou positividade para os patógenos estudados, o que pode ser devido ao pequeno número de animais avaliados.

A família Felidae foi representada por dois exemplares de *L. tigrinus* (gato-domato) e dois exemplares de *P. concolor* (onça parda), esta última ameaçada de extinção segundo lista do IBAMA (2003) para o território nacional. Uma delas foi encontrada morta na SP-300, próximo ao município de Areiópolis, em uma área com plantação de cana-de-açúcar e também de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual. Da mesma forma, na literatura, encontramos achados que indicam que a área de vida dessa espécie em locais com agricultura é comum, porém sua preferência é pela vegetação nativa. Um fato curioso sobre essa espécie foi a constatação, por monitoramento, de travessias rotineiras em um trecho de intenso movimento na Rodovia Anhanguera, tornando-se alvo fácil de atropelamento (Mantovani, 2001).

Em relação à Ordem Lagomorpha (3 *L. europaeus* [lebre] e 1 lebre sem identificação de espécie) e Primata (1 *Alouatta* spp., 1 *C. personatus*, 1 *C. apella* [macaco-prego] e 1 *C. penicillata* [sagui]), não foi detectada a presença de DNA dos patógenos estudados, porém não se pode concluir que esses grupos animais não se infectem, uma vez que há relatos na literatura de infecção por *T. gondii* e *Leishmania* spp. em lagomorphas e primatas (Sibley et al., 2009)

A Ordem Rodentia foi representada por 14 exemplares, sendo 5 exemplares da espécie *S. spinosus* (ouriço-cacheiro), 1 *M. coypus* (rato-do-banhado) e 4 *C. aperea* (preá) e 2 *R. rattus* (rato preto) e 2 *Hydrochoerus hydrochoeris* (capivara). A espécie *S. spinosus* possui pelos modificados em espinhos que se misturam aos pelos propriamente ditos que revestem a região dorsal. É um animal solitário e arborícola, de hábito crepuscular e noturno, sendo sua dieta constituída por frutos, folhas e cascas de árvores. (Câmara & Murta, 2003). O animal A24 foi encontrado próximo a Fazenda Experimental Edgárdia, situada em área de Proteção Ambiental localizada na bacia do Rio Capivara no município de Botucatu-SP, com área de aproximadamente 1200 hectares (ha). Possui características de Floresta Estacional Semidecidual com remanescentes florestais pouco alterados e áreas que passaram por vários níveis de perturbações antrópicas, além de ambientes de várzea e cerrado (Fonseca & Rodrigues, 2000; Jorge & Sartori, 2002). Possivelmente este animal habitava um fragmento de mata natural existente na fazenda, visto que sua área de abrangência - *home range* é de 15-20 ha, e trabalhos caracterizando a mastofauna desta região apontam para uma diversidade de indivíduos de várias ordens incluindo os Rodentia (Almeida et al., 2006). A espécie *M. coypus* (rato-do-banhado) é frequentemente encontrada em matas de galeria próximas a rios. A espécie *R. rattus* (rato preto) é comumente encontrada em ambiente peridomiciliar, pois são nesses locais que conseguem abrigo, alimento e água, fatores que possibilitam sua sobrevivência. A espécie *C. aperea* (preá) é terrestre e solitária, possui hábito diurno e noturno, com maior atividade no crepúsculo, normalmente é encontrado próximo a rios e córregos, onde produzem túneis rentes ao solo. Ocupa também áreas próximas de lavouras e beiras de estradas, sendo avistados nesses locais, alimentando-se de gramíneas (Marinho-Filho, 1992; Nowak, 1999). A espécie *H. hydrochaeris* (capivara) é considerada como o maior roedor vivente, possui hábito semi-aquático e se alimenta principalmente de gramíneas e vegetação aquática (Nowak, 1999). A detecção do DNA de *T. gondii* e *Leishmania* spp. pode representar um reservatório destes patógenos, visto que no presente estudo encontramos um número

crescente de resultados positivos em diversos órgãos de *C. aperea* (preá), *H. hydrochaeris* (capivara), *R. rattus* (rato preto) e *S. spinosus* (ouriço-cacheiro), fato que corrobora com os já descritos na literatura que demonstra a importância desse grupo animal como reservatório de vários patógenos de potencial zoonótico (Acha & Szyfres, 1986).

