



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

Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira

**Análise espacial e detecção molecular de *Leishmania* spp.
e *Trypanosoma* spp. em animais silvestres mortos por
atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

**Botucatu
2018**

Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira

Análise espacial e detecção molecular de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil

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

Orientadora: Profa.Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2018

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Palmeira, Aghata Regina de Oliveira Alves.

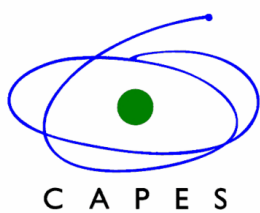
Análise espacial e detecção molecular de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no Estado de Santa Catarina, Brasil / Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira
Capes: 21300003

1. *Leishmania*. 2. Tripanossomo. 3. Animais silvestres. 4. Análise espacial (Estatística). 5. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: *Leishmania*; *Trypanosoma*; animais silvestres.

Auxílio financeiro



Bolsa Demanda Social



Processo nº 2015/17519-4

Dedicatória

Á Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia e presente na hora de angústia. Por me dar muito mais do que eu preciso, e me abençoar muito mais do que eu mereço. Pelas pessoas maravilhosas que colocou na minha vida.

“Mas, quando eu sentir medo, confiarei no senhor”.

Salmos 56:3.

E um agradecimento especial à minha orientadora Virgínia, por ter me acolhido em sua equipe e por acreditar em mim. Por ser mais que uma orientadora e sim amiga. Sou muito grata por sua dedicação em me ajudar e orientar. E principalmente, por ter depositado sua confiança em mim ao longo desses dois anos de trabalho. Tenho muito o que aprender e sem sua orientação, apoio, confiança em todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

“ A gratidão é a memória do coração”

Provérbio Francês

Á minha filha Beatriz, minha maior motivação para seguir em frente e nunca desistir. Não há palavras que possam descrever o quanto a amo. Que eu consiga te ensinar os valores morais que enriquecem a vida. Agradeço por cada gesto de carinho, que muitas vezes sem entender me consolaram. Pelas palavrinhas “Estou aqui com você mamãe” que me dão força para lutar a cada dia. Por suas mãozinhas que acariciam meu rosto e pelos abraços e beijos inesperados, que tornam o final do meu dia valer a pena. Te amo minha boneca.

“Se eu sei o que é amor, é por sua causa”.

(Hermann Hesse)

A vida não vem com manual, mas vem com mãe! Por ser a melhor mãe do mundo, e me ensinar a ser forte, a não abaixar a cabeça, e sim lutar. Aprendi tantas coisas importantes com você, e a mais importante foi agradecer por tudo aquilo que conquistei e seguir em frente sem deixar que nenhum obstáculo me bloqueie. Obrigada por me permitir ter um olhar humilde para o mundo, aprender que tudo na vida é uma lição e principalmente as coisas que não posso mudar e a me reconciliar comigo, me livrando da culpa e abrindo o coração para que novas coisas, diferentes daquelas que desejei e planejei possam acontecer. Com o seu amor me ensinou a buscar a sabedoria. Obrigada por tudo que você é tudo para mim. Eu te amo!

Aos meus irmãos Lincoln, Aron e Paola, pelo carinho, amizade e confiança. Obrigada por todos os momentos juntos de amor, brigas e muitas risadas. Amo vocês.

“Agradeço a meu Deus toda vez que me lembro de vocês”.

Filipenses 1:3.

A minha avó Neusa, por toda palavra de apoio, pois mesmo sem entender, sempre querendo participar e interagir com meus estudos. Obrigada por cada gesto de carinho nos dias em que eu estava preocupada e nervosa. Te amo s2.

A minha tia Claudia, diga-se de passagem, a “paura” mais linda da minha vida. Aquela tia amiga para todas as horas, faça chuva ou faça sol. Obrigada por me ouvir, aconselhar, brigar, rir e me amar. Sempre falo o que seria de você sem eu na sua vida, mas na verdade o que seria de mim sem você. Agora todas as comidas que perdi podemos fazer, terei mais tempo. Te amo s2

Ao meu sobrinho Gui e Tio Anderson, obrigada por toda preocupação e apoio, agora podemos fazer mais churrasco e jogar uno.

A minha cunhada linda Milena, pela amizade, carinho e parceria. Por me ouvir e aconselhar. Amo você.

Melzinha, agradeço muito a Deus por ter você em minha vida. Por cada palavra, preocupação e carinho. Você é única. Obrigada por todos os momentos. Te amo.

Giuliana, não tenho palavras para agradecer a sua amizade, só de escrever eu me emociono. Desde que nos tornamos amigas eu sabia que tinha ganho uma irmã. Você é excepcional! Obrigada por existir e fazer parte da minha vida. Pelas palavras que me acalmam sempre, pelos seus instintos e pela preocupação. Por cada choro (muitos), risos (muito mais) e broncas. Você é pau para toda obra. Quem tem uma Giu, tem tudo! Amo você.

♪♪...É se dar sem esperar, nada em troca dessa união é ter alguém pra contar, na indecisão... nunca se desesperar, sempre ali pra estender a mão, maior valor não há é feito
irmão... ♪♪

Bruna, Deus foi muito generoso comigo em colocar você na minha vida. Mesmo que um pouquinho longe a nossa amizade só fortaleceu. Agradeço por tudo, pelo carinho, apoio, palavras de conforto e por apenas ouvir minhas lamentações. Amizade para a toda vida. Te amo.

Xuxu (Leticia), obrigada por me consolar, ouvir e aconselhar em todos os momentos. Amo você.

Daia, minha loira linda, obrigada pela companhia, apoio e preocupação. Por cada choro, riso e ombro amigo. Te amo

Astor e Marina, casal Flairs. Vocês são maravilhosos, agradeço a Deus por ter conhecido vocês. Obrigada por tirar sorriso nos momentos mais difíceis, por tentar todo atrapalhado (Astor) enxugar minhas lágrimas. Pelos conselhos e pelas melhores conversas na madrugada (Marina). Nossos encontros são os melhores da vida. Amo muito vocês.

Agradecimentos

Às Lutzetes lindas, pela risada, danças, comidas (muita) e altas palhaçadas. Débora, pela ajuda nas amostras e pelos socorros no laboratório. Fran, pelas amostras extraídas, lanchinhos na copa e altos papos. Natássia, chegou de mansinho e conquistou meu coração. Obrigada pela parceria, e toda ajuda no meu projeto, sem você eu estaria enlouquecida. Bah, minha filiquinha linda, sem palavras para descrever você. Obrigada por TUDO, te amo!

Ket, por todo apoio e carinho desde o início do mestrado. Agradeço por tudo que me ensinou.

Lívia Ramos, pela companhia na disciplina inesquecível, por toda ajuda e palavra amiga nas horas que eu mais precisei, sou eternamente grata.

À Lívia e Wesley por me socorrem várias vezes no whats com minhas amolações e dúvidas (muitas) e principalmente a Laís (Campinas), pelas melhores contribuições, dicas valiosas e correções. Eternamente grata.

Agradeço a todos da Creche da Virgínia, por todo aprendizado, nossos encontros científicos, correções na dissertação e conversar compartilhadas. Thiago, Cássio e Laís.

Rodrigo, meu parça, as vezes um pouco sumido, mas sempre pronto para me ouvir quando preciso. Obrigada por todo apoio, parceiro de carona e disciplinas.

Às minhas amigas Mari (preta), Fer (cumadre) e Thaís, obrigada por todos os momentos e carinho e palavras de apoio em momentos difíceis.

Agradeço a toda equipe do Adolfo Lutz, que me acolheram muito bem desde quando iniciei o aprimoramento. Aprendi muito com cada um de vocês.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais por todo aprendizado e incentive ao meu crescimento profissional.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, principalmente a Bruna Quirino, pelos serviços

e esclarecimentos sempre quando solicitados, por me lembrar dos prazos e entregas de documentos.

Ao serviço de biblioteca e documentação da UNESP – Botucatu, pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos alunos da Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pelas experiências trocadas em sala de aula, laboratório e nas caronas.

À Profa. Dra. Simone Lucheis, Dra. Mirian Paixão e Dra. Maria Fernanda pela paciência e dedicação, e principalmente pelas valiosas contribuições feita no exame de qualificação. Tenho muito que aprender com vocês.

À equipe de pesquisadores e professores da Universidade Regional de Blumenau - FURB, pela parceria e coleta das amostras dos animais silvestres.

Ao auxílio financeiro da Fapesp e bolsa CAPES.

“A grandeza não está em ser forte, mas no uso correto da força...
Grande é aquele cuja força conquista mais corações pela atração
do próprio coração”

Henry Ward Beecher

Sumário

1. Capítulo 1	15
1.1. Revisão da literatura	16
1.1.1. One Health	16
1.1.2. Atropelamento de animais e conservação ambiental	17
1.1.3. Tripanossomatídeos	18
1.1.4. Leishmanioses	18
1.1.4.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	22
1.1.4.2. Reservatórios e Hospedeiros	23
1.1.4.3. Vetores	24
1.1.5. Tripanossomíases	25
1.1.5.1. Hospedeiros e vetores	27
1.2. Objetivo	30
1.3. Referências	32
2. Manuscrito	45
3. Conclusão	75
4. Anexos	77
5. Apêndices	85

Resumo

ALVES-PALMEIRA, A.R.O. **Análise espacial e detecção molecular de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil.** 2018. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

A família Trypanosomatidae é constituída por diversas espécies de protozoários que causam doenças em humanos e outros animais. Destacam-se os protozoários *Leishmania* spp. causadores das leishmanioses e *Trypanosoma* spp. causadores da doença de Chagas. O cão doméstico é considerado o principal reservatório da leishmaniose no meio urbano, porém o homem e animais silvestres também podem ser infectados atuando como reservatórios de tripanossomatídeos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em amostras provenientes de animais silvestres atropelados, procedentes do estado de Santa Catarina pela técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a fim de mapear e identificar áreas de risco para a infecção humana. Foram coletadas 1063 amostras de tecido pulmão, fígado, baço, pele e coração de 297 animais silvestres. Utilizou-se *primers* LITST/L5.8S e LITSV/L5.8SR para triagem da família Trypanosomatidae, onde 12 amostras de sete roedores foram positivas. Na pesquisa de *L. infantum* e *T. cruzi* foram utilizados *primers* específicos, LCS1/LCS3 e TCZ1/TCZ2 respectivamente, sendo todas as amostras foram negativas. O sequenciamento foi realizado a partir das amostras positivas e nove amostras apresentaram similaridade entre 79% a 100% com *Trypanosoma brucei* (GenBank KX700175.1), *Trypanosoma brucei gambiense* (GenBank XM_011780373.1), *Trypanosoma vivax* (GenBank HE573020.1), *Trypanosoma rangeli* (GenBank KJ742907.1) e com o gênero *Trypanosoma*. Os animais foram, *Oxymycterus* sp. (rato do brejo), *Scapteromys* sp. (rato d' água), *Nectomys squamipes* (rato d' água) e dois *Oligoryzomys* sp. (rato do mato). Verifica-se que a localização dos animais positivos foi próxima as atividades de indústria, comércio e lazer, permitindo o contato entre animais e homem, facilitando a manutenção de agentes infecciosos de caráter zoonótico. 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 importante recurso biológico para o estudo da ocorrência ambiental de patógenos.

Palavras-chave: *Leishmania*, *Trypanosoma*, animais silvestres, PCR.

ALVES-PALMEIRA, A.R.O. **Spatial analysis and molecular detection the *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in road-killed wild animals in Santa Catarina State, Brazil.** 2018. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

The family Trypanosomatidae consists several species of protozoans that cause diseases in humans and other animals. *Leishmania* spp. is responsible to cause leishmaniasis diseases and *Trypanosoma cruzi* cause Chagas disease. The domestic dog is considered the main reservoir of leishmaniasis, although wild animals can also be acting as reservoirs of trypanosomatids. The objective of the present study was to evaluate the occurrence of the *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp in samples from wild animals from Santa Catarina State, using the molecular technique Polymerase Chain Reaction (PCR), in order to map and identify risk areas for human infection. A total of 1,063 tissue samples of lung, liver, spleen, skin and heart of 297 wild animals. Primers (LITST / L5.8S and LITSV / L5.8SR) were used for screening of Trypanosomatidae family, with samples from seven rodents were positive. In the research of *L. infantum* and *T. cruzi* specific primers were used, where all the samples were used, LCS1 / LCS3 and TCZ1 / TCZ2 respectively, all of which were negative. Sequencing was performed from the positive samples and nine samples from five animals showed similarity between 79% to 100% with *Trypanosoma brucei* (GenBank KX700175.1), *Trypanosoma brucei gambiense* (GenBank XM_011780373.1), *Trypanosoma vivax* (GenBank HE573020.1), *Trypanosoma rangeli* (GenBank KJ742907.1) and the genus *Trypanosoma* spp. The animals were, *Oxymycterus* sp. (marsh rat), *Scapteromys* sp. (water rat), *Nectomys squamipes* (water rat) and two *Oligoryzomys* sp. (bush rat). It is found that the location of the positive animals were near to the activities of industry, market and recreation, allowing the contact between animals and man, facilitating the maintenance of agents of infectious zoonotic diseases. The results obtained here show the problem of the frequent occurrence of road-killed wild animals in our roads, while emphasizing the use of this important biological resource to study the environmental occurrence of pathogens. It is found that the location of the positive animals.

Key word: *Leishmania*, *Trypanosoma*, wild animals, PCR

Capítulo 1

1.1. Revisão da literatura

1.1.1. One Health

As Doenças emergentes e reemergentes, são as principais consequências da desordem nas condições climáticas, ambientais e ação humana. (1,2). Estudos apontam que a mudança climática resultará em 250 mil mortes por ano, no período de 2030 a 2050 (3). Alguns fatores favorecem a circulação e transmissão de agentes infecciosos, tais como urbanização, exploração excessiva dos recursos naturais, sinantropismo e outros (4, 5). Além disso, influenciam a vida silvestre com humanos e animais domésticos, aumentando assim a transmissão de zoonoses (6, 7, 8, 9).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define zoonoses como doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre animais e seres humanos, cuja transmissão possa ocorrer de animais para humanos, ou de humanos para os animais (10). Sendo assim, a compreensão de que os animais silvestres podem ser fontes de infecção tanto para a população humana, quanto para as outras populações de animais selvagens e para os animais domésticos, é de extrema importância para se garantir a saúde do ecossistema e, conseqüentemente, a saúde animal e humana. Estima-se que existam pelo menos 144 doenças humanas derivadas de patógenos dos animais selvagens, como por exemplo, a raiva, leptospirose, tuberculose, febre do oeste do Nilo, influenza aviária, leishmanioses, dentre outras (11).

O conceito *One Health* esta sendo muito utilizado em estudos epidemiológicos, pois trata-se da união da saúde humana, animal e ambiental, para prevenir e controlar as doenças que acometem os seres vivos de modo geral. (12, 13,14).

O crescimento urbano tem gerado a degradação do bioma e em muitas regiões a presença de fragmentos florestais se tornaram pequenas ilhas de vegetação nos grandes centros urbanos. Neste contexto, o melhoramento do saneamento básico, saúde pública e educação ambiental, algumas vezes, não acompanham o rápido crescimento populacional, proporcionando o aparecimento e/ou reaparecimento de diversas zoonoses (15).

