

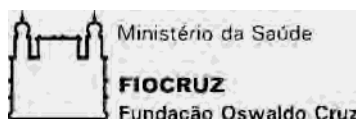
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**A REDE TRÓFICA E O PAPEL DOS CARNÍVOROS
SILVESTRES (ORDEM CARNIVORA) NOS CICLOS DE
TRANSMISSÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

FABIANA LOPES ROCHA

Rio de Janeiro

Março, 2013.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

FABIANA LOPES ROCHA

**A REDE TRÓFICA E O PAPEL DOS CARNÍVOROS
SILVESTRES (ORDEM CARNIVORA) NOS CICLOS DE
TRANSMISSÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Orientadora: **Dr^a. Ana Maria Jansen**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Rio de Janeiro

Março, 2013.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICICT/FIOCRUZ - RJ

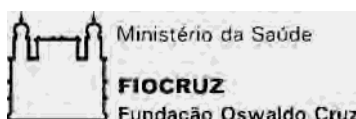
R672 Rocha, Fabiana Lopes

A rede trófica e o papel dos carnívoros silvestres (Ordem Carnivora) nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi* / Fabiana Lopes Rocha.
– Rio de Janeiro, 2013.
xvi, 130 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.
Bibliografia: f. 91-105

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Ciclos de Transmissão. 3. Doença de Chagas.
4. Reservatórios. 5. Carnívoros silvestres. 6. Rede trófica. I. Título

CDD 616.9363



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

TESE DE DOUTORADO

**A REDE TRÓFICA E O PAPEL DOS CARNÍVOROS SILVESTRES
(ORDEM CARNIVORA) NOS CICLOS DE TRANSMISSÃO DE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

FABIANA LOPES ROCHA

Orientadora: Dr^a. ANA MARIA JANSEN

Aprovada em: **06 de março de 2013.**

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet - Presidente
Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ

Dr. Rodrigo Silva Pinto Jorge - Membro
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio/MMA

Prof. Dr. Cicero Brasileiro de Mello Neto- Membro
Universidade Federal Fluminense - UFF

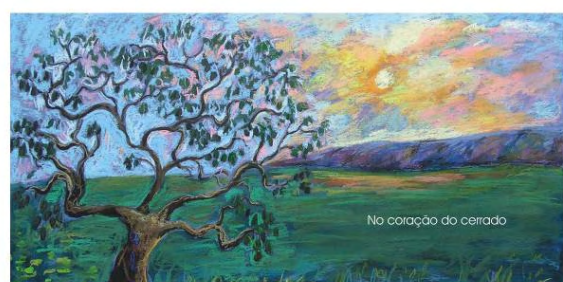
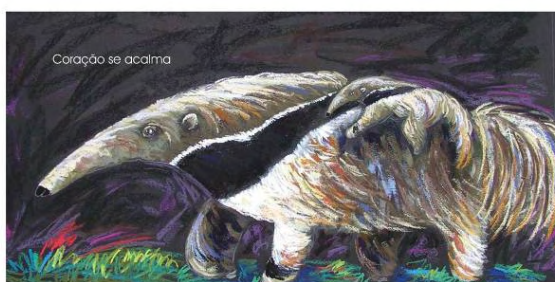
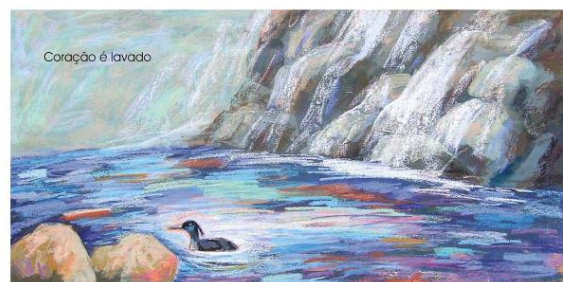
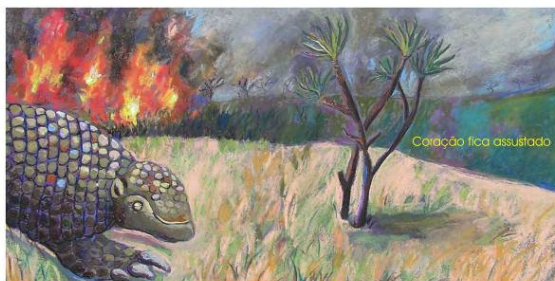
Prof. Dr. Flávio Henrique Guimarães Rodrigues- Suplente
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo - Suplente
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - ENSP/FIOCRUZ