A Ordem Didelphimorphia totalizou 16 exemplares em todo o período de estudo, sendo 12 gambás e 4 cuícas. Os membros desta ordem, representados por exemplares de *D. albiventris* (gambás), possuem hábito generalista e atualmente ocorre em áreas próximas a habitações, incluindo chácaras, quintais e centros urbanos, normalmente arborícolas e também nas partes superiores (forros) de construções (Câmara & Murta, 2003). A cuíca (*L. crassicaudata*) vive ao longo de corpos d'água permanentes, em brejos e matas de galeria. Possui hábito noturno, dieta onívora com predominância de pequenos mamíferos, peixes e insetos (Eisenberg & Redford, 1999). Este grupo animal é considerado como reservatório de várias doenças de potencial zoonótico, incluindo as causadas por fungos, vírus, bactérias e parasitas (Forrester, 1992). No nosso estudo, foi possível detectar *T. gondii* em um exemplar de *L. crassicaudata* e três de *D. albiventris* e *Leishmania* spp. em dois exemplares de *D. albiventris*.

A Super Ordem Xenarthra foi representada por 18 exemplares, sendo 4 *D. novemcinctus* (tatu galinha), 1 *E. sexcinctus* (tatu-peba), 1 *D. septemcinctus* (tatu de 7 bandas), 3 *T. tetradactyla* (tamanduá-mirim) e 9 *M. tridactyla* (tamanduá-bandeira). São animais terrestres, sendo mais ativos à noite, podendo ser avistados durante o dia andando em busca de alimentos (Marinho-Filho, 1992). De maneira geral, essas espécies possuem movimentação lenta e são pouco ágeis, além de terem a audição apenas medianamente acurada e a visão relativamente pouco desenvolvida, motivo pelo qual podem ser cegadas pelos faróis dos carros ao cruzarem as rodovias (Melo & Santos-Filho, 2007).

Os tatus possuem hábito fossorial-terrestre, crepuscular/noturno. São sociais e passam a vida construindo tocas, geralmente subterrâneas e cavoucando o solo à procura de alimentos. Possuem hábito alimentar: a) Carnívoro-onívoros - gênero *Euphractus* (tatu-peba) que se alimentam preferencialmente de pequenos vertebrados e invertebrados e algumas vezes de raízes; b) Insetívoros generalistas terrestres - gênero *Dasypus* (tatu-galinha) que se alimentam de besouros, formigas, caracóis entre outros (Feldhammer et al., 1999).

O tamanduá-mirim vive em florestas, savanas e cerrados desde o leste das Cordilheiras dos Andes até Venezuela e Trinidad e do norte da Argentina até o sudeste do Brasil. Esta espécie possui hábitos tanto noturnos como diurnos, preferindo o dia para descansar normalmente alojado em buracos nas árvores, assim como hábito terrícola como arborícola, preferindo o segundo. Sua *home range* é de aproximadamente 3,75Km². Quando em situação de ataque, fica apoiado num tripé, formado pelas patas traseiras e pela cauda, golpeando com as garras dos membros anteriores e expelindo um odor fétido (Nowak, 1999).

No Brasil, o tamanduá-bandeira ocorre na região do Amazonas e Planalto Central até o Cerrado e as bordas da Mata Atlântica nos estados de São Paulo e Paraná. É o maior animal vivo na Super Ordem Xenartra, podendo chegar a 1,20m de comprimento, sendo acrescido 60-90 cm de cauda, que é peluda e adquire o formato de uma bandeira. As garras dos membros anteriores são mais desenvolvidas em relação às garras dos membros posteriores, uma vez que as utilizam para abrir formigueiros e cupinzeiros. São animais sociais e silenciosos, de hábitos crepusculares a noturnos. Sua *home range* varia de 9Km² até 25Km² (Nowak, 1999).

Existem fortes evidências que o número de tatus atropelados seja ainda maior do que o número refletido de exemplares coletados, pois os funcionários do DER relatam que é comum ver esses animais atravessando as rodovias da região de Botucatu, principalmente o trecho inicial da Rodovia SP-209, popularmente chamada de Castelinho, trecho caracterizado pela presença de remanescentes florestais envoltos por plantio de Eucalipto. O fato de não encontrarmos um número maior desta espécie pode ser relacionada ao fato da carne de tatu ser muito apreciada, sendo que animais recém atropelados podem ser retirados rapidamente das rodovias para o consumo humano.