Como decorrência dessas interações pode suceder zoonoses com expansão epidêmica em animais vulneráveis e o aumento da sua disseminação geográfica (16). Além disso, algumas zoonoses podem causar lesões graves em determinadas espécies de animais selvagens, representando um risco para a conservação da fauna (17). A expansão urbana acarretou não

só à perda de habitat para as espécies selvagens, mas também, obrigou-as a ocuparem áreas modificadas e a adaptarem-se à presença de espécies domésticas e ao homem (18, 19, 20, 21).

1.1.2. Atropelamento de animais e conservação ambiental

As estradas são outros fatores que afetam a fauna pelas alterações do comportamento animal e modificações nos padrões de movimentação (aumento da área de vida, sucesso reprodutivo, no ponto de fuga e nas estratégias de predação), alterações do estado fisiológico, introdução de espécies exóticas, disseminação de doenças, fragmentação do habitat e isolamento populacional, degradação da qualidade da água, problemas devido ao explosivo crescimento econômico das regiões, e perda de indivíduos por colisões com veículos (22). Os alimentos que caem na estrada, atraem muitos animais, principalmente os de pequeno porte, ocasionando o atropelamento destes (23). Desta forma, as rodovias deveriam ser permeáveis ao movimento de animais, e formas de evitar os atropelamentos e facilitar o cruzamento deveriam fazer parte do planejamento da construção ou expansão de estradas (24).

Estimativas baseadas nos estudos disponíveis demonstram que mais de 450 milhões de animais silvestres são mortos anualmente em 1,7 milhões de quilômetros de estradas existentes em todo o Brasil (25). Deste número, 390 milhões são sapos, serpentes, aves e mamíferos de pequeno porte, 55 milhões são animais como lebres, gambás, macacos, jibóias, jabuti entre outros e cinco milhões são animais de grande porte, tais como onças, lobo-guará, tamanduá-bandeira, lontras, canídeos e outros felídeos de várias espécies (26).

O uso de animais silvestres atropelados em pesquisas no Brasil está em crescimento, tanto quanto o impacto gerado na fauna e flora (25-9, 30, 31, 32), como em estudos Epidemiológicos na identificação de microorganismos (33-9, 40). Diversos fatores sustentam a importância da existência de um monitoramento de doenças de animais silvestres, dentre eles a possibilidade de elucidar as formas de transmissão das doenças infecciosas que os acometem, hoje na sua maioria desconhecidas, e de prever o impacto ecológico que possam causar (40). Os estudos com animais atropelados vão ao encontro das atuais discussões sobre bioética, que priorizam métodos alternativos para o uso de animais em pesquisas, sem a necessidade de eutanásia (41).

A fauna silvestre pode representar uma grande fonte de informações em locais que

jamais foram estudados. Além de possuir grande capacidade de suporte e qualidade ambiental, são considerados como ótimos indicadores da qualidade ambiental, pois demonstram por meio dos agentes que os albergam os desequilíbrios do ambiente aos quais estão expostos (5).

As técnicas moleculares são ferramentas importantes na identificação de agentes infecciosos em animais silvestres atropelados. No estado de São Paulo, na identificação de *Paracoccidioides brasiliensis* (42, 43) e fungos importantes para a saúde pública (41). Em um estudo realizado com primatas não humano em Madri, para identificar *Leishmania infantum* (44), do mesmo modo na Espanha, na identificação de *Leishmania sp.* em carnívoros silvestres (45). A detecção molecular de *Leishmania infantum* em *Cerdocyon thous* (46), *Toxoplasma gondii* (47). No estado de Santa Catarina, foi possível a detecção molecular de fungos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus penicillioides* e *Cryptococcus spp.* em amostras de animais silvestres atropelados (48).

1.1.3. Tripanossomatídeos

A ordem Kinetoplastida caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da única mitocôndria destes organismos, constituída por moléculas circulares de DNA concatenadas, localizadas na base do flagelo e que contém o DNA mitocondrial (kDNA) (49). Dentro dessa ordem, destaca-se a família Trypanosomatidae, que é constituída por protozoários uniflagelados pertencentes ao reino Protozoa e filo Sarcomastigophora (50, 51). Podem ser parasitas monoxênicos ou heteroxênicos e, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento, estão distribuídos em 11 gêneros: sete gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Rynchoidomonas*, *Angomonas* e *Strigomonas*); quatro gêneros albergam espécies heteroxênicas (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*) ocorrendo alternância de ciclos entre hospedeiros invertebrados como artrópodes hematófagos e vertebrados como animais domésticos e silvestres, e a última espécie os ciclos ocorrem alternando entre invertebrados, insetos fitófagos e um hospedeiro vegetal (52, 53, 54, 55).

1.1.4. Leishmanioses

As leishmanioses são endêmicas em 98 países ao redor do mundo, cuja estimativa é de 20.000 a 30.000 mortes por ano (56). São consideradas pela Organização Mundial da Saúde, como uma das seis doenças de maior importância em Saúde Pública e estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo, afetando em particular populações mais pobres. Entre as protozooses ocupam o segundo lugar, sendo superadas, apenas, pela malária (57).

Está associada a fatores sociais (nutrição, extrativismo) e os ambientais (desmatamentos, construção de barragens, urbanização, migração e mudanças climáticas) (58). O gênero *Leishmania* é subdividido em dois sub-gêneros: *Leishmania* (L.) e *Viannia* (V.). De acordo com as diferentes formas clínicas encontradas em humanos, a doença é classicamente dividida em dois grandes grupos: leishmaniose visceral (LV), com acometimento das vísceras e leishmaniose tegumentar (LT), podendo ser esta última subdividida em leishmaniose cutânea, muco-cutânea, cutânea difusa e disseminada (59).

Considerando as diferentes manifestações clínicas em humanos, as principais espécies de *Leishmania* podem ser classificadas em três complexos: o complexo *L. donovani*, que compreende *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, responsáveis pela doença visceral; o complexo *L. mexicana* que inclui *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) enrietti*, e são responsáveis pela doença em sua forma cutânea; e o complexo *L. braziliensis* que abrange as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) equatoriensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) shawi*, responsáveis pela doença em sua forma mucosa ou mucocutânea (60). Apesar da discordância entre pesquisadores, semelhanças verificadas por meio de estudos moleculares sugerem que *L. chagasi* e *L. infantum* sejam a mesma espécie, o que motivou (61). Alguns estudos apontaram semelhanças entre *L. chagasi* e *L. infantum*, sugerindo que sejam da mesma espécie, de tal modo que alguns autores denominaram *L. infantum* o agente etiológico da Leishmaniose visceral também nas Américas (61).

A leishmaniose tem uma vasta distribuição global, com prevalência de 12 milhões de pessoas acometidas anualmente, sendo 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral e 700 mil a 1.2 milhões de pessoas acometidas com leishmaniose tegumentar (59). Os casos LV em humano estão presentes em 12 países, sendo que em 2015, dos 3.456 casos de LV, 96% são relatados no Brasil (60).

A LV é a forma mais grave da doença em humanos, quando não recebe tratamento adequado pode ser fatal, pois acomete órgãos internos, tais como fígado e baço (62). Tem se

observado uma mudança no perfil epidemiológico da doença, devido a mudanças antrópicas, levando a adaptação dos vetores às áreas suburbanas e urbanas (63). Ela resulta de uma infecção sistêmica do fígado, baço e medula óssea, caracterizando-se por episódios febris, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e perda de peso (49). Entretanto, após a infecção muitos casos permanecem assintomáticos ou associados a sintomas que eventualmente resolvem-se espontaneamente (64). A LV é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e outras doenças imunossupressoras, tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (65).

A LT também conhecida como Úlcera de Bauru, Nariz de Tapir ou Botão do Oriente, possui diferentes padrões de transmissão, sendo uma doença de alta complexidade, o que acaba dificultando o seu controle (66). De caráter praticamente cosmopolita uma vez que ocorre em todos os países das regiões tropicais e subtropicais, exceto na Nova Zelândia e algumas Ilhas do Pacífico. No Brasil, está descrita em vários municípios de todas as unidades federadas (UF), sendo que o número de casos novos no Brasil é de 30.000 casos/ano (67).

Nos primórdios, esta ocorria somente entre animais silvestres e posteriormente o homem passou a fazer parte do ciclo de transmissão como hospedeiro acidental. Fato mais atual refere-se à transmissão em ambiente rural ou mesmo periurbano em decorrência, principalmente, da adaptação do vetor ao peridomicílio. Sendo assim, são descritas a existência de três perfis epidemiológicos (66).

a) Silvestre: no qual ocorre a transmissão entre os animais silvestres, em áreas florestais (vegetação primária), sendo considerada uma zoonose de animais silvestres;

b) Ocupacional ou lazer: a transmissão está associada a exploração desordenada dos ambientes naturais e derrubada de matas para, por exemplo, construção de estradas e hidrelétricas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, e ecoturismo (antropozoonose) (Figura 1).



Figura 1- Casa construída em área da floresta amazônica para extrativismo de borracha. Fonte: Manual e Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

c) Rural ou periurbana: no qual ocorrem em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose) (Figura 2).



Figura 2- Assentamento Rio Piorini, na Região Norte do Brasil. Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

De acordo com Ministério da Saúde, todas as regiões do país apresentam casos

confirmados de LT em humanos e LV em varias regiões (68, 69).

O estado de Santa Catarina é uma região endêmica para Leishmaniose visceral canina (LVC), com um total de 147 casos da doença entre o ano 2015 e 2017 (70). No período de 2011 a 2015 foram confirmados 69 casos humanos de LT (69), e 3 casos autóctones em humanos confirmados em 2017 na capital Florianópolis. (71). Em estudo realizado em 2010 no município de Florianópolis/SC, avaliou-se a prevalência e perfis de infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás (72).

No Brasil, a LVC é mais prevalente do que a LV em humanos, o que torna a situação crítica do ponto de vista epidemiológico, pois o grande número de animais infectados com alto parasitismo cutâneo, atuam como a principal fonte de infecção para os flebotomíneos e, consequentemente, pela manutenção do ciclo no ambiente doméstico (73).

1.1.4.1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. envolve alternância entre hospedeiros invertebrados e mamíferos (Figura 3). Os primeiros são pequenos dípteros da subfamília Phlebotominae, com o gênero *Phlebotomus* hospedando as espécies do Velho Mundo (Europa, África e Ásia), e o gênero *Lutzomya*, as espécies do Novo Mundo (Américas) (74). Muitas espécies de flebotomíneos foram identificadas no Brasil, aproximadamente 274, onde 10% desses vetores fazem parte do ciclo de transmissão (75).

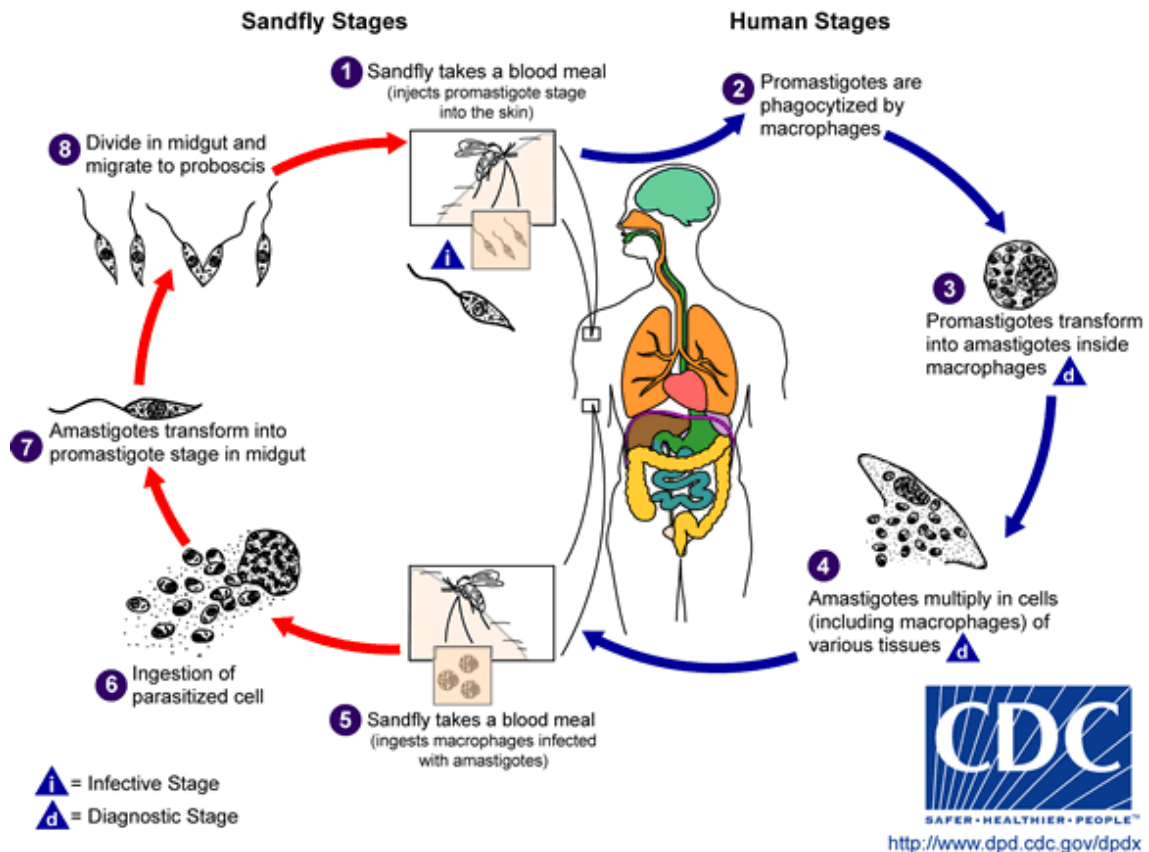


Figura 3 - Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*, demonstrando as duas formas evolutivas: promastigotas (vetor) e amastigotas (hospedeiro vertebrado) (CDC, 2011b) – São Paulo – 2012. Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

As fêmeas dos flebotomíneos que fazem o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, pois o sangue é responsável para a maturação dos ovos. Quando infectada pelo parasita *leishmania*, durante o repasto sanguíneo, formas promastigotas são regurgitadas junto com a saliva. No organismo do hospedeiro, essas formas são fagocitadas por macrófagos. No seu interior, se diferenciam em forma amastigotas onde se multiplicam até a eclosão da célula. Quando uma fêmea se alimenta desse hospedeiro, ingere macrófagos parasitados com formas amastigotas. No trato digestório do vetor, as formas se diferenciam em formas promastigotas, seguem para a probóscide, onde ficam aderidas pelo flagelo, até o próximo repasto sanguíneo (76).

1.1.4.2. Reservatórios e Hospedeiros

O cão doméstico é considerado o principal reservatório da LV no ambiente urbano, porém outros animais como os domésticos (77), selvagens de vida livre (78) e também de

cativeiro (79) podem ser infectados. Roedores domésticos (80), marsupiais, animais de produção, canídeos silvestres, gatos, primatas entre outras (73, 81-5). No Noroeste do Paraná, relataram a presença de anticorpos de *Leishmania* no mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (86). Estes achados sugerem que estas espécies podem atuar como um reservatório para *Leishmania* spp. No Brasil, raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (87). O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), cachorro vinagre (*Speothos venaticus*), e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) estão entre as espécies mais descritas na literatura acometidas por leishmanioses (88, 89). No Brasil *Rattus rattus* foram encontrados infectados com *L. amazonensis* (80). Na Itália ratos (*Rattus norvegicus*) foram encontrados infectados com *L. infantum* (90).