Dedico esta tese à minha mãe, ***Carmélia Portela***, que soube me dar asas e raízes; a meu pai, ***Adauto Rocha***, que me ensinou o gosto pela descoberta; a minha irmã ***Luciana Rocha***, minha companheira e meu exemplo e a pequena ***Vitória Gabriela***, minha inspiração.

“Lá no Coração...”

Por Ellen Pestili



Livro produzido no âmbito do Projeto Lobos da Canastra com apoio do Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA).

Agradecimentos

Primeiramente à vida, por ser generosa e pela oportunidade e privilégio de seguir meus próprios passos e escolher minha profissão por amor e ideal. Chegar ao final de um doutorado é uma conquista pessoal, mas o caminho até aqui seria praticamente impossível sem a ajuda de muitas pessoas especiais.

Minha orientadora, **Dra. Ana Maria Jansen** é um exemplo de dedicação e mente científica brilhante. MUITÍSSIMO obrigada por ter me adotado no meio do caminho e me ensinar parasitologia. Mais do que isso, obrigada pela paciência com minha teimosia (como você mesma disse, parte do processo de aprendizagem e troca), por todo carinho, por estar sempre disponível e me receber em sua casa de braços abertos. Nunca vou esquecer nossas longas discussões sobre sistemas complexos, teoria do caos e outras tantas viagens “fora da caixinha”.

André Luiz Roque esteve sempre junto comigo nessas longas discussões e colaborou em todas as etapas desse doutorado. Exemplo de pesquisador dedicado, pra mim você foi meu co-orientador, aprendi e continuo aprendo muito com você. Obrigada pela parceria!

Paulo Sérgio D’Andrea foi inicialmente meu orientador, mas por percalços do destino, seguiu pelo caminho da gestão administrativa. Mesmo com a mudança, Paulo esteve sempre disponível para me ajudar, me deu apoio estrutural, pessoal e me ensinou um monte de coisas da vida. Obrigada pela oportunidade e pelos momentos divertidos que só você sabe propiciar!

Me considero uma pessoa de sorte por trazer contribuições no meu doutorado de muitos dos mestres que já tive no caminho até aqui. A estória desse doutorado começou no Pantanal, quando **Guilherme Mourão**, meu orientador de mestrado, aceitou orientar uma veterinária em ecologia, com a premissa de que o projeto não incluiria nenhuma questão “parasitológica”. Aceitei, claro, mas em pouco tempo convenci Guilherme a me deixar fechar uma colaboração com a Fiocruz, pontapé inicial desse trabalho. Obrigada em primeiro lugar por sua amizade, por discutir comigo questões ecológicas para entender o fenômeno do parasitismo e pela confiança de me permitir submeter propostas para continuar à distância o projeto no Pantanal e completar nossos dez anos de estudo juntos! A ponte com a Fiocruz veio através do pantaneiro e parasitologista **Heitor Herrera**, que ajudou a estruturar o laboratório de campo na Nhumirim, me ensinou os primeiros passos nesse campo, revisou meu projeto de doutorado e continua sendo um grande parceiro no projeto do Pantanal. **Flávio Rodrigues** foi orientador do meu projeto final de graduação no Parque Nacional das Emas e, além de amigo, me abriu as portas do Parque Nacional da Serra da Canastra, sendo fundamental em várias etapas do projeto. **Fernanda Vinci** foi minha professora de clínica de

silvestres na graduação e continua sendo minha veterinária mestra e amiga para todas as dúvidas de clínica e manejo dos silvestres. Obrigada **MESTRES**, por todos os ensinamentos, confiança e parcerias ao longo desses anos.