O resultado positivo de detecção de DNA de *T. gondii* e/ou *Leishmania* spp. em 7 dos 12 animais avaliados confirma a alta frequência de infecção em tatus e tamanduás, reforçando a importância desse grupo animal como sentinela epidemiológica na determinação de áreas de ocorrência desses patógenos. Por outro lado, a não detecção em *E. sexcinctus* (tatu-peba) pode ser devido ao hábito alimentar e habitat um pouco diferente das outras espécies. O tatu-peba alimenta-se de restos de animais mortos no solo e suas tocas são construídas em ambientes mais secos e em campos abertos (Nowak, 1999).

No nosso estudo obtivemos detecção de gênero *Leishmania* em amostras de 20 animais, porém a identificação da espécie *L. infantum* (syn. *chagasi*) foi possível em 3

animais. Este fato pode ser devido a alguns municípios da região de estudo não serem endêmicos para leishmaniose visceral. Algumas espécies de leishmania, descritas no Novo Mundo, são conhecidos até agora por não serem patogênicas ao homem: *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948), a *Leishmania hertigi* (Herrer, 1971), a *Leishmania deanei* (Lainson & Shaw, 1977), *Leishmania aristidesi* (Lainson e Shaw, 1979) e *Leishmania forattinii* (Yoshida et al., 1979). *L. forattinii* foi isolado a partir do fígado e do baço de gambás *Didelphis marsupialis* capturado em Conchas, SP, Brasil (Yoshida et al, 1979; 1993). Pode-se sugerir que a espécie encontrada nos nossos estudos seja *L. forattinii*, uma vez que o local avaliado é próximo daquele em que o parasita foi isolado pela primeira vez. O sequenciamento destas amostras foi realizado, porém foi possível identificar apenas o gênero, isso pode ser devido a sequência gênica da espécie correspondente ao *amplicom* obtido ainda não tenha sido depositado no GenBank, principalmente em se tratando de amostras obtidas de animais silvestres ainda pouco avaliados. A PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica considerada de alta sensibilidade e especificidade (Kaltenboeck & Wang, 2005) e possibilitou a quantificação molecular do DNA das 82 amostras positivas. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os órgãos avaliados e que a maioria das amostras (80,5%) apresentou baixas concentrações de DNA do patógeno, entre 1-50 parasitas/mL ou bactérias/mL. Este fato pode ser devido ao tipo de amostra avaliada (animais silvestres atropelados), principalmente se comparada com trabalhos em que há inoculação experimental, onde os níveis da carga de patógenos são bem superiores aos encontrados nos nossos experimentos.

Em resumo, os resultados aqui obtidos mostram a problemática da larga ocorrência de animais silvestres atropelados em nossas estradas, ao mesmo tempo em que enfatiza sobre o aproveitamento deste recurso biológico para o estudo da ocorrência ambiental de patógenos, e a importância de alguns deles na manutenção de agentes infecciosos de caráter zoonótico.

6. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed. Washington: EUA, 989p. 1986.

ALEXANDER B, LOZANO C, BARKER DC, MCCANN, SHE, ADLER, G Detection of Leishmania (Viannia) braziliensis complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Tropica*. 69: 41-50. 1998.

AL-KAPPANY, Y.M., RAJENDRAN, C., ABU-ELWAFI, S.A., HILALI, M., SU, C., DUBEY, J.P. Genetic diversity of Toxoplasma gondii isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. *J. Parasitol.* 96, 1112-1114. 2010.

ALMEIDA, I.G.; GRIESE, J.; DELÍCIO, H.C.; CARELLI, F. Caracterização da mastofauna de médio e grande porte da mata do IB – Fazenda Experimental Edgardia – Botucatu-SP. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7, Ilhéus, p. 340. 2006.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. One health: A new Professional Imperative. One Health Initiative Task Force: Final Report. *One Health World – World Health Through Collaboration*, p.76, 2008.

AUBERT, D., AJZENBERG, D., RICHOMME, C., GILOT-FROMONT, E., TERRIER, M.E., DE GEVIGNEY, C., GAME, Y., MAILLARD, D., GIBERT, P., DARDÉ, M.L., VILLENA, I. Molecular and biological characteristics of Toxoplasma gondii isolates from wildlife in France. *Vet. Parasitol.*, 171 (3-4), 346-349. 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6 ed. rev. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishmune®. Nota Técnica, 2005.