Os membros da família Didelphidae, representada por *Didelphis albiventris* (gambá de orelha branca), são generalistas de habitat e atualmente ocorrem em áreas perto de habitações, incluindo fazendas, pátios e centros urbanos (91). Esta espécie foi incriminada como reservatório da leishmaniose e, por seus hábitos sinantrópicos, que desempenha um papel importante no tráfego peridoméstico-florestal de áreas degradadas (92). Mamíferos silvestres *Callithrix jacchus*, *Lepus europaeus*, *Sphiggurus villosus*, *Nasua nasua*, *Eira barbara* e *Galictis cuja* foram encontrados com anticorpo de *Leishmania (L.) infantum* em um município no estado de São Paulo (93). No nordeste do Brasil, a classe de marsupiais foi a mais encontrada infectados com *Leishmania* spp., com 36% do gênero *Didelphis* sp. e 32% de *Micoureu* sp. (94).

Os hospedeiros vertebrados da LT incluem grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos, como roedores (*Rattus rattus*, *Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) canídeos (*Canis familiaris*, *Cerdocyn thous*, *Speothos venaticus*), felídeos (*Felis catus*), Xenarthras (*Tamandua tetradactyla*, *Bradypus variegatus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e equídeos (*Equus caballus*, *E. asinus*) (68, 95-8). Em áreas urbanas de Manaus, verificaram alta prevalência de gambás infectados (61,9%) apontando-os como principais reservatórios de leishmaniose tegumentar (99).

1.1.4.3. Vetores

A leishmaniose é transmitida pelo vetor do gênero *Phlebotomus*, porém no Velho

Mundo (África, Ásia e Europa), as principais envolvidas no ciclo de transmissão da LV são as espécies *Phlebotomus argentipes*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus neglectus* (100), no Novo Mundo (América Sul e Norte), exceto Colômbia, a principal espécie é o *Lutzomyia longipalpis* (101). A espécie *Lutzomyia cruzi* (102) e *Lutzomyia migonei* também estão envolvidas da transmissão da doença (103). No Brasil, duas espécies até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira é considerada a principal espécie transmissora da *L. infantum* (syn. *chagasi*) no Brasil e *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (104).

A LT apresenta diversas espécies de flebotomíneos como vetores no Brasil, sendo as principais identificadas: *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *antunesi*, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani*, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* e *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *umbratilis* (105).

1.1.5. Tripanossomíases

O gênero *Trypanosoma* foi formado para classificar um hemoflagelado de *Rana esculenta* (rã) na Europa, denominado *Trypanosoma sanguinis*. Desde então, várias espécies de tripanossomas têm sido descritas em grande número de hospedeiros vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), vetores invertebrados e plantas (37, 106).

Apresentam em seu ciclo de vida diversas formas, tais como, amastigota, epimastigota, tripomastigota e, raramente, promastigota que são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (106). As formas tripomastigotas são encontradas nos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) e invertebrados (tripomastigotas metacíclicos). As outras formas são espécies dependentes, ou seja, ocorre nos vertebrados (amastigotas intracelulares) e invertebrados (promastigotas e epimastigotas) (106).

Os subgêneros *Duttonella* (espécie - tipo *Trypanosoma vivax*), *Trypanozoon* (*Trypanosoma brucei*), *Pycnomonas* (*Trypanosoma suis*) e *Nannomonas* (*Trypanosoma congolense*), que abrangem todos os tripanossomas africanos patogênicos para mamíferos. *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi* adaptaram-se à transmissão mecânica, portanto são as únicas espécies deste grupo que ocorrem fora do continente Africano, inclusive nas Américas. *Trypanosoma equiperdum* considerado doença venérea por transmissão direta

(106, 107). Já os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*Trypanosoma lewisi*) e *Megatrypanum* (*Trypanosoma theileri*) (106), apresentam ampla distribuição geográfica. No entanto, algumas espécies como *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) e *Trypanosoma rangeli* (*Herpetosoma*) são encontradas apenas nas Américas (106, 118). Na grande maioria das espécies desta secção não são patogênicas para seus hospedeiros vertebrados e não infecta o homem, com exceção de *T. cruzi* e poucos casos relatados em humanos de infecção por *Trypanosoma lewisi*-“like” e *T. rangeli* (109).

O subgênero *Herpetosoma* compreende tripanossomas que normalmente não são patogênicos para seus hospedeiros mamíferos. As principais espécies são *T. lewisi*, parasita de rato e animais silvestres, e *T. rangeli*, constituído por isolados humanos, triatomíneos e animais silvestres (108). *T. rangeli* e *T. cruzi* infectam mamíferos de praticamente todas as ordens, parasitando o homem, roedores, morcegos, marsupiais, xenarthras e primatas não-humanos. No Brasil, *T. rangeli* foi encontrado em diferentes mamíferos e triatomíneos, principalmente na Amazônia onde foram descritos os únicos casos humanos nesse país (110, 111, 112).

O subgênero *Megatrypanum* possui grande diversidade de espécies de tripanossomas e hospedeiros mamíferos e invertebrados. Foram descritos em mamíferos domésticos e silvestres (Artiodactyla, Rodentia, Marsupialia, Chiroptera, Xenarthra e Primata). A principal espécie é *Trypanosoma theileri*, encontrada em bovídeos e cervídeos no mundo todo (113).

O subgênero *Duttonella* compreende a espécie *T. vivax*, responsável pela mortalidade e morbidade em bovinocultura causando prejuízos à saúde animal e a produtividade da pecuária, pois trata-se de um patógeno de maior importância econômica e maior extensão geográfica, pois atinge África e América do Sul (114, 115, 116).

Nas Américas os tripanossomas são responsáveis por ocasionar a Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, na África são responsáveis pela Doença do Sono ou Tripanossomíase Africana (117).

A Tripanossomíase Humana Africana ocorre em 36 países da África Sub-Sahariana, é transmitida pelo vetor do gênero *Glossina*, popularmente conhecida por tsé-tsé e apresenta duas formas, epimastigotas quando são encontradas no inseto vetor e tripomastigota no organismo do hospedeiro. Na África Ocidental e Central, o agente etiológico responsável é *Trypanosoma brucei gambiense*, quando na África Oriental e Austral o responsável é *Trypanosoma brucei rhodesiense* (118). *Trypanosoma brucei brucei* é responsável pela doença

nagana ou Tripanossomíase Animal em ruminantes domésticos e silvestres (119).

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, e um dos tripanossomas do subgrupo Stercoraria mais conhecido e que foi descrito pela primeira vez em 1909 pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas (120). Sua transmissão, ocorre por meio do inseto vetor triatomíneo, também conhecido por Barbeiro de acordo com a região, sendo a principal espécie *Triatoma infestans* (121).

A Doença de Chagas é classificada como 17ª das doenças tropicais negligenciadas, acomete cerca de oito milhões de pessoas na América, e deste, três milhões ocorrem somente no Brasil (122). Esta doença é considerada endêmica em 21 países da América Latina; no entanto, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais detectada em EUA, Canadá, Europa, Austrália e Japão (123, 124).

1.1.5.1. Hospedeiros e vetores

Nas últimas décadas ocorreram intensas transformações ambientais favorecendo a adaptação de novas espécies de hospedeiros e vetores, que passaram a invadir o peridomicílio, onde encontrou condições favoráveis para sobreviver e colonizar, utilizando de fonte alimentar animais do peridomicílio (124, 125).

Triatomíneos, que vivem em lugares comuns a morcegos, como buracos de árvores e cavernas, palmeiras, forros de residências, tocas de animais silvestres, podem ser vetores de *T. cruzi* entre os quirópteros, haja vista que estes mamíferos se alimentam de insetos, a infecção pode ocorrer principalmente por via oral, após a ingestão dos vetores infectados. (126).

Eliminado do Estado de São Paulo no ano de 2000 (127), aproximadamente 44 espécies de triatomíneos foram identificados no Brasil, sendo as mais importantes nos estudos epidemiológicos, pois são espécies domésticas: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus* (128).

Casos de Doença de Chagas por transfusão sanguínea foram registrados em países não endêmicos sobretudo nos EUA e Europa (129). A mobilidade da população latino-americana para essas regiões pode ser um dos fatores para que casos da doença sejam relatados nesses locais (130).

As espécies de *Didelphis*, são reservatórios de maior importância, devido sua ampla

distribuição e por viverem próximos ao peridomicílio (131). Porém, outros animais também podem ser infectados com o parasita, tais como: animais domésticos (132, 133,134) e animais silvestres (135, 136, 137).

O diagnóstico para tripanossomatídeos pode ser realizado por meio de exame parasitológico direto, pela visualização do agente em esfregaço sanguíneo, do xenodiagnóstico, do isolamento em meio de cultura, detecção molecular e sorológica (138, 139, 140).

Assim, a identificação de animais silvestres infectados por tripanossomatídeos é importante para monitorar a ocorrência dos mesmos em uma determinada região e estabelecer indicadores ambientais facilmente mapeáveis, permitindo a identificação das áreas de risco à infecção, pois estes atuam como marcadores epidemiológicos para a presença do microrganismo, indicando a existência de fontes de infecção para humanos e animais (141).

Objetivo

1.2. Objetivo

Pesquisar *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. em amostras de órgãos (pulmão, fígado, baço, pele e coração) de animais silvestres mortos por atropelamento, procedentes do estado de Santa Catarina, pela técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase e sequenciamento genético, a fim de mapear e identificar áreas de risco para a infecção humana.

Referências

1.3. Referências¹

1. Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Morner T, Tate CM. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech*. 2004;23(2):497-512.
2. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*. 2010; 468(7324):647-52.
3. Žegarac JP. Climate change: effects on the Incidence and distribution of infectious diseases [Internet]. 2017 [citado 18 Jan 2018]. Disponível em: <http://www.infectiousdiseaseadvisor.com/emerging-diseases/climate-change-and-infectious-disease/article/713190/>
4. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infection diseases. *Nature*. 2008;451(21):990-3.
5. Thompson RCA, Kutz SJ, Smith A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *Int J Environ Res Public Health*. 2009; 6:678-93.
6. Daszak P, Cunningham AA, Hyarr AD. Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*. 2000;287(5452):443- 9.
7. Smith-Patten BD, Patten MA. Diversity, seasonality, and context of mammalian roadkills in the southern Great Plains. *Environ Microbiol*. 2008;41(6):844-52.
8. Laurance WF, Goosem M, Laurance SG. Impacts of roads and linear clearings on tropical forests. *Trends Ecol Evol*. 2009;24:659-69.
9. Preston ND, Daszak P, Colwell RR. The human environment interface: applying ecosystem concepts to health. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;365:83-100.
10. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles communes al hombre y a los animales. 2a ed. Washington: OPS, WHO; 1986. (Publicación Científica; 503).
11. OIE, World Organization for Animal Health. Training manual on wildlife diseases and surveillance. Workshop for OIE National Focal Points for Wildlife [Internet]. 2010 [citado 15 Nov 2017]. Disponível em:

¹ Segundo normas Vancouver: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2009 [update 2009 May 12; cited 2009 Set 10]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd.uniform_requirements.html

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife.pdf.

12. Bidaisee S, Macpherson CN. Zoonoses and one health: a review of the literature. J Parasitol Res. 2014; 874345[8 pages]. doi: 10.1155/2014/874345.
13. Gebreyes WA, Dupouy-Camet J, Newport MJ, Oliveira CJ, Schlesinger LS, Saif YM, et al. The global one health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(11):3257.
14. Jenkins EJ, Simon A, Bachand N, Stephen C. Wildlife parasites in a one health world. Trends Parasitol 2015;31(5):174-80.
15. Dubey JP, Zarnke R, Thomasc NJ, Wong SK, Bonnd DWV, Briggs M, et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*- like infections in marine mammals. Vet Parasitol. 2003;116:275-96.
16. Barlett PC, Judge LJ. The role of epidemiology in public health. Rev Sci Tech. 1997;16(2):331-6.
17. Souza MJ. One health: zoonoses in the exotic animal practice. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 2011;14:421-6.
18. Akca A, Babur C, Arslan MO, Gicik Y, Kara M, Kilic S. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Horses in the Province of Kars, Turkey. J Vet Med. 2004;49(1):9-13.
19. Fialho CG, Teixeira MC, Araujo FAP. Toxoplasmose animal no Brasil. Acta Sci Vet. 2009;37(1):1-23.
20. Silva BF, Sadovsky ADI, Barcelos AO, Paula B. Uma revisão sistemática sobre as formas de Infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Nat on Line. 2007;5(2):63-7.
21. Acosta ICL, Costa AP, Gennari SM, Marcili A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild and domestic animals in an Atlantic rainforest fragment and surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil. J Med Entomol. 2014;51(3):686-93.
22. Trombulak SC, Frissell CA. Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. Conserv Biol. 2000;14(1):18-30.
23. Steil L, Düpont A, Lobo E. Levantamento da fauna silvestre atropelada na BR 290 (Km 210 a 214), município de Pântano Grande, RS, Brasil. Cad Pesqui. 2016; 28(1):13-23.

24. Bissonette JA. Scaling roads and wildlife: the Cinderella principle. *Z Jagdwiss.* 2002;48:208-14.
25. Bager A, Fontoura V. Evaluation of the effectiveness of a wildlife road kill mitigation system in wetland habitat. *Ecol Eng.* 2013;53:31-8.
26. Bager A, Lucas PS, Bourscheit A, Kuczach A, Maia B. Os caminhos da conservação da biodiversidade brasileira frente aos impactos da infraestrutura viária. *Biodivers Bras.* 2016;6(1):75-86.
27. Vieira EM. Highway mortality of mammals in central Brazil. *Ciênc Cult.* 1996; 48(4):270-2.
28. Cândido Jr JF, Margarido VP, Pegoraro JL, D'amico AR, Madeira WD, Casale VC, et al. Animais atropelados na rodovia que margeia o Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil, e seu aproveitamento para estudos da biologia da conservação. In: *Anais do 3º Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação*; 2002; Fortaleza. Fortaleza; 2002. p. 553-62.
29. Cáceres NC, Casella J, Goulart CS. Variação espacial e sazonal de atropelamentos de mamíferos no bioma cerrado, rodovia BR 262, Sudoeste do Brasil. *Mastozool Neotrop.* 2012; 19(1):21-33.
30. Hegel CGZ. Mamíferos silvestres atropelados na rodovia RS-135 e entorno. *Biotemas.* 2012;25(2):165-70.
31. Sobanski MB. Avaliação do uso de controladores eletrônicos de velocidade como medida de mitigação de atropelamentos de animais silvestres na rodovia BR-262, trecho de Anastácio à Corumbá, Mato Grosso do Sul [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2016.
32. Ascensão F, Desbiez ALJ, Medici EP, Bager A. Spatial patterns of road mortality of medium-large mammals in Mato Grosso do Sul, Brasil. *Wildl Res.* 2017;44(2):135-46. doi: 10.1071/WR16108.
33. Cheadle MA, Tanhauser SM, Dame JB, Sellon DC, Hines M, Ginn PE, et al. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. *Int J Parasitol.* 2001;31(4):330-5.
34. Nelder MP, Reeves WK. Ectoparasites of road-killed vertebrates in northwestern South Carolina, USA. *Vet Parasitol.* 2005;129(3):313-22.