Aos meus companheiros de campo do *Projeto Lobos da Canastra* e amigos do peito, **Jean Pierre Santos** e **Ricardo Corassa Arrais**. Procurando lobos pela serra, carro atolado, cachorro bravo, laboratório de madrugada, lobo invadindo casa, nascimento do Henry, cinema nas fazendas, na praça e até documentário japonês... Foram tantas situações inusitadas que passamos juntos e vocês firmes e fortes pra tudo, no trabalho ou fora dele, que me faltam palavras pra agradecer toda cumplicidade e companheirismo. Já estou morta de saudade de checar armadilha com vocês ao nascer do sol, ouvindo “classic rock” (ou tecnobrega se fosse com JP, rs!) na adrenalina do que iríamos encontrar logo mais. Esse trabalho é de vocês e para vocês!

Muito obrigada aos demais companheiros do *Projeto Lobos da Canastra* que tornaram este trabalho possível. Ao **Rogério Cunha de Paula** por me contagiar com sua paixão e dedicação aos lobos e a Serra da Canastra. **Marcelo Bizerril** é uma das pessoas mais sensatas que conheço. Obrigado pela sua compreensão num momento cinza e por todo aprendizado em educação ambiental. Obrigada a **Carla Cruz**, **Eduardo Eizirik**, **Erica Gaspar**, **Fernanda Cavalcanti**, **Flávio Rodrigues**, **Joares May**, **Khátia Leal**, **Nucharin Songsasen**, **Ronaldo Morato** e **Wanila Santos**. Foi um privilégio fazer parte dessa equipe de pessoas tão admiráveis. Obrigada pelos momentos inesquecíveis no campo, as noites de viola e saxofone, os “campeonatos do universo” e pela experiência no projeto.

As meninas pantaneiras que enfrentaram sol, calor, mosquito e trabalharam duro na captura da bicharada no Pantanal na segunda fase do projeto. Muitíssimo obrigada **Juliane Saab**, por toda dedicação, foram anos dividindo dados, relatórios, revisões e vibrando com as trocas de novidades entre campo e laboratório. **Carolina Cheida** topou a colaboração mesmo sem me conhecer pessoalmente e ao longo do trabalho compartilhou não apenas as amostras do seu doutorado com mão-pelada, mas discutiu, revisou e acabou vindo ao Labtrip conhecer o micromundo dos parasitos de perto. **Magyda Dahroug**, em sua busca atrás das jaguatiricas, acabou capturando alguns dos quatis e cachorros-do-mato deste estudo e foi sempre prestativa para coletar as amostras, ajudar no laboratório de campo e fazer a ponte Fiocruz-Embrapa de materiais e amostras. Muito obrigada pantaneiras pela parceria tão produtiva!

A toda equipe do *Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado*. Obrigada pela oportunidade de dividir com vocês o sonho de trabalhar com conservação. **Frederico Gemesio** e **Fernanda Cavalcanti**, vocês são minha inspiração! Admiro a força, coragem e dedicação com que

vocês mantêm esse projeto de forma independente, tarefa nada fácil nos dias de hoje. Além disso, Fred é aquele tipo de biólogo quase em extinção, apaixonado por história natural. Ficar perto das raposinhas aprendendo com vocês não tem preço. Obrigada em especial aos veterinários de campo **Ricardo Arrais** e **Caio Motta** e a todos os biólogos, veterinários e voluntários do PCMC.

À família LABTRIP - Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos pelo apoio e agradável convivência diária. Obrigada **André Pereira**, **Juliana Barros** e **Kerla Monteiro**, pela inestimável ajuda na bancada da sorologia. **Carlos Ruiz** e **Marco Lima**, vocês são o coração do laboratório. Obrigada pela ajuda com os meios de cultura e por cuidarem como ninguém dos isolados de *T. cruzi*. Obrigada **Vitor Araújo** por todo esforço nas campanhas de cães na Canastra. **Samanta Xavier** dividiu comigo os altos e baixos do doutorado e, conseguimos, terminamos juntas! Muito obrigada a **Valquíria Trajano** pelo carinho e ajuda nas questões burocráticas.