BROWN, C.C.; Risks from emerging animal diseases. *Vet. Italiana*, v.42, n.4, p.305-317, 2006.

CÂMARA, T.; MURTA, R. Mamíferos da Serra de Cipó. PUC – Minas. *Museu de Ciências Naturais*, 129p 2003.

CARLIER Y, SOSA-ESTANI S, LUQUETTI AO, BUEKENS P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(3):363–8. 2015.

CHEREM, J.J.; KAMMERS, M.; GHIZONI-JR., I.R.; MARTINS, A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas*, v. 20, p. 81-96, 2007.

CORTEZ, M.R.; PINHO, A.P.; CUERVO, P.; ALFARO, F.; SOLANO, M.; XAVIER, S.C.; D'ANDREA, P.S.; FERNANDES, O.; TORRICO, F.; NOIREAU, F.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolívia. *Exp. Parasitol.*, v. 114(4), p. 305-313, 2006.

COSTA, D.G., MARVULO, M.F., SILVA, J.S., SANTANA, S.C., MAGALHÃES, F.J., LIMA-FILHO, C.D., RIBEIRO, V.O., ALVES, L.C., MOTA, R.A., DUBEY, J.P., SILVA, J.C.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *J. Parasitol.* 2012.

COURA, J.R. Tripanosomose. Doença de Chagas. Ciência e Cultura. Rev. Soc. Bras. Prog. Ciência, v. 55, p. 30-33, 2003.

CURI, N.H.A., MIRANDA, J., TALAMONI, S.A.; Serologic evidence of leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 99–101. 2006.

DA SILVA, R.C., ZETUN, C.B., BOSCO, S.M.G., BAGAGLI, E., ROSA, P.S., LANGONI, H.. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. *Vet. Parasitol.*, 157 (3-4), 291-293. 2008.

DABRITZ, H.A., MILLER, M.A., GARDNER, I.A., PACKHAM, A.E., ATWILL, E.R., CONRAD, P.A. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in wild rodents from central coastal California and a review of *T. gondii* prevalence in rodents. *J. Parasitol.*, 94(3), 675-683. 2008.

EISENBERG, J.F. & REDFORD, K.H. Mammals of neotropics: the central neotropics. Chicago, University of Chicago Press. vol. 3. 1999.

FELDHAMMER, G.A.; DRICKAMER, L.C.; VESSEY, S.H.; MERRITT, J.F. Mammalogy adaptation, diversity and ecology. The McGraw-hill Companies, Inc, 1999.

FONSECA, R.C.B.; RODRIGUES, R.R. Structural analysis and aspects of the successional mosaic of a semi-deciduous forest, in Botucatu (São Paulo State, Brazil). *Scientia Forestalis*, v. 57, p. 27-43, 2000.

FORRESTER, D.J. Parasites and diseases of wild mammals in Florida. University Press of Florida, 459p., 1992.

FUJITA, O.; SANABRIA, L.; INCHAUSTTI, A.; DE ARIAS, A.R.; TOMIZAWA, Y.; OKU, Y. Animal reservoirs for *Trypanosoma cruzi* infection in an endemic area in Paraguay. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 56(2), p. 305-308, 1994.

FUNASA; Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 5. ed. 2002.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P.; Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol.*, v.53, p.11–21, 2007.

GARCIA, J. L.; SVOBODA, W. K.; CHYSSAFIDIS, A. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; AGUIAR, L. M.; TEIXEIRA, G. M.; LUDWIG, G.; SILVA, L. R.; HILST, C.; NAVARRO, I. T.; Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná River Basin, Paraná State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, n. 133, p. 307-311. 2005.

HERRER A. *Leishmania hertigi* sp.n. from the tropical porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. *J Parasitol* 57: 626-629; 1971.

HERWALDT BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin. Microbiol. Rev.* p659-688. 2001.

HILL, D.; DUBEY, J. P.; *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, n. 8, p. 634-640. 2002.

HUPRIKAR, S; BOSSERMAN, E; PATEL, G; MOORE, A; PINNEY, S; ANYANWU, A; NEOFYTOS, D; KETTERER, D; STRIKER, R; SILVEIRA, F; QVARNSTROM, Y; STEURER, F; HERWALDT, B; MONTGOMERY, S. Donor-Derived *Trypanosoma cruzi* Infection in Solid Organ Recipients in the United States, 2001–2011. *American Journal of Transplantation*, 13: 2418–2425. 2013.