35. Griese J. Helmintofauna de vertebrados atropelados em rodovias da região de Botucatu, São Paulo [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2007.
36. Ferroglio E, Ragagli C, Trisciuglio A. *Physaloptera sibirica* in foxes and badgers from the Western Alps (Italy). Vet Parasitol. 2009;163(1):164-66.
37. Hoppe EGL, Araújo de Lima RC, Tebaldi JH, Athayde ACR, Nascimento AAD. Helminthological records of six-banded armadillos *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758) from the Brazilian semi-arid region, Patos county, Paraíba state, including new morphological data on *Trichohelix tuberculata* (Parona and Stossich, 1901) Ortlepp, 1922 and proposal of *Hadrostrongylus ransomi* nov. comb. Braz J Biol. 2009;69(2):423-8.
38. Miquel J, Foronda P, Torres J, Swiderski Z, Feliu C. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), an intestinal parasite of *Felis catus* from La Palma (Canary Islands, Spain) Parasitol Res. 2009;104(6):1477-83.
39. Sepulveda MS, Kinsella JM. Helminth collection and identification from wildlife. J Vis Exp. 2013;82:1-5.
40. Frölich K, Thiede S, Kozikowski T, Jakob W. A review of mutual transmission of important infectious diseases between livestock and wildlife in Europe. In: Gibbs EP, Bokma BH, editor. The domestic animal/wildlife interface issues for disease control, conservation, sustainable food production, and emerging diseases. New York: New York Academy of Sciences; 2002. v. 969, p. 4-13.
41. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Bagagli E. Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2010;16(4):607-13.
42. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. Med Mycol. 2008;46(1):35-40.
43. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Pedrini SCB, Rosa PS, et al. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. BMC Res Notes. 2009;2:1-6.

44. Miró G, Troyano A, Montoya A, Farinas F, Fermín ML, Flores L, Rojo C, Checa R, Gálvez R, Marino V, Fragío C, Martínez-Nevado E. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 11:185, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2772-1>
45. Oleaga A, Zanet A, Espí A, Macedo MRP, Gortázar C, Ferroglio E. *Leishmania* in wolves in northern Spain: A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. *Veterinary Parasitology*, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.015> of the State of São Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2014;20(1):1.
46. Richini-Pereira VB, Marson PM, Hayasaka EY, Victoria C, da Silva RC, Langoni H. Molecular detection of *Leishmania* spp. in road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2014;20(1):1.
47. Richini-Pereira VB, Marson PM, Silva RCD, Langoni H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in road-killed wild mammals from the Central Western Region of the State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49(5):602-7.
48. Losnak DO, Rocha FR, Almeida BS, Batista KZS, Althoff SL, Haupt J, et al. Molecular detection of important fungi for public health in Brazilian wild animals. *Mycosis*. Forthcoming 2017.
49. Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol*. 1992; 141:65-88.
50. Cavalier-Smith T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett*. 2010;6:342-5.
51. Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. *Progress in protozoology*. New York: Academic Press; 1963. p. 68.
52. Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol*. 1966;18:124-93.
53. Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen WHR, Evans DA. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic Press; 1976. p. 1-34.

54. Camargo EP. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1998;42:29-112.
55. Teixeira MMG, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CSA, Campaner M, et al. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist.* 2011;162:503-24.
56. World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. 2015 [citado 9 Nov 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
57. World Health Organization. 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases [Internet]. 2006 [citado 9 Nov 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/leishmaniasis.html>
58. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(3):239-43.
59. Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 2003; 49:31-8.
60. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:239-51.
61. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
62. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* 1999;119:237-46.
63. Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Marangi M, Grande RU, Armignacco O, et al. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: implications for a European endemic country. *Plos One.* 2015 ;10(6):e0129418.
64. Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas [Internet]. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017 [citado 19 Maio 2017]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754

65. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30:1269-81.
66. World Health Organization. Leishmaniasis: the global trend [Internet]. Geneva; 2009 [citado 9 Nov 2017]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html.
67. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2a ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007. p. 182.
68. Jesus JR, Araújo FAP. Leishmaniose tegumentar americana: uma visão da epidemiologia da doença na região sul. *Clin Vet.* 2007;71:82-84.
69. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Leishmaniose Tegumentar Americana: situação atual [Internet]. São Paulo: SUCEN [citado 10 Fev 2017]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controlededeendemias/programas/leishmaniose-tegumentar-americana/situacao-atual>
70. Ministério da Saúde (BR). Leishmaniose Tegumentar: dados epidemiológicos [Internet] [citado 10 Fev 2017]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LTGraficos-e-Mapas.pdf>
71. Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. Orientação sobre medidas da leishmaniose visceral [Internet]. 2017 [citado 18 Jan 2018]. Disponível em: http://portalses.saude.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=5813:divesc-orienta-sobre-medidas-da-leishmaniose-visceral&catid=1417:ascom-assessoria-de-comunicacao-2017.
72. Redação Notícia do Dia. Terceiro caso de leishmaniose visceral [internet]. 2017 [citado 18 Janeiro 2018]. Disponível em: <https://ndonline.com.br/florianopolis/noticias/florianopolis-registra-terceiro-caso-autoctone-de-leishmaniose-visceral-humana>.
73. Fundação Oswaldo Cruz. Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania* sp. em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC [Internet]. 2010 [citado 18 Jan 2018]. Disponível em:

http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/29_12_2010_11.21.59.e3fa4a5734524ccf230fae0763a37b75.pdf

74. Neves DP. Parasitologia humana. 12a ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
75. Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Neto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(7):861-70.
76. Galardo AKR, Galardo CD, Silveira GA, Ribeiro KAN, Hijjar AV, Oliveira LL. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae): potential vectors of American cutaneous leishmaniasis agents in the area associated with the Santo Antônio Hydroelectric System in western Amazonian, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2015; 48(3):265-71.
77. Gushi LT. Estrutura populacional de *Lutzomyia longipalpis* através da amplificação e sequenciamento do segmento ribossomal 12s de DNA mitocondrial [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2008.
78. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saúde Pública. 2008; 24(12):2948-52.
79. Cardoso RM, Araújo NNSL, Romero GAS, Souza TTCM, Dietrich AG, Mendes JD, et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. Parasite Vector. 2015;8:171. doi: 10.1186/s13071-015-0780-y.
80. Jusi MMG, Starke-Buzetti A, Oliveira TMFS, Tenório MS, Souza LO, Machado RZ. Molecular and sorological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011;20(3): 219-22.
81. 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) amazonenses*. Rev Bras Parasitol Vet. 2017;26(1): 17-27.
82. Luppi MM, Malta MC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I, et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet Parasitol. 2008;155(1-2):146-51.
83. Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Le Blancq S, Evans DA, et al. Enzymatic typing of 11 strains of *Leishmania* isolated, in mainland Italy from the visceral murine, canine and vulpine forms: demonstration of an enzymatic variant in the fox (*Vulpes vulpes*) and the dog. Ann Parasitol Hum Comp. 1982;57:527-31.

84. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AAA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: Isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae) no estado do Pará, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991;33(1):18-22.
85. Savani ESMM, Oliveira Camargo MCG, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Auria SRM, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;120(3):229-33.
86. Alves-Martins MF. Detecção de tripanosomatídeos em gatos domésticos de região endêmica para leishmaniose visceral por técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP; 2017.
87. Voltarelli EM, Arraes SMAA, Perles TF, Lonardoni MVC, Teodoro U, SilveiraTGV. Serological survey for *Leishmania* sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2009;15(4):732-44.
88. Deane LM. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores no Estado do Ceara. Rio de Janeiro: Serviço Nacional Educação Sanitária; 1956.
89. Figueiredo FB, Gremião IDF, Pereira SA, Fedulo LP, Menezes RC, Balthazar DA, et al. First report of natural infection of a bush dog (*Spheotos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102:200-1.
90. Tenório MS, Sousa LO, Paixão MS, Alves MF, Paulan SC, Lima FL, et al. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. J Zoo Wildl Med. 2011; 42:608-16.
91. Di Bella C, Vitale F, Russo G, Greco A, Milazzo C, Aloise G, et al. Are rodents a potential reservoir for *leishmania infantum* in Italy?. J Mt Ecol. 2003;7:125-9.
92. Câmara T, Murta R. Mamíferos da Serra do Cipó. Belo Horizonte: PUC Minas, Museu de Ciências Naturais; 2003.
93. Quintal AP, Ribeiro ES, Rodrigues FP, Rocha FS, Floeter-Winter LM, Nunes CM. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. Vet Parasitol. 2011;176(2-3):112-9.
94. Paiz LM, Fornazari F, Menozzi BD, Oliveira GC, Coiro CJ, Teixeira CR, et al. Serological Evidence of Infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania*

- (*Leishmania*) *chagasi*) in Free-Ranging Wild Mammals in a Nonendemic Region of the State of São Paulo, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 2015;15(11):1-7. [https:// doi: 10.1089/vbz.2015.1806](https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1806).
95. Trueb I, Portela RD, Franke CR, Carneiro LO, Ribeiro Jr GJ, Soares RP, et al. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. Infection in wildlife from urban rainforest fragments in Northeast Brazil. J Wildl Dis. 2018;54(1):76-84.
 96. Jesus JR, Araújo FAP. Leishmaniose tegumentar americana: uma visão da epidemiologia da doença na região sul. Clin Vet. 2007;71:82-4.
 97. Hertig M, Fairchild GB e Johnson CM. Leishmaniasis transmission-reservoir project. Ann Rep Gorgas Mem Lab. 1957: 9-11.
 98. Pereira AAS, Ferreira EC, Lima ACVMR, Tonelli GB, Rêgo FD, Paglia AP, et al. Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. PLoS One. 2017;12(11):e0187704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187704>
 99. Ferreira EC, Cruz I, Cañavate C, Melo LA, Pereira AAS, Madeira FAM, et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. Vet Res. 2015;11(71):1-7.
 100. Arias JR, Naiff RD. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban area of Manaus, Central Amazon of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1981; 76:279-86.
 101. Sacks DL, Lawyer P, Kamhawi S. The biology of *Leishmania* - sand fly interactions. In: Myler P, Fasel N, editores. *Leishmania: after the genome*. London: Caister Academic Press Norfolk; 2008. p. 205-38.
 102. Galati EAB, Nunes LB, Rego JR FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saúde Pública. 1997;31(4):378-90.
 103. Harhay MO, Oliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Ur/ban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol. 2011;27(9):403-9.
 104. Silva RA, Santos FKM, Souza LC, Rangel EF, Bevilaqua CML. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei* in na endemic area for visceral leishmaniasis. Braz J Vet Parasitol. 2014;23(3):320-7.

105. Marcondes CB. Doenças transmitidas e causadas por artrópodes. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 557.
106. Costa DL, Costa CHN. Parte VI – espectro clínico das Leishmanioses- Leishmaniose Visceral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2014. p. 327.
107. Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the Systematics. J Protozool. 1964;11(2):200-7.
108. Stevens J, Gibson W. The evolution of Salivarian Trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(2):225-8.
109. Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae - *Trypanosoma cruzi* / *T. rangeli*: Vector-parasite interactions. Acta Trop. 2009;110:137-47.
110. Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi-like* (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. J Med Microbiol. 2007;56:1118-21.
111. Coura JR, Fernandes O, Arboleda M. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996;90:278-9.
112. Maia SF, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brígido MC, Junqueira ACV, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. Parasitology. 2004;128:283-94.
113. Maia SF, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. Parasitology. 2004;129(5):549-61.
114. Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
115. Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. Trends Parasitol. 2010;26(7):324-8.
116. Gardiner P, Wilson A. *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*. Parasitol Today. 1987;3(2):49-52.
117. Gardiner P. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. Adv Parasitol. 1989;28:229-317.

118. Barret M, Burchmore R, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiasis. Lancet. 2003;362(9394):1469-80.
119. World Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis) [Internet]. Geneva; 2016 [citado Out 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
120. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. Lancet. 2010;375(9709):148-59.
121. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) – fact sheet (revised in August 2012). Wkly Epidemiol Rec. 2012;87(51/52):519-22.
122. World Health Organization. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness) [Internet]. Geneva; 2016 [citado 5 Nov 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en>.
123. Ministério da Saúde (BR). Portal da Saúde. Doença de Chagas [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2016 [citado 8 Nov 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>.
124. Bonney KM. Chagas Disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat?. Parasite. 2014;21:11.
125. Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da tripanossomose americana e suas consequências. Rev Soc Bras Med Trop. 1967;1:167-74.
126. Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:962-7.
127. Marinkelle CJ. Biology of the trypanosomes of bats. In: Lumsden WHR, Evans DA. Biology of the kinetoplastida. London: Academic Press; 1976. v. 1, p. 175-216.
128. Ramos Jr AN, Carvalho DM. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. Cad Saúde Pública. 2001;17:1403-12.
129. Coura JR. Tripanossomose, doença de Chagas. Cienc Cult (São Paulo). 2003; 55:30-3.
130. Assal A, Corbi C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: um problème parasitaire émergent les pays non endémiques. Transfusion Clin Biol. 2011;18:286-91.
131. Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. Acta Trop. 2016;156:68-78.

132. Lucheis SB, Da Silva AV, Araújo Jr JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005;11(4):492-509.
133. Eloy LJ, Lucheis SB. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2009;15(4):589-611.
134. Troncarelli MZ, Lucheis SB, Camargo JB, Machado JG, Langoni H. Análise clínica e laboratorial em cães eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP, com vista ao diagnóstico de leishmaniose visceral (LV). *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009;16(2):343-53.
135. Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da tripanossomose americana e suas consequências. *Vet Soc Bras Med Trop*. 1967;1(4):167-74.
136. Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Vet Parasitol*. 2014;203(1-2):203-6.
137. Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95:445-52.
138. Deane LM. Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. I – Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1961;3(1):15-28.
139. Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Adab-Franch F, Carranza JC, et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004;46:323-30.
140. Valadas S, Gennari SM, Yai LEO, Rosypal AC, Lindsay DS. Prevalence of Antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in Capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from São Paulo State, Brazil. *J Parasitol*. 2010;96:521-4.
141. Canteros CE, Iachini RH, Rivas MC, Vaccaro O, Madariaga J, Galarza R, et al. First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*. *Rev Argent Microbiol*. 2004;37(1):46-56.

Manuscrito

Spatial analysis and molecular detection of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in road-killed wild rodents in Santa Catarina State, Brasil.

Aghata Regina de Oliveira Alves Palmeira¹; Natassia Carolina Esposito Rosa¹; Debora de Oliveira Losnak¹; Francielle Ramalho Rocha²; Barbara Suares de Almeida²; Laís Anversa ²; Laís Moraes Paiz³; Mirian dos Santos Paixão⁴; Simone Baldini Lucheis⁴; Keila Zaniboni Siqueira Batista⁵; Sergio Luiz Althoff⁵; Josiane Haupt⁶; Virgínia Bodelão Richini-Pereira²

¹Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu Medical School, Paulista State University - UNESP; District of Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brazil.

²Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory of Bauru, SP, Brazil, Rubens Arruda St., 6. Altos da Cidade, Bauru, SP 17015-110, Brazil

³Department of Public Health, School of Medical Sciences, State University of Campinas—UNICAMP, Campinas, Brazil

⁴Paulista Agency of Agrobusiness Technology – APTA, Bauru, Brazil, Rodrigues Alves Av., Horto Florestal, Bauru, SP 17030-000, Brazil

⁵Laboratory of Immunology, Department of Natural Sciences, Regional University of Blumenau, Blumenau-SC, Brazil.

⁶Laboratory of Animal Biology, Department of Natural Sciences, Regional University of Blumenau, Blumenau-SC, Brazil.

⁶Autonomous biologist, Blumenau-SC, Brazil.

Corresponding author:

Virgínia Bodelão Richini Pereira (virichini@yahoo.com.br)

Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory of Bauru

Street: Rubens Arruda St., 6. – Bauru – SP - Brazil

CEP: 17015-110

Phone +55 14 32350209

Fax +55 14 3223 1002

Keywords: Trypanosomatids, wild animals, rodents, PCR.