Às minhas orientadoras no mundo dos DNAs, **Valdirene Lima** e **Daniele Bilac**. Na natureza nem tudo é tão definido como nossa mania de querer encontrar padrões em tudo e os isolados de quati do Pantanal e dos cães da Canastra vieram nos lembrar disso. Deu muito trabalho, mas vocês encararam a tarefa como se fosse de vocês. Obrigada pela amizade, por colocarem a mão-na-massa, e pelos muitos almoços engraçadíssimos em Biomanguinhos.

Aos meus alunos de iniciação científica, com os quais tive a honra de ensinar e aprender junto, **Camylla Pereira**, **Gregor Daflon** e **Moema Camoleze**. Muito obrigada pela dedicação e por serem meus companheiros no campo e no laboratório.

A todos do **Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios** – LBCE pelo apoio logístico e infraestrutura no trabalho com pequenos mamíferos. Obrigada em especial ao **Dr. Paulo Sérgio D'Andrea** por me abrir as portas do laboratório, **Dr. Arnaldo Maldonado** pelo apoio ao projeto e por sempre me receber com simpatia, **Michele Maria** pela ajuda na organização do material de campo, **Cinthia Gomes**, **Dayana Motta** e **Pedro Estrela** pela identificação dos pequenos mamíferos, **Dra. Cibele Bonvicino** pela supervisão criteriosa das identificações, e aos amigos **Bernardo Teixeira** e **Fabiano Fernandes**, pela ajuda no campo e na vida acadêmica.

À **Dra. Vera Bongertz** pela revisão de inglês dos artigos.

Ao amigo **Carlos André Zucco**, por ser sempre prestativo e meu consultor nas análises espaciais e estatísticas. Obrigada por sua ótima amizade, pela ajuda nas análises e por realizar comigo o sonho de conhecer a África. Pelas instigantes conversas que tivemos lá.

Um agradecimento especial a **Vitor Rademaker**, por ter me trazido para a Fiocruz, me apresentado ao Labtrip e por todos os nossos bons momentos. Obrigada à família Rademaker, Aneci, Ernesto e Hugo, que tanto adoro.

Privilégio para alguns, loucura para outros, durante meu doutorado me mudei por quase três anos para uma cidadezinha de pouco mais de cinco mil habitantes no interior de Minas Gerais. Obrigada a todos os moradores de São Roque de Minas que me acolheram com tanta hospitalidade, em especial à família Santos: **Dona Antônia, Seu Amadeu, Jayme Pietro, Jean Pierre, Wanilla** e o pequeno **Henry**, a **Darquinha**, pelos deliciosos almoços mineiros e a **Flávia Ribeiro** “patinha” pela excelente companhia pra assistir filmes, comer peixe no pesque-paque e banhos de cachoeira que faziam a vida na Canastra mais gostosa.

À minha família carioca, **Lysa Ribeiro, Mateo, Alceu e Lourdes Moura**. Muito obrigada por me darem carinho, teto, por cuidarem das minhas coisas e me receberem naquelas datas tradicionais em que a saudade da família sempre aperta mais.

À **Carolina Ribas**, minha irmã de coração e “roomate” carioca, pela cumplicidade e tantos papos filosóficos sobre nós mesmas e sobre a vida, sempre aprendendo, trocando. Sobrevivemos (e bem) a dois finais de doutorado. E lá se foram muitos pacotes de sal... rs! Muito obrigada à família Pereira, seu **Alberto, Maria e Gustavo**, por cuidarem das nossas gatas quando estamos fora, nos mandarem comidas gostosas e por todo apoio e carinho.

Aos amigos que ficaram na torcida e que acompanharam essa estória de amor e sofrimento que é um doutorado: **Aleksander Batista, Allan Yu, Charles Alimandro, Clarissa Souza, Erica Guimarães, Eugenia Zandona, Flávia Tromboni, Gabriel Damaceno