JITTAPALAPONG, S., INPANKAEW, T., PINYOPANUWAT, N., CHIMNOI, W., KENGRADOMKIJ, C., WONGNARKPET, S., MARUYAMA, S., LEKKLA, A., SUKTHANA, Y. Epidemiology of *Toxoplasma gondii* infection of stray cats in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 41(1), 13-1. 2010.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREUGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P.; Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, v.451, v.21, p.990-994, 2008.

JORGE, L.A.B.; SARTORI, M.S. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de vegetação natural na Fazenda Experimental Edgardia, em Botucatu-SP. *Rev. Árvore*, v.26, p. 585-592, 2002.

KALTENBOECK, B.; WANG, C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv. Clin. Chem.*, v.40, p.219-259, 2005.

KUHLS K, ALAM MZ, CUPOLILLO E, FERREIRA GE, MAURICIO IL, ODDONE R, FELICIANGELI MD, WIRTH T, MILES MA, SCHÖNIAN G., Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1155. 2011.

LAINSON R, SHAW JJ . The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis, p.1-116. In WHR Lumsden & DA Evans (eds) *Biology of the Kinetoplastida*, Vol. 2. *Academic Press*, London. 1979.

LAINSON R, SHAW JJ. Leishmanias of neotropical porcupines: *Leishmania hertigi deanei* nov. subsp. *Acta Amazônica* 7: 51-57. 1977

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O. SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis: - distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz, Neiva) in relation to the fox *Cercyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 85, p. 135-137, 1990.

LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G.; CUNHA, E. L. P. et CUTOLO, A. A. Prevalência da Toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 38, p.243-244. 2001.

LEBLOIS R, KUHLS K, FRANÇOIS O, SCHÖNIAN G, Wirth T., Guns, germs and dogs: on the origin of *Leishmania chagasi*. *Infect Genet Evol* 11: 1091-1095, 2011.

LEMOS, F.G.; AZEVEDO, F.C. *Pseudalopex vetulus*, Carnivora, Canidae, p. 61. In: BRESSIAN, P.M.; KIERULFF, M.C.M.; SUGIEDA, A.M. *Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo- Vertebrados*. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo, *Secretaria do Meio Ambiente*, 645p., 2009.

LINTHICUM, K.J.; BRITCH, S.T.; ANYAMBA, A.; SMALL, J.; TUCKER, C.J.; CHRETIEN, J.-P.; SITHIPRASASNA, R.; Ecology of disease: The intersection of human and animal health. Forum on Microbial Threats workshop entitled “Vector-borne diseases: understanding the environmental, human health, and ecological connections,” June 19-20, Ft. Collins, CO, 2008.

LUKES J, MAURICIO IL, SCHÖNIAN G, DUJARDIN JC, SOTERIADOU K, DEDET JP, KUHLS K, TINTAYA KWQ, JIRKU M, CHOCHOLOVÁ E, HARALAMBOUS C, PRATLONG F, OBORNÍK M, HORÁK A, AYALA FJ, MILES MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007.

LUPPI, M.M., MALTA, M.C.C., SILVA, T.M.A., SILVA, F.L., MOTTA, R.O.C., MIRANDA, I., ECCO, R., SANTOS, R.L.; Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet Parasitol* 155: 146–151. 2008.

MANTOVANI, J.L. Telemetria convencional e via satélite na determinação das áreas de vida de três espécies de carnívoros da região nordeste do estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 118 f. 2001.

MARINHO-FILHO, J. Mamíferos da Serra do Japi. IN: MORELLATO, L. PATRÍCIA C. História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. UNICAMP/FAPESP: Campinas, p 264 – 287. 1992.

MAURICIO IL, STOHARD JR, MILES M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, 16, 188-199. 2000.

MELO, E.S.; SANTOS-FILHO, M. Efeitos da BR-070 na província serrana de Cáceres, Mato Grosso, sobre a comunidade de vertebrados silvestres. *Rev. Bras. Zootecias*, v. 9, p. 185-192, 2007.

MILES, M.A.; POVOA, M.M.; DE SOUZA, A.A.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; KETTERIDGE, D.S.; Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* V.75, p.667–674, 1981.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J.J.; JAINSON, R.; TOYE, P.J.; Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brasil. *Nature*, v.27, p.19–921, 1978.