Journal: Veterinary Parasitology

Abstract

The family Trypanosomatidae of the order Kinetoplastida such as *Trypanosoma* and *Leishmania*, is characterized by unflagellated protozoa and can causes disease in mammals. Road-killed wild animals represent a large problem of wildlife preservation, however a feasible and efficient alternative for eco-epidemiologic studies is the molecular detection of microorganisms. A total of 1063 tissue samples of 297 wild animals were collected from the roads of Santa Catarina, Brazil, using Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of protozoa of the Trypanosomatidae family. PCR were performed by employing the primers for the ribosomal region ITS-1 (LITSR and L5.8S) and ITS-2 (LITSV and L5.8SR), and presented 12 positive samples from seven wild animals. In addition, were used primers of the kinetoplast region or kDNA of the parasites *L. infantum* (LCS1 and LCS3) and *Trypanosoma cruzi* (TCZ1 and TCZ2), in which all samples were negative. Genetic sequencing was performed from the positive samples and nine samples from five animals showed similarity between 79% and 100% with *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma* spp. The animals were, *Oxymycterus* sp. (marsh rat), *Scapteromys* sp. (water rat), *Nectomys squamipes* (water rat) and two *Oligoryzomys* sp. (bush rat). Our results demonstrate the presence of trypanosome in wild animals, which are susceptible to infection by these parasites. It is extremely important for epidemiologic studies to know the species that circulate in a certain area. From the spatial analysis, it can be seen that the trampling areas show few areas of forest cover, which provides the displacement of animals and the transport of zoonotic infectious agents.

Highlights

- Large occurrence of road-killed wild animals.
- Studies with road-killed wild animals is an alternative for the elucidation of the epidemiology of diseases of interest in public health.
- Circulation of trypanosomatids in the wild animals in regions of Santa Catarina.

1. Introduction

According World Health Organization (WHO), zoonoses are the common diseases and / or infections between animals and humans whose transmission may occur from one to the other. They are transmitted directly or indirectly by animals, their derived products (meat, milk, eggs) and the environment. In this scenario, the risk of transmission of zoonotic diseases is higher. WHO reports that 61% of the 1,415 worldwide known human pathogens are zoonotic and approximately 70% of the emerging human etiological agents are of animal origin (WHO, 2016).

Neglected tropical diseases (NTDs) are diseases caused by infectious and parasitic agents that affect low-income populations in developing countries and contribute to the maintenance of social inequality (Souza, 2010). In this scenario, dengue, Chagas disease, schistosomiasis, leprosy, tuberculosis and leishmaniasis occur endemic in Brazil (MS, 2010). According to WHO, more than one billion people are infected with one or more neglected diseases, representing one-sixth of the world's population (WHO, 2016).

Leishmaniasis is caused by several species of protozoans that affect humans. This protozoan belong to the order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae and genus *Leishmania*. It can present several clinical forms, according to the species involved and the relation between and host (Gontijo; Carvalho, 2003). Among these forms, the mucocutaneous, cutaneous or tegumentary and visceral (Longoni et al., 2012). Reserches indicate that *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia cruzi* are the main sand-fly species involved in the transmission cycle of Leishmaniasis in Brazil (MS, 2006).

Visceral leishmaniasis (LV) presents a clear geographical expansion and increasing urbanization, with a growing number of cases, in the South region of Brazil, and with the identification in humans and domestic dogs (Heusser Jr. et al. 2010; Figueiredo et al., 2012).

Another member of the Trypanosomatidae family is the protozoan belonging to the genus *Trypanosoma*, presenting a very complex life cycle involving vertebrate hosts and vector insects (Tirlens and Hellemond, 1998).

The transmission of trypanosomes occurs mainly by the insect vector triatomine, of different species, which vary according to the region where it is found (Lukes, 2009; Raimundo; Massad; Yang, 2010). In Brazil, the main species of triatomines of great epidemiologic importance are *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma*

pseudomaculata and *Panstrongylus megistus*, (Assal; Corbi, 2011).

Epidemiologic research points to great susceptibility of humans and domestic animals, since anthropic environmental modification became a problem, that is, the domiciliation of vectors, disarticulated from their original wild ecotypes, and the adaptation of wild vertebrates, as marsupials and rodents to artificial ecotypes (Walter, 2003). The importance of mammals in the *T. cruzi* wild cycle is highlighted by several authors (Wells et al., 1981; Fujita et al., 1994; Cortez et al., 2006), therefore it is important to know the role of wild animals in epidemiology of the disease.

The road-killed animals may offer opportunities for eco-epidemiologic studies of microorganisms of interest in public health, in which molecular techniques can be used in the identification and screening of pathogens by techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), with the use of specific primers, which present high specificity and sensitivity for the amplification of a particular pathogen-specific DNA fragment (Persing et al., 1993). Therefore, the aim of this study was to evaluate the occurrence of trypanosomatids in samples of road-killed wild animals (rodents) from the state of Santa Catarina using the conventional Polymerase Chain Reaction molecular technique in order to identify and map areas of risk for human infection in an area that has not been evaluated yet.

2. Material and Methods

2.1. Location of the study

The State of Santa Catarina (SC) is located in the center of the southern Brazil, which capital is Florianópolis (Figure 1). The State has humid subtropical climate, with temperatures ranging from 13° C to 25° C, and rains well distributed throughout the year. It has beaches, dunes, mangroves, restingas and Atlantic forest (Naka et al., 2002).



Figure 1: Map highlighting the location of the State of Santa Catarina, Brazil. Source: <http://www.sogeografia.com.br/Conteudos/Estados/SantaCatarina/>

2.2. Animals of the study

We analyzed a total of 1,063 samples from 297 road-killed wild animals collected on the roads of the 38 counties of Santa Catarina (SC), Brazil (Figure 2; Table 1). Animals were collected only from animals with estimated time of death between one to seven hours and if they were preserved and had not completely disfigured. When collected, animals were packed in plastic bags, labeled with sex, date, city and location where they were found. The geographical positions of the road-killed animals were established using Google Maps. Animals were necropsied and fragments of organs such as skin, liver, heart, spleen and lungs were collected and frozen at -70°C .

This study was approved by the Animal Experiments Ethics Committee of the Adolfo Lutz Institute (CEUA nº 02/2015) and by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO nº 50785-3).

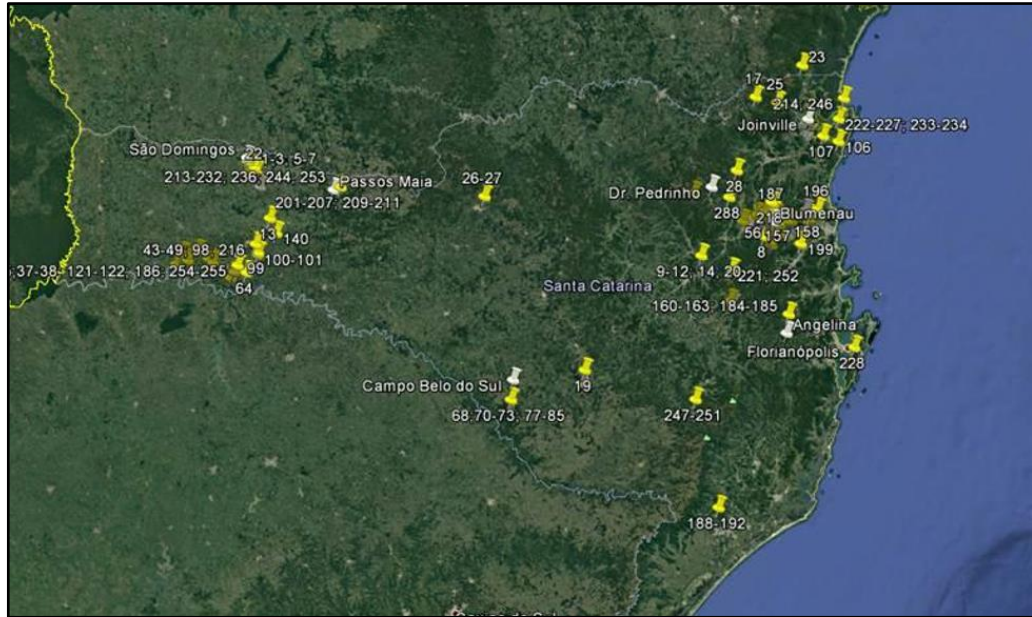


Figure 2: Geographic location of the 297 road-killed wild animals. Santa Catarina, Brazil.

Table 1. List of the 297 road-killed wild animals. Santa Catarina, Brazil.

Ordem	Family	Species	Number of animals
Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama</i> spp. (Veado)	2
		NI	1
Carnívora	Canidae	<i>Cerdocyon thous</i> (Cachorro-do-mato)	5
	Felidae	<i>Leopardus wiedii</i> (Gato-maracajá)	1
		<i>Puma yagouaroundi</i> (Gato-mourisco)	1
		<i>Galictis cuja</i> (Furão)	1
	Mustelidae	<i>Galictis</i> spp. (Furão)	1
		<i>Lontra londicaudis</i> (Lontra)	3
	Procyonidae	<i>Nasua nasua</i> (Quati-de-cauda-anelada)	2
		<i>Procyon cancrivorus</i> (Mão-pelada)	2
Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i> (Tatu galinha)	1
		<i>Euphractus sexcinctus</i> (Tatu peba)	2
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i> (Gambá-da-orelha-branca)	12

		<i>Didelphis aurita</i> (Gambá-da-orelha-preta)	3
		<i>Didelphis</i> spp. (Gambá)	2
		<i>Gracilinanus microtarsus</i> (Cuíca)	2
		<i>Gracilinanus</i> spp. (Cuíca)	3
		<i>Lutreolina crassicaudata</i> (Cuíca-de-cauda-grossa)	1
		<i>Micoureus paraguayanus</i>	2
		<i>Monodelphis</i> spp. (Catita)	4
		<i>Philander frenatus</i> (Cuíca-de-quatro-olhos)	1
		<i>Philander</i> spp. (Cuíca-de-quatro-olhos)	2
Didelphimorphia	Marmosidae	<i>Micoureus</i> spp. (Marmosa)	1
Lagomorfa	Leporidae	NI	2
Piçpsa	Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i> (Tamanduá-mirim)	5
Primata	Atelidae	<i>Alouatta guariba</i> (Bugio)	1
	Callitrichidae	NI	1
Rodentia	Caviidae	<i>Cavia aperea</i> (Preá)	1
		<i>Cavia</i> spp. (Preá)	1
		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (Capivara)	2
	Cricetidae	<i>Akodon montensis</i> (Rato-do-chão)	6
		<i>Akodon</i> spp. (Rato-do-chão)	58
		<i>Brucepattersonius iheringi</i> (Rato-do-mato)	3
		<i>Brucepattersonius</i> spp. (Rato-do-mato)	3
		<i>Delomys</i> spp. (Rato-do-mato)	2
		<i>Euryoryzomys russatus</i> (Rato-do-mato)	4
		<i>Nectomys</i> spp. (Rato-d'água)	6
		<i>Nectomys squamipes</i> (Rato-d'água)	3

	<i>Oligoryzomys flavescens</i> (Rato-do-mato)	1
	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (Rato-do-mato)	5
	<i>Oligoryzomys</i> spp. (Rato-do-mato)	68
	<i>Oxymycterus</i> spp. (Rato-do-brejo)	12
	<i>Rhagomys</i> spp. (Rato-vermelho)	1
	<i>Scapteromys</i> spp. (Rato d'água)	1
	<i>Sooretamys angouya</i> (Rato-do-mato)	3
	<i>Thaptomys nigrita</i> (Rato-do-chão)	9
	<i>Thaptomys</i> spp. (Rato-do-chão)	2
	NI	7
Dasyproctidae	<i>Dasyprocta</i> spp. (Cutia)	1
Echimyidae	<i>Euryzygomatomys spinosus</i> (Guirá)	1
	NI	5
Erethizontidae	<i>Sphigurus</i> spp. (Ouriços-cacheiros)	1
	<i>Juliomys pictipes</i> (Rato-do-mato)	1
Muridae	<i>Nectomys</i> spp. (Rato-d'água)	1
Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i> (Ratão-do-banhado)	1
	<i>Guerlinguetus aestuans</i> (Caxinguelê)	1
Sciuridae	NI	1
NI	NI	22
Total		297

NI: Non identified

144

145

146

147 2.3. Molecular analysis

148

2.3.1. Extraction of DNA

Extraction of DNA from tissue samples was performed employing the Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare), according to the instructions of the manufacturer.

2.3.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

To detect the protozoa of the Trypanosomatidae family, *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi*, PCR was performed under the following conditions: each 0.2 mL reaction tube contained PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl), 1.6 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1U of Taq-polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0.2 µM of each primer, 1.0 µL of extracted DNA and 8.3 µL of ultrapure water. Amplification of the region ITS-1 (Internal Transcribed Spacer) and ITS-2 of ribosomal DNA of Trypanosomatidae family was accomplished by analyses of the coding genes ssU rRNA and 5.8S rRNA, using the following primers: LITSR and L5.8S; LITSV and L5.8SR respectively, according to El Tai et al. (2000). Amplification of the kDNA minicircle from *L. infantum* corresponding to amplification of the segment containing the specific region of the gene 18S rDNA using the following primers: LCS1 and LCS3, according to Neto et al. (2012). For amplification of fragments of the *T. cruzi* kDNA, the primers TCZ1 and TCZ2 were employed according to Virreira et al. (2003). Incubation was performed in a gradient thermocycler (Life technologies), and the amplification conditions and primers used can be visualized in table 2.

Table 2. Primers used and their respective cycling profiles.

Target		Sequence of Primers		Cycle
Família Trypanosomatidae	LITSR	5'CTGGATCATTTTCCGATG3'	95 °C-20 seconds	35x
			53 °C-30 seconds	
	L5.8S	5'TGATACCACTTATCGCACTT3'	72 °C-1 minutes	
			72 °C-6 minutes	
Família Trypanosomatidae	LITSV	5'AAGTGCG-ATAAGTGGTA3'	95 °C-2 minutes	30x
			95 °C-20 seconds	
	L5.8SR	5'ACACTCAGGTCTGTAAAC3'	53 °C-30 seconds	
			72 °C-1 minutes	
			72 °C- 6 minutes	
<i>Leishmania infantum</i>	LCS1	5'GCAATGCCAGCTACATATATG3'	94 °C -2 minutes	40x
			94 °C-30 seconds	
	LCS3	5'CAGCTTTTGGGTGGGTAACA3'	56 °C-30 seconds	
			72 °C-1 minutes	
			72 °C-2 minutes	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TCZ1	5'CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT3'	94 °C- 30 seconds	25x
			94 °C- 20 seconds	
	TCZ2	5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3'	57 °C- 30 seconds	
			72 °C- 30 seconds	
			72 °C- 3 minutes	

2.3.3. Agarose gel electrophoresis

Aliquots of 8.0 µL of each amplified product were added to 2.0 µL of reaction buffer ([0,25%] bromophenol blue, [0,25%] xylene cyanol, [30%] glycerol, [70%] Milli-Q water) and homogenized. The visualization of the amplicon was performed by 1.5% agarose gel electrophoresis contained 1.0 µL/mL of SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). The horizontal electrophoresis was performed in 1X TBE (89 nM Tris-HCl, 89 mM boric acid and 20 mM EDTA) for 60 minutes at 65 V. After run, the amplified products were visualized under an ultraviolet light (296 nm) using the transilluminator (Syngene, USA). The image was captured by a digital

documentation system.