MUNIZ J, MEDINA HSG 1948. Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enriettii* n.sp). *Hospital (Rio de Janeiro)* 33: 7-25. 1948.

NÓBREGA AA, GARCIA MH, TATTO E, OBARA MT, COSTA E, SOBEL J, ARAUJO WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* Apr, .2009.

NOWAK, R.M. Walker's mammals of the world. 6 ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 836p., 1999.

PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; et SIMPSON, D. I. H.; Zoonoses. Biology, Clinical Practice and Public Health Control. *Oxf. Med. Publ.*, v.43, p. 579-597, 1998.

PAPADOGIANNAKIS E, SPANAKOS G, KONTOS V, MENOUNOS PG, TEGOS N, VAKALIS N Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health* 57: 23-25, 2010.

PINOWSKI, J. Roadkills of vertebrates in Venezuela. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 22, p. 191–196, 2005.

QUARESMA P.F., MURTA S.M.F., FERREIRA E.C., ROCHA-LIMA A.C.V.M., XAVIER A.A.P. & GONTIJO C.M.F. Molecular diagnosis of canine visceral

leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica* 111:289-294. 2009.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2001.

ROCHA, V.J.; REIS, N.R.; SEKIAMA, M.L. Dieta e dispersão de sementes por *Cercyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae), em um fragmento florestal no Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zoo.*, v. 21, p. 871-876, 2004.

SHIKANAI-YASUDA MA, CARVALHO NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.*; 54:845-52, 2012.

SIBLEY, L.D.; KHAN, A.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci.*, v. 364, p.49-61, 2009.

SILVA, A. V.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H.; BAGAGLI, E.; Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Vet. Parasitol.*, v.135, p.81-83, 2006.

SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA-NETO, J. S.; Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.*, n.102, p.217-224, 2001.

SILVA. S.M.; RABELO P.F-B.; GONTIJO N.F.; MELO M.N.; RIBEIRO V.M.; MICHALICK M.S.M.; First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 174, p.150-154, 2010.

SOUZA-LIMA RDE C, BARBOSA MD, COURA JR, ARCANJO AR, NASCIMENTO ADA S, FERREIRA JM, MAGALHÃES LK, ALBUQUERQUE BC, ARAÚJO GA, GUERRA JA. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 JulAug;46(4):510-4.

TRAVI BL, OSÓRIO Y, GUARÍN N, CADENA H. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: Clinical and Parasitological Observations in Experimentally Infected *Didelphis marsupialis*, Reservoir of New World Visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol*; 88:73-75. 1998.

ULLMANN, L. S.; SILVA, J. R. C; MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; SANTOS, L. C.; HOFFMANN, J. L.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A. M. S.; MONTAÑO, P.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Serological Survey of *Toxoplasma gondii* in Captive Neotropical Felids from Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.172, p.144-146, 2010.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W.; Parasitol. Vet.. Guanabara Koogan. Segunda Edição, p.204 a 207, 1996.

VIEIRA, E.M. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciênc. Cult.*, v. 48, p. 270-271, 1996.

WALTER, A. Human activities and American trupanosomiasis. *Parasite*, v. 10(3), p. 191-204, 2003.

WELLS, E.A.; D'ALESSANDRO, A.; MORALES, G.A.; ANGEL, D. Mammalian wildlife diseases as hazards to man and livestock in na area of the Llanos Oreintales of Colombia. *J. Wildl. Dis.*, v. 17(1), p. 153-162, 1981.

WHO. 2005. Leishmaniasis disease information. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em: 21/02/2016.

YIN, C.C., HE, Y., ZHOU, D.H., YAN, C., HE, X.H., WU, S.M., ZHOU, Y., YUAN, Z.G., LIN, R.Q., ZHU, X.Q. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in rats in southern China. *J. Parasitol.* 96, 1233-1234. 2010.

YOSHIDA ELA, CUBA CUBA CA, PACHECO RS, CUPOLILLO E, TAVARES CC, MACHADO GMC, MOMEN H, GRIMALDI G Description of Leishmania (Leishmania) forattinii sp.n., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 397-406. 1993.

YOSHIDA ELA, SILVA R, CORTEZ LS, CORRÊA FMA. Encontro de espécie do gênero Leishmania em Didelphis marsupialis aurita no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 21: 110-113, 1979.