2.3.4. Sequencing

The amplified products were purified and sent for genetic sequencing at the Institute of Biotechnology (IBTEC) of Paulista State University (UNESP) "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, São Paulo, Brazil. The obtained sense and antisense sequences were visualized (software Chromas 2.3.), as an electropherogram, were aligned by MEGA7 software (Kumar et al., 2016) and were submitted to BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> / BLAST), being compared to sequences deposited in GenBank.

3. Results and Discussion

In the last decade, the death of terrestrial vertebrates by run over has outweighed death by hunting in developing countries, and because of that the road-killed animals are considered a real threat to biodiversity (Hangemuhle; Cademartori, 2009). In Brazil, more than 475 million wild animals are road-killed per year (CBEE, 2018).

Animals cross the roads in search of food, migration and occupation of territory, and are exposed daily to the risk of being run over (Oliveira, 2011). According to Bager (2012), the main impacts to local biodiversity caused by roads and highways can be very abrupt (immediate habitat destruction) or chronic (long-term consequences).

In the present study, of the 297 wild animals collected, 194 were rodents (Family Cricetidae). Different from the study in BR-101 Sul, whose species was *Didelphis albiventris* (Family Didelphidae) and *Cerdocyon thous* (Family Canidae) (DNIT, 2012). In an earlier study, Cherem et al. (2007) collected 257 mammals from BR 116, BR 282 and BR 470 in the state of Santa Catarina and 2011 63 specimens of BR 101 animals were collected (Souza, 2011). In 2015, 81 wild animals from SC 400, SC 401 and SC 402 were collected, most of which were mammals (62.83%) (Martin, 2015).

According to the National Transportation Infrastructure Department (DNIT), on the BR-101/ RS / SC highway (33,408 km of extension), 1,096 animals are road-killed, on the BR-280 / SC (1,756 km), 495 animals and in the BR-470 / SC (738 km long) 133 animals run over. Currently, the DNIT execute 20 programs of Road-killed Fauna Monitoring.

In 5.514,63 km (6,1% of the 90.048 km) of federal highways (DNIT, 2017). According to the Brasília Environmental Institute (2010), several mitigating measures can be used to minimize the problem of road-killed animals, such as: speed reducers, signaling, and environmental education, landscape management in the vicinity of the road and fauna passage. Some contribute to a change of driver's habits, such as: signaling, speed reducers and the others to change animal habits, such as animal passages, air passages, fauna viaducts, elevated fences or driving fences.

In the course of BR-101 Sul, in part between Florianópolis / SC - Osório / RS, 21 passages were implemented in Rio Grande do Sul and 22 passages in Santa Catarina. The implantation of the passage of fauna and fence guides has been effective to the cross of wild animals, contributing to reduce trampling of BR-101 Sul, primarily for the mammal group (DNIT, 2012).

The State of Santa Catarina (SC) is located in the Atlantic Forest biome, and has less than 8% of its original cover (Pinto et al., 2006). With the environmental changes and ecological disorder there is a reduction of habitats, allowing contact between wild and domestic animals and humans, making it easier to disseminate infectious agents to new hosts (Ambrósio et al., 2013).

The Southern region now reports human cases of Visceral Leishmaniasis (VL), preceded by canine enzootia. Previously considered an intact state for visceral leishmaniasis, in 2010 Santa Catarina confirmed the first autochthonous cases of canine visceral leishmaniasis in Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012). After this confirmation of autochthony, the Municipal Health Department of Florianópolis, developed strategies of actions, in accordance with the guidelines of the Visceral Leishmaniasis Surveillance and Control Manual (MS, 2006)

In 2017, 3 autochthonous human cases were registered in Florianópolis (SES/SC, 2017), but wild animals can also be infected acting as reservoirs. A study carried out in the city of Florianópolis / SC, evaluated the prevalence and profiles of infection by *Leishmania* sp. in wild and synanthropic mammals in the town of Canto dos Araçás (Fiocruz, 2010). Unlike the present study, that after molecular analysis of the samples of the wild road-killed animal, were negative in the research of *L. infantum* using specific primers for the region minicircle DNAs of kDNA (LCS1 and LCS3). In a study by Donalisio et al. (2017), *Didelphis albiventris* were positive

for *L. (L) infantum* in southeastern Brazil in an area of environmental protection.

Molecular techniques can be employed in a variety of biological samples to amplify specific DNA fragments. In addition, they contribute to the understanding of the complex cycle of leishmaniasis, both in aspects related to infection in wild and domestic reservoirs, and in the detection and identification of the parasite in invertebrate hosts (Silva; Gontijo; Melo, 2005).

12 (1.13%) of 1063 samples analyzed tissues of organs from the wild animals killed in roads were positive when subjected to PCR to search the parasites Trypanosomatidae family. These were collected in four municipality, Blumenau, Campo Belo do Sul, São Francisco do Sul and Balneário Barra do Sul Ten (0.94%) of these samples were positive using LITSR and L5.8S primers that amplify the ITS-1 region and seven (0.66%) samples using LITSV and L5.8SR primers that amplify the ITS-2 region. (Figure 3 and Table 3). Guiraldi et al., in 2016 presented positivity in 97.4% of non-human primate blood samples using the same primers from the ITS-1 region. Species of *Leishmania* spp. were identified in *Didelphis albiventris* in the Southeast of Brazil (Paiz et al., 2016).



Figure 3: Geographic location of the positive wild animals. Santa Catarina, Brazil. Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Santa_Catarina, modificações.

264

Table 3. Positive samples for Trypanosomatidae family submitted to PCR, from tissues of organs from the animals killed in roads from Santa Catarina, Brazil.

Species	Organs	Animals	Target
<i>Oxymycterus</i> sp. (rato do brejo)	Liver	A73	ITS-1/ ITS-2
	Heart		ITS-2
	Skin		ITS-1/ ITS-2
<i>Scapteromys</i> sp. (rato d'água)	Liver	A74	ITS-1 /ITS-2
	Spleen		ITS-1
	Heart		ITS-2
	Lung		ITS-1
<i>Oligoryzomys</i> sp. (rato do mato)	Liver	A75	ITS-1/ ITS-2
<i>Oligoryzomys</i> sp. (rato do mato)	Heart	A106	ITS-1
<i>Nectomys squamipes</i> (rato d'água)	Liver	A223	ITS-1
<i>Oligoryzomys</i> sp. (rato do mato)	Lung	A224	ITS-1
Sagui (NI)	Liver	A229	ITS-1/ ITS-2

NI: Non identified

265

266

267 The chagasic infection was responsible for approximately 16,000 deaths per year and
 268 for 10,000 to 20,000 new cases that emerged in Brazil in the 1970s and 1980s (Reich et al.,
 269 1996; 1998, Westphalen et al., 2012). Chagas' disease causes many losses in productivity, in
 270 addition to early deaths, there is a high medical cost (treatments, hospital admissions,
 271 surgeries, use of pacemakers), and the WHO considers it a permanent challenge for public
 272 health (Argolo et al., 2008; Zetun et al., 2014).

273 In Brazil, there are more than 60 species of triatomines identified, including *Triatoma*

infestans, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* and *Panstrongylus megistus*, which are considered triatomines of great epidemiological importance (128). In Santa Catarina, four species of wild vectors *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius domesticus*, *Triatoma tibiamaculata* and *Triatoma sordida* can be found, which are involved in the maintenance of the wild cycle of *T. cruzi* (Fiocruz, 2014).

The State of Santa Catarina is considered to be an intact area for Chagas disease through vector transmission by two epidemiological aspects: No autochthonous transmission and no domiciliary triatomine (Dive, 2017). In 2005, there was an outbreak of the disease by oral transmission (possibly ingestion of sugarcane juice) involving 23 people. The Sanitary Surveillance of the State has determined an operation to suspend the sale of sugarcane juice throughout Santa Catarina State (Pereira, 2010).

The first autochthonous case of American trypanosomiasis in the state of Santa Catarina was reported by Oliveira (1970). The diagnosis was made through serological tests where the trypanosome was found in the peripheral blood, but it was not explained how the transmission occurred, since the six-year-old boy from Gaspar had never left Santa Catarina and had not received blood transfusion.

All wild animals studied were negative for *T. cruzi* to conventional PCR using primers TCZ1 and TCZ2, corroborating with Santos (2016) results after molecular testing on blood samples from non-human primates. However in the same study using hsp70 primers, 45.5% of the samples were positive for *T. cruzi* (Santos, 2016). Tenório et al. (2014) identified *T. cruzi* in *Dasyprocta aguti* (cotia) rodent by direct parasitological examination, PCR and cloning.

All 12 PCR positive samples were submitted to sequencing, and nine referring to five animals showed similarity to *Trypanosoma* parasites (Table 4).

Table 4. Result of sequencing from positive samples of wild animals

Species	Organ	Animals	Similarity	N° access GenBank	Parasite
<i>Oxymycterus</i> sp.	Liver	A73	90%	KJ742907.1	<i>Trypanosoma rangeli</i>
<i>Scapteromys</i> sp.	Spleen	A74	90%		
<i>Oligoryzomys</i> sp.	Liver	A75	90%		
<i>Nectomys squampipes</i>	Liver	A223	80%		
<i>Oligoryzomys</i> sp.	Lung	A224	79%		
Total	5	5	-	-	-

Four rodent species *Oxymycterus* sp., *Scapteromys* sp., *Nectomys squampipes* and *Oligoryzomys* sp. showed similarity of up to 90% with *T. rangeli*. A low parasite load on wild animal samples may hinder the detection of parasite DNA (Tenório, et al., 2014), and may interfere with the results in sequencing.

The finding of an infected animal shows that this animal is a host of the parasite, but its importance as a reservoir will depend on the characteristics of this parasite-host interaction. This is what will define the ability of this host to maintain and transmit the parasite and thus its importance as a reservoir.

Trypanosoma rangeli is a protozoan belonging to the order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae and subgenus Herpetosoma (Levine, 1994). Although *T. rangeli* is closely related to *T. cruzi* and shares host mammals and vectors, all phylogenetic studies and several molecular markers separate them. Several mammalian orders were described as possible wild reservoirs: Xenarthra, Marsupialia, Carnivora, Rodentia and Primata (D'Alessandro 1976; D'Alessandro-Bacigalupo & Saravia 1992; Cuba Cuba 1998). There are reports of *T. rangeli* in triatomines collected in palms from different regions of Brazil (Gurgel-Gonçalves et al, 2004a, Maia da Silva et al., 2007, Dias et al., 2008), suggesting that environments close to green areas present a greater chance of wild animals coming in contact with the vector.

In the wild environment, this species is associated with several species of palm trees as *Attalea speciosa* (babassu), *Mauritia flexuosa* (burity) and *Acrocomia aculeata* (macaúba) which is a food source for birds, marsupials and rodents (Diotaiuti; Day, 1984 Gurgel-

Gonçalves et al., 2004b, Abad-Franch et al., 2009). Urdaneta-Morales and Tejero (1985) infected rodents with the same strain of *T. rangeli* and concluded that immunosuppressed mice had a higher parasitic load compared to immunocompetent mice. In the state of Merida, Venezuela, a study investigated the presence of trypanosomatids in rodents and wild marsupials, where they were examined clinically for ulcers, excoriations, alopecia and nodules, but no lesions were found that were characteristic of the disease (Lima et al., 2006).

However, their non pathogenic characteristics to vertebrate hosts, *T. rangeli* induces humoral immune response that results in high levels of antibodies (Grisard et al, 1999) which originate serological cross reactivity with *T. cruzi* parasites complicating the diagnosis and epidemiology of Chagas disease. In the field of identification of the parasites in the vector insect, there are still difficulties in distinguishing both species in tests performed in the feces of the infected kissing bug or vinchuca, by technicians unfamiliar with the morphology of *T. rangeli*.

The human infection by *T. rangeli* is characterized by the absence of clinical manifestations, low levels of parasitemia and absence of dividing forms in the tissues and in the blood (D'Alessandro et al., 1992). In Brazil the first case of human rangelirosis was described in 1954 by Lucena and Marques, who reported a chagasic cardiac disease patient who had mixed infection by *T. cruzi* and *T. rangeli*. Coura et al. (1996) reported cases of human infection by *T. rangeli* in Brazil, in the Amazon region. Steindel et al. (1991) described for the first time the occurrence of *T. rangeli* on the Island of Santa Catarina, isolated from the rodent *Echimys dasythrix*, the so-called SC-58 strain, cited by Vallejo et al. (2007) as strain KP1. Studies with parasites isolated from wild *Panstrongylus megistus* using the xenoculture method confirmed the previous results and demonstrated the presence of *T. rangeli* and *T. cruzi* mixed infections in naturally infected *P. megistus* in the same region (Steindel et al., 1992)

A sample of the species *Scapteromys* sp. and *Oxymycterus* sp. returned 100% similarity to *T. brucei* and *T. b. gambiense* respectively. However, they showed low local alignment of the 148 base pairs, 18 nucleotides of the complete sequence were identical to the one of the parasite. The low similarity in sequencing may reflect non-deposited sequences in GenBank (Table 5).

Table 5. Result of sequencing from positive samples of wild animals

Species	Organ	Animals	Similarity	N° access GenBank	Parasite
<i>Oxymycterus</i> sp.	Heart	A73	100%	KX700175.1	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>Scapteromys</i> sp.	Liver Lung	A74	100%	XM_011780373.1 HE573020.1	<i>Trypanosoma.</i> <i>brucei gambiense</i> <i>Trypanosoma vivax</i>
Total	3	2	3	-	-

Responsible for more than 98% of African Human Trypanosomiasis is transmitted by the vector genus *Glossina*, popularly known as tsetse. In West and Central África the responsible etiological agent is *T. b. gambiense*. *Trypanosoma brucei* is another protozoan responsible for African trypanosomiasis, it does not infect humans, but usually domestic and wild animals (WHO, 2016). In a study conducted in the Southern Forest of Cameroon, 164 animals were analyzed, of which 39 (23.8%) were rodents. Of these, 54% were positive for *T. brucei* and 33.3% for *T. b. gambiense* (Herder et al., 2002). In another region of Cameroon *T. b. gambiense* was diagnosed in primate and rodent samples, strengthening the hypothesis of the existence of a reservoir of wild animals of *T. b. gambiense* in this region (Njiokou et al., 2004).

The sequencing results also showed similarity to *T. vivax*. It is transmitted primarily by the bite of tsetse flies in Africa, where it is known as nagana. The disease infects several species of mammals, but this fly's infection can be particularly devastating for cattle (Radostitis et al., 2000), causing abortion, anemia, infertility, productivity losses, and death of affected animals (Losos, 1986; et al., 2008). In South America, transmission is mechanical and occurs mainly by tabanids. In Brazil the first registry occurred in Pará, where the parasite was identified by blood smear in a buffalo. (Shaw, Lainson, 1972). A study carried out in Mossoró-Brazil, observed by means of the PCR molecule technique, *T. vivax* DNA in colostrum of experimentally infected goats (Bezzera, 2017).

The different species of trypanosomes found in this study were near human dwellings, industry activities, especially trade and leisure. Two Private Reserve trails inserted in the Atlantic Forest, which visitors have access to for tours. Companies that a daily circulation of

workers and visitors. Although the findings of positive animals are small in relation to the amount studied, we cannot rule out the possibility of contact between animals and man, facilitating the maintenance of zoonotic infectious agents.

4. Conclusion

With this research we conclude that there is a large occurrence of road-killed wild animals on our roads, which are susceptible to infection by parasites. The results indicate the circulation of trypanosomatids among wild animals in regions of Santa Catarina showing the importance of these specimens as epidemiological markers of certain species of *Trypanosoma* spp..

References

- ABAD-FRANCH. F.; MONTEIRO, F. A.; JARAMILLO, O. N.; GURGEL-GONCALVES, R.; DIAS, F. B.; DIOTAIUTI, L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Trop.**, v. 110, p. 159-177, 2009.
- AMBRÓSIO, C. G. S.; CRACCO, A.; CARDOSO, G. L.; REZENDE, P. S. T.; LEONEL, W. M. S. Estudo parasitológico em animais da Reserva Biológica das Perobas, Tuneiras do Oeste, Cianorte. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 8., 2013, Maringá. **Anais Eletrônicos...** Maringá: Centro Universitário Cesumar, 2013. 4 p.
- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Osvaldo Cruz, 2008. p. 16-7.
- ASSAL, A.; CORBI, C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: um problème parasitaire émergent les pays non endémiques. **Transfusion Clin. Biol.**, v. 18, p. 286-291, 2011.
- BAGER, A. **Ecologia de estradas**: alternativa para diminuição de impactos ambientais. 2012.

Disponível em: <<http://www.ihu.unisinos.br/entrevistas/ecologia-de-estradas-alternativa-para-diminuicao-de-impactos-ambientais-entrevista-especial-com-alex-bager/507081-ecologia-de-estradas-alternativa-para-diminuicao-de-impactos-ambientais-entrevista-especial-com-alex-bager>>. Acesso em: 8 set. 2017.

BAGER, A.; SCHITTINI, A. E. B. **ICMBio apoia ações para prevenir atropelamentos da fauna:** depoimento. Entrevista concedida a Ivanna Brito. Brasília: ICMBio, 2014.

BEZERRA, N. M. **Vias alternativas de transmissão do *Trypanosoma vivax* em caprinos infectados experimentalmente.** 2017. 62 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral.** Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, p. 200-202, 2010.

CBEE. **Atropelômetro.** 2017. Disponível em: <<http://cbee.ufla.br/portal/atropelometro/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

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.; JASEN, 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, p. 305-313, 2006.

COURA, J. R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRET, T. V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D. A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R.**

Soc. Trop. Med. Hyg., v. 90, p. 278-279, 1996.

CUBA, C. A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 207-220, 1998.

D`ALESSANDRO, A. The biology of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli*. In: LUMSDEN, W. H. M.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. v. 1, p. 327-403.

D`ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; SARAIVA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIR, J. P.; BAKER, J. (Ed). **Parasitic protozoa**. London: Academic Press; 1992. v. 2, p. 1-54.

DIAS, F. B. S.; BEZERRA, C. M.; MACHADO, E. M. M.; CASANOVA, C.; DIOTAIUTI, L. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 824-830, 2008.

DIAS, F. B. S.; QUARTIER, M.; ROMANA, C. A.; DIOTAIUTI, L.; HARRY, M. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, p. 1278-1281, 2010.

DIOTAIUTI, L.; DIAS, J. C. Occurrence and biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in palm trees of suburban areas of Belo Horizonte, Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 293-301, 1984.

DONALISIO, M. R.; PAIZ, L. M.; SILVA, V. G.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; ZUBEN, A. P. B. V.; CASTAGNA, C. L.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory crosssectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine case. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 7, p. e0005666, 2017.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE INFRAESTRUTURA E TRANSPORTES - DNIT. **Atropelamento de animais silvestres:** monitoramento para redução de perdas. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/download/CGMAB.pdf>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE INFRAESTRUTURA E TRANSPORTES - DNIT. **Monitoramento e mitigação de atropelamentos de fauna.** 2012. Disponível em: <<http://www.dnit.gov.br/download/meio-ambiente/colecao-estrada-verde/monitoramento-e-mitigacao-de-atropelamento-de-fauna.pdf>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

ESTADO DE SANTA CATARINA. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA DE ZOONOSES. **Doença de Chagas.** 2017. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/capacitacao/Chagas_Para_profissionais.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2018.

EL TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed space in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, p. 575-579, 2000.

FIGUEIREDO, F. F.; LIMA JR., F. E. F.; TOMIO, J. E.; INDÁ, F. M. C.; CORRÊA, G. L. B.; MADEIRA, M. F. Canine visceral leishmaniasis: two autochthonous cases in Florianópolis Municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Acta Sci. Vet.**, v. 40, p. 1026, 2012.

FIOCRUZ. **Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (vetores da Doença de Chagas).** Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/Atlas_triatoiminio_jurberg.pdf> Acesso em: 19 jan. 2018.

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, p. 305-308, 1994.

- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania* sp. em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC.** 2010. Disponível em: http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/29_12_2010_11.21.59.e3fa4a5734524ccf230fae0763a37b75.pdf. Acesso em: 18 jan. 2018.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 203-209, 1999.
- GUIRALDI, L. M. **Pesquisa de tripanosomatídeos em primatas de cativeiro do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo.** 2016. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2016.
- GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, E. D.; DUARTE, M. A.; PALMA, A. R. T.; ABAD-FRANCH, F.; CARRANZA, J. C.; CUBA-CUBA, C. A. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in Federal District of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, p. 323-330, 2004a.
- GURGEL-GONÇALVES, R.; DUARTE, M. A.; RAMALHO, E. D.; PALMA, A. R. T.; ABAD-FRANCH, F.; ROMANA, C. A.; CUBA-CUBA, C. A. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, p. 241-247, 2004b.
- HANGEMUHLE, A.; CADEMARTORI, C. V. Levantamento de mortes de vertebrados silvestres devido a atropelamento em um trecho da Estrada do Mar (RS 389). **Biodivers. Pampeana**, v. 2, p. 4-10, 2009.
- HERDER, S.; SIMO, G.; KININ, S. N.; NJIOKOU, F. Identification of trypanosomes in wild animals

from Southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). **Parasite**, v. 9, n. 4, p. 345-349, 2002.

HEUSSER JR., A.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; SATOR, A. A.; SANTOS, E. G. O. B.; SILVA, V. L. Canine tegumentar leishmaniasis in the town of Balneário Camboriú in the State of Santa Catarina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, p. 713-718, 2010.

INSTITUTO BRASÍLIA AMBIENTAL. **Projeto Rodofauna**: rodofauna - monitoramento de fauna silvestre atropelada. Brasília, 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEVINE, N. D.; CORLISSA, J. O.; COX, E. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M. A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.**, v. 27, p. 37-58, 1994.

LIMA, H.; CARRERO, J.; RODRIGUEZ, A.; GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, N. Tripanosomatídae de importancia en salud pública en animales silvestres y sinantrópicos en una área rural del municipio Trovar del estado Mérida, Venezuela. **Biomédica**, v. 26, n. 1, p. 42-50, 2006.

LONGONI, S. S.; LÓPEZ-CESPEDES, A.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; SAURIARCEO, C. H.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; MARÍN, C. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, p. 469-7, 2012.

LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 938 p.

LUCENA, D. T.; MARQUES, R. J. Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, no Brasil. **Rev. Bras. Med.**, v. 11, p. 535-540, 1954.

LUKES, J. ***Trypanosoma Gruby 1843***. Version 2 January 2009 (under construction). Disponível em: <<http://tolweb.org/Trypanosoma/98034/2009.01.02>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

MAIA, S. F.; JUNQUEIRA, A. C.; CAMPANER, M.; RODRIGUES, A. C.; CRISANTE, G.; RAMIREZ, L. E.; CABALLERO, Z. C.; MONTEIRO, F. A.; COURA, J. R.; AÑEZ, N.; TEIXEIRA, M. M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Mol. Ecol.**, v. 16, p. 3361-3373, 2007.

MAIA, S. F.; MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA JR., M.; ORTIZ, P. A.; CAMPANER, M.; TAKEDA, G. F.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Trop.**, v. 109, p. 199-207, 2009.

MARTIN, C. F. **Monitoramento de fauna silvestre atropelada no entorno da estação ecológica de Carijós**. 2015. 43 f. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MYERS, P. **Rodentia, animal diversity**. 2000. Disponível em: <<http://animaldiversity.org/accounts/Rodentia/>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

NAKA, L. N.; RODRIGUES, M.; ROOS, A. I. L.; AZEVEDO, M. A. G. Bird conservation on Santa Catarina Island, Southern Brazil. **Bird Conserv. Int.**, v. 12, p. 123-150, 2002.

SILVEIRA NETO, O. J.; DUARTE, S. C.; COSTA, H. X.; LINHARES, G. F. C. Design of primer pairs for species-specific diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* using PCR. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 21, p. 304-307, 2012.

NJIOKOU, F.; SIMO, G.; NKININ, S. W.; LAVEISSIÈRE, C.; HERDER, S. Infection rate of *Trypanosoma brucei*, *T. vivax*, *T. congolense* "forest type", and *T. simiae* in small wild vertebrates in South Cameroon. **Acta Trop.**, v. 92, n. 2, p. 139-146, 2004.

OLIVEIRA, O. V.; OLIVEIRA, F. O.; FERREIRA NETO, J. A. Apresentação do primeiro caso autóctone de doença de Chagas diagnosticado no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 4, p. 211-214, 1970.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmanioses**. Disponível em: <<http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>>. Acesso em: 18 set. 2017.

PAIZ, L. M.; FORNAZARI, F.; MENOZZI, B. D.; OLIVEIRA, G. C.; COIRO, C. J.; TEIXEIRA, C. R.; SILVA, V. M. C.; DONALISIO, M. R.; LANGONI, H. Serological evidence of infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in free-ranging wild mammals in a nonendemic region of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 15, n. 11, p. 1-7, 2015.

PEREIRA, L. **Construção social do surto da Doença de Chagas em Santa Catarina, 2005**. 2010. 81 f. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993.

PINTO, L. P.; BEDE, L. C.; PAESE, A.; LAMA, I. Mata Atlântica brasileira: os desafios para a conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. In: ROCHA, C. F. D.; BERGALLO, H. G.; VAN SLUYS, M.; ALVES, M. A. S. **Biologia da conservação: essências**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 91-118.

RAIMUNDO, S. M.; MASSAD, E.; YANG, H. M. Modelling congenital transmission of Chagas' disease. **BioSystems**, v. 9, p. 215-222, 2010.

REDAÇÃO NOTÍCIA DO DIA. **Terceiro caso de leishmaniose visceral**. 2017. Disponível em: <<https://ndonline.com.br/florianopolis/noticias/florianopolis-registra-terceiro-caso->

autoctone-de-leishmaniose-visceral-humana>. Acesso em: 18 jan. 2018.

REICHE, E. M. V.; INOUE, M. M. Z.; BONAMETTI, A. M.; JANKEVICIUS, J. V. Doença de Chagas congênita: epidemiologia, diagnóstico laboratorial, prognóstico e tratamento. **J. Pediatr.**, v. 72, n. 3, p. 125-132, 1996.

RDOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SANTOS, W. J. **Pesquisa de *Trypanosoma cruzi* em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. **Dive/SC orienta sobre medidas da leishmaniose visceral**. Florianópolis, 2017. Disponível em: <http://portalses.saude.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=5813:dive-orienta-sobre-medidas-da-leishmaniose-visceral&catid=1417:ascom-assessoria-de-comunicacao-2017>. Acesso em: 12 nov. 2017.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends Parasitol.**, v. 21, p. 550-552, 2005.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 66, p. 25-33, 1972.

SOUZA, C. L. Survey of wild mammals small and medium-size run over in BR101, stretch between the municipalities. **Biosci. J.**, v. 27, p. 666-672, 2011.

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências e Tecnologia para o Desenvolvimento Nacional, 2010. (Estudos estratégicos, 56).

TIRLENS, A. G. M.; HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 265-271, 1998.

STEINDEL, M.; CARVALHO-PINTO, C. J.; TOMA, H. K.; MANGIA, R. H. R.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A. J. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina State: first report of this trypanosome in Southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 73-79, 1991.

STEINDEL, M.; GRISARD, E.; CARVALHO-PINTO, C. J.; ROMANHA, A. J. Presence of *Trypanosoma cruzi* - *Trypanosoma rangeli* mixed infection in naturally infected *Panstrongylus megistus* from Florianópolis, State of Santa Catarina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. 2, p. 99, 1992.

TENÓRIO, M. S.; OLIVEIRA E SOUSA, L.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; RODRIGUES, M. V.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; LUCHEIS, S. B. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. **Vet. Parasitol.**, v. 203, p. 203-206, 2014.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, Tejera 1920, Mouse model for high, sustained parasitemia. **J. Parasitol.**, v. 71, p. 409-413, 1985.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C.; TRIANA, O.; PÉREZ, G.; ORTIZ, P. A.; MARÍN, D. H.; VILLA, L. M.; SUÁREZ, J.; SÁNCHEZ, I. P.; PULIDO, X.; RODRÍGUEZ, I. B.; LOZANO, L. E.; URREA, D. A.; RIVERA, F. A.; CUBA-CUBA, C.; CLAVIJO, J. A. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. **Biomédica**, v. 27, p. 110-118, 2007.

VIRREIRA, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEJA, C.; SOLANO, M.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 5, p. 574-582, 2003.

- WALTER, A. Human activities and American tripanosomiasis. **Parasite**, v. 10, p. 191-204, 2003.
- WELLS, E. A.; D’ALESSANDRO, A.; MORALES, G. A.; AANGEL, D. Mammalian wildlife diseases as hazards to man and livestock in na area of the Llanos Oreintales of Colombia. **J. Wildl. Dis.**, v. 17, p. 153-162, 1981.
- WESTPHALEN, L. V. N.; BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. **BEPA**, v. 9, n. 105, p. 18-35, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>>. Acesso em: 18 set. 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis) – fact sheet (revised in August 2012). **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 87, p. 519-22, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 9 nov. 2017.
- ZETUN, C. B.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. **Vet. Zootec.**, v. 21, n. 1, p. 139-147, 2014.

Conclusão

Conclusão

Os animais silvestres atropelados em nossas estradas são sinalizadores da presença de parasitos no ambiente;

Foram detectados tripanosomatídeos em órgãos de sete roedores;

A utilização de ferramentas moleculares sensíveis e específicas (PCR) são úteis para estudos epidemiológicos de detecção de tripanossomatídeos em animais silvestres de Santa Catarina;

A análise espacial delimitou as áreas de ocorrência de tripanossomatídeos em roedores atropelados de Santa Catarina;

O aproveitamento deste importante recurso biológico é fundamental para o estudo da ocorrência ambiental de patógenos;

Anexos

Anexo 1**Autorização CEUA**

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL

**ANEXO E**

São Paulo, 13 de novembro de 2015.

Protocolo 02 / 2015

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Detecção e quantificação molecular de micro-organismos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento”**, sob a responsabilidade de **Virginia Bodelão Richini Pereira**, Pesquisador Científico do Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratórios Regionais II de Bauru do Instituto Adolfo Lutz, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL).

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	19/11/2015 a 19/11/2018
Espécie/linhagem	Animais silvestres mortos por atropelamento
Nº de animais	297
Peso/Idade	não se aplica
Sexo	machos e fêmeas
Origem	Vários Municípios do Estado de Santa Catarina

Atenciosamente,

Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da CEUA-IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo - SP - CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

Anexo 2

Autorização SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50785-3	Data da Emissão: 06/09/2016 08:42	Data para Revalidação*: 06/10/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Virginia Bodelão Richini Pereira	CPF: 267.920.678-90
Título do Projeto: Detecção e quantificação molecular de micro-organismos importantes em saúde pública em animais silvestres mortos por atropelamento	
Nome da Instituição : INSTITUTO ADOLFO LUTZ	CNPJ: 46.374.500/0045-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Avaliação molecular de amostras de animais silvestres mortos.	10/2015	10/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BLUMENAU	SC	Municípios de Santa Catarina	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cingulata, Canidae, Rodentia, Felidae, Atelidae, Callithrichidae, Cebidae, Didelphimorphia, Mustelidae, Procyonidae, Lagomorpha

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
---	----------------------------------	--

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 41672646



Página 1/4

Anexo 3

Protocolo de Extração de DNA para pesquisa de Trypanosomatídeos, *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* em amostras de tecido utilizando kit de extração Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE)

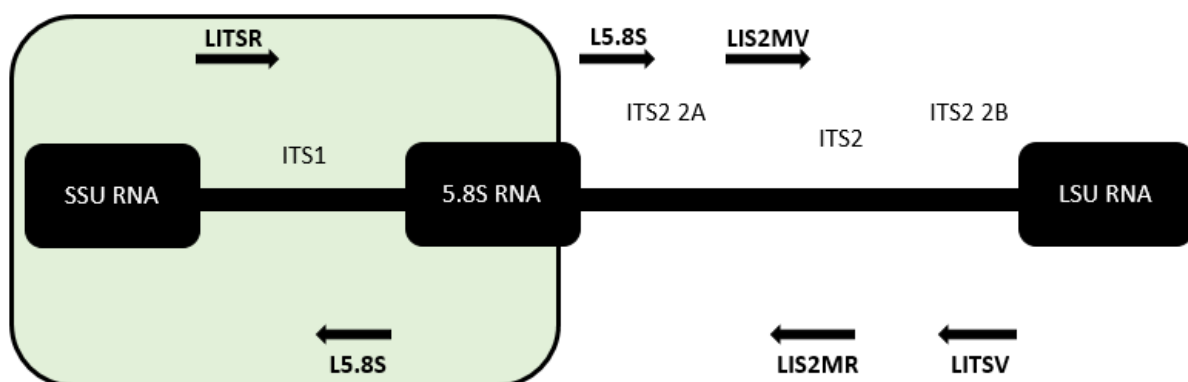
- Ligar fluxo por 30 minutos na luz ultra violeta e colocar os materiais a serem utilizados.
- Aquecer a 70°C o tampão de eluição.
- Macerar a amostra e passar no Biospec.
- Em microtubos de 1,5 ml acrescentar 400 µl de tampão de extração 2 e acrescentar uma pequena quantidade de tecido macerado.
- Homogeneizar em agitador (*vortex*) por 15 minutos.
- Centrifugar 3.000 G de 30 s à 1 minuto, para decantação de detritos.
- Retirar o sobrenadante com pipeta e colocar novos microtubos de 1,5 ml.
- Acrescentar 10µl de proteinase K (20mg/ml) .
- 50 µl de solução de lise 1 e homogeneizar *vortex* por 15 segundos.
- Incubar temperatura ambiente por 10 minutos.
- Colocar coluna no tubo coletor e aplicar toda a amostra na coluna.
- Centrifugar 11000 G por 1 minuto e desprezar o sobrenadante do tubo coletor.
- Acrescentar 500 µl da solução de lise 2 e centrifugar 11000 G por 1 minuto.
- Desprezar o líquido centrifugado e acrescentar 500 µl de tampão de lavagem.
- Centrifugar 11000 G por 3 minutos.
- Descartar tubo coletor e colocar o filtro em novo microtubo de 1,5 ml.
- Acrescentar 100 µl de tampão de eluição aquecido à 70°C e incubar por 1 minuto em temperatura ambiente
- Centrifugar 11000 G por 1 minuto.
- Obtém-se a amostra de DNA a qual foi armazenada à -18 °C em freezer.

Anexo 4**Quantificação de DNA das amostras extraídas utilizando o quantificador Biotech Epoch®.**

- Calibrar o aparelho utilizando 2µL de água ultrapura nas cavidades de leitura indicadas no aparelho.
- Calibrar
- Acrescentar 2µL de cada amostra de DNA nas cavidades de leitura para quantificação.

Anexo 5

Amplificação da região ITS-1 do DNA ribossomal com a utilização dos primers LITSR e L5.8S



Anexo 6: Representação do espaço de transcrição interno (ITS) da região ribossomal. A demarcação no esquema, representa a região ITS-1. Fonte: El Tai et al²

² EL TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed space in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transaction Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene, v.94, p. 575-579, 2000.v

Anexo 6

Protocolo utilizado para purificação das amostras para sequenciamento genético de acordo com as orientações do Kit GF xTM PCR-DNA and Gel Band Purification.

- Pesar o microtubo de 1,5mL vazio e anotar.
- Com o auxílio de um bisturi estéril, recortar a banda do gel.
- Inserir a banda do gel e realizar nova pesagem.
- Subtrair os valores de peso antes da colocação do gel (microtubo vazio) e após colocação do gel (microtubo cheio).
- Para cada 10mg de gel, adicionou-se 10µL de tampão de captura (Tipo 2) para a desnaturação e solubilização.
- Homogeneizar em agitador por 1 minuto e por inversão durante 15 segundos. Esse passo foi repetido três vezes.
- Inserir a coluna dentro do tubo coletor e incubar durante 10 minutos à 60°C em banho seco para dissolver a agarose.
- Centrifugar à 8.000rpm por 30 segundos.
- Transferir todo o conteúdo (tampão de captura acrescido da amostra) para a coluna juntamente ao tubo coletor e incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.
- Em seguida, centrifugar à 12.000rpm durante 30 segundos.
- Descartar o líquido do tubo coletor e retornar a coluna para dentro dele.
- Adicionar 500µL de tampão de lavagem (Tipo 1) à coluna que estava dentro do tubo coletor.
- Centrifugar à 12.000rpm por 30 segundos.
- Descartar o tubo coletor juntamente com o líquido que estava em seu interior e transferir a coluna para um microtubo de 1,5mL.
- Adicionar 50µL de Tampão de Eluição (Tipo 6) e incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Em seguida, centrifugar à 12.000rpm durante 1 minuto para recuperação do DNA purificado.
- Estocar em freezer à -20 °C.

Anexo 7

Protocolo utilizado para purificação dos *amplicons* para sequenciamento genético, com uso da enzima ExoSap (GE)- USB ExoSap-IT (USB Affymetrix, USA).

A ExoSAP-IT® é composta por enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a alcalina fosfatase de camarão (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). Enquanto a exonuclease I remove os resíduos de primer na solução, a SAP é responsável por quebrar as bases (DNTPs) que não se ligaram durante a PCR.

- Acrescentar 0,4 µL da enzima ExoSap-IT® e 10µL do produto da PCR no microtubo de 0,2mL.
- Colocar o microtubo no termociclador e submeter ao perfil de ciclagem de acordo com o protocolo do fabricante: 37 °C - 1 hora e 80 °C - 15 min.
- Após a ciclagem, fazer a quantificação do DNA das amostras.
- Se a quantificação apresentar valores altos (superior a 200ng/µL), acrescentava-se água mili-Q e realizar nova quantificação.
- Em microtubos de 0,2mL livres de DNAsas e RNAsas acrescentar 5µL de cada um dos primers, (Sense e Anti-sense), sendo que cada primer tem concentração de 5pmol/µL.
- Acrescentar 10µL da amostra em cada microtubo com primers.
- Estocar em temperatura ambiente até a realização do sequenciamento.

Apêndices

Apêndice 1

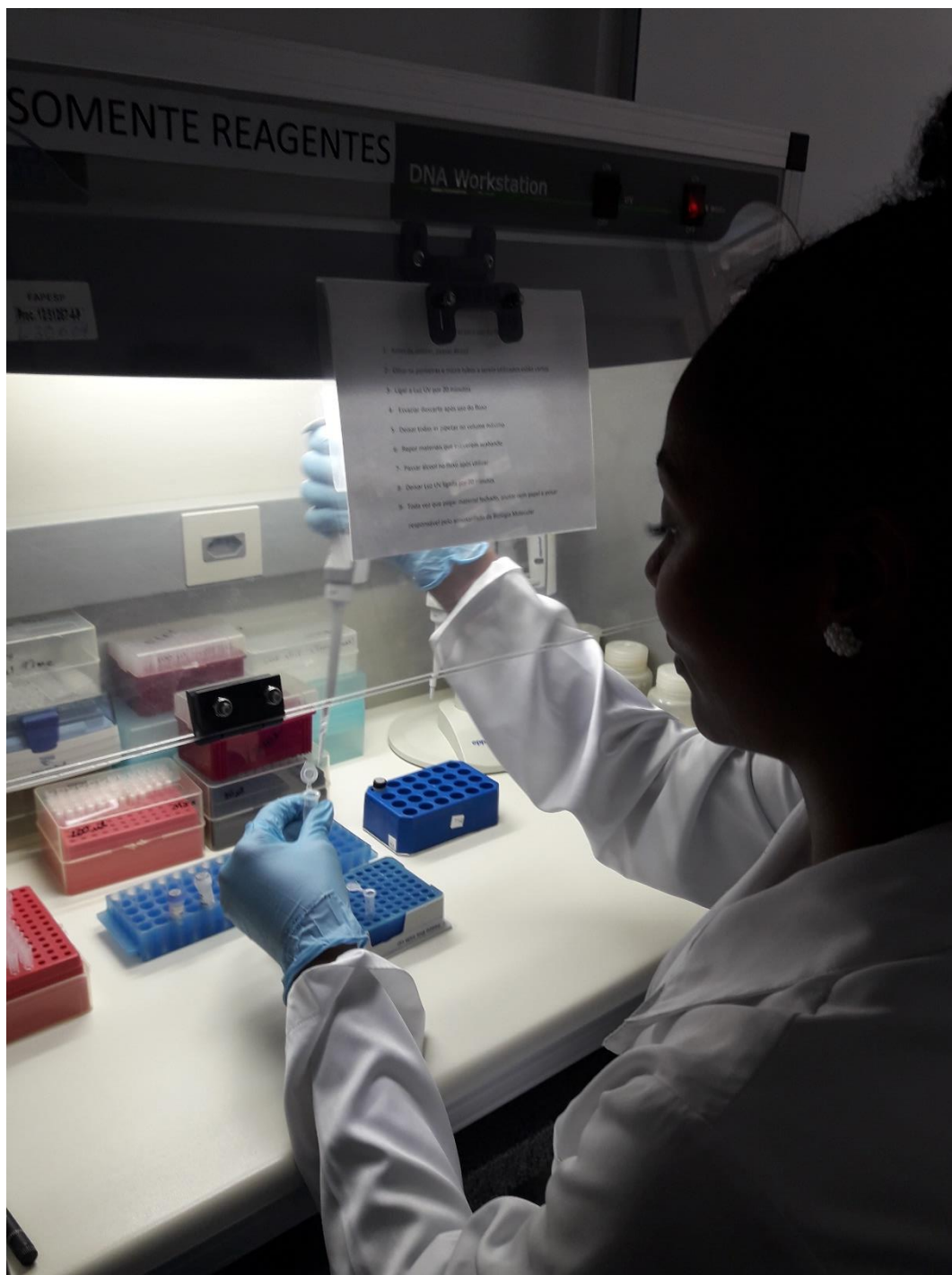


Figura 1: Preparo das amostras teciduais de animais silvestres para realização da Reação em Cadeia da Polimerase. PCR-Mix. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 2



Figura 2: Preparo das amostras teciduais de animais silvestres para realização da Reação em Cadeia da Polimerase. Adição das amostras de DNA extraído. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 3



Figura 3: Corrida eletroforética em Gel de agarose 1,5%. Adição do produto da PCR após amplificação. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 4

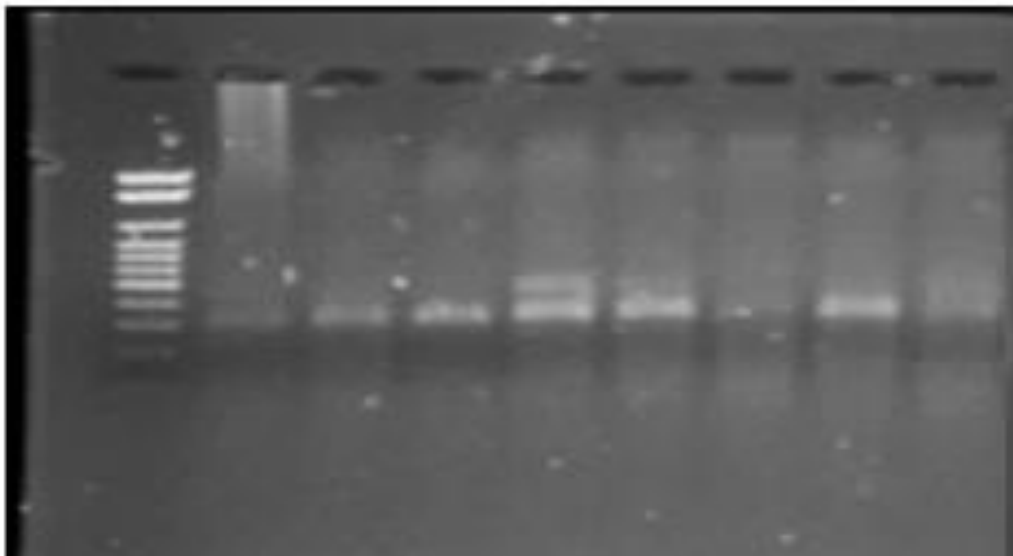


Figura 4: Eletrofores em gel de agarose 1,5% com os iniciadores LITSV e L5.8SR para Família Trypanosomatidae. 1 – marcador de peso molecular 100pb, 2-7 amostras, 3- 8 controle positivo (*Leishmania infantum*), 4 – 9 controle negativo (água ultrapura)

Apêndice 5

Tabela 1. Sexo e localidade dos animais silvestres atropelados, positivo na PCR para pesquisa da Família Trypanosomatidae.

Família	Espécie	Sexo	Localidade	Município
Cricetidae	<i>Oxymycterus sp</i>	F	Potreiro das Éguas, Fazenda Gateados	Campo Belo do Sul
	<i>Scapteromys sp</i>	M	Ponto 4, Fazenda Gateados	Campo Belo do Sul
	<i>Oligoryzomys sp</i>	F	Córrego do Canoas, Fazenda Gateados	Campo Belo do Sul
	<i>Oligoryzomys sp</i>	M		Barra do Sul
	<i>Nectomys squamipes</i>	M	Vega do Sul	São Francisco do Sul
	<i>Oligoryzomys sp</i>	M	Vega do Sul	São Francisco do Sul
Callitrichidae	Sagui (NI)	M	Bairro da Velha, próx. Escola Alberto Stein	Blumenau

NI (Não identificado)

Apêndice 6

Tabela 2. Localização da coleta dos 297 animais silvestres atropelados em Santa Catarina, Brasil

Municípios	Nº animais coletados
Águas do Chapecó	2
Angelina	6
Apiúna	2
Araquari	1
Arvoredo	3
Balneário Barra do Sul	1
Benedito Novo	1
Blumenau	32
Brusque	1
Caçador	2
Campo Alegre	1
Campo Belo do Sul	24
Caxambú do Sul	1
Chapecó	29
Dr. Pedrinho	12
Florianópolis	1
Garuva	1
Gaspar	4
Guatambu	4
Ibirama	6
Ilhota	13
Indaial	13
Ipuaçu	10
Itapoá	2
Joinville	1
Lages	1
Navegantes	1
Passos Maia	10
Planalto Alegre	1
Rio dos Cedros	1
São Carlos	1
São Domingos	62

São Francisco do Sul	9
Siderópolis	5
Uribici	5
Vidal Ramos	17
Xanxerê	2
Xaxim	9
Total Geral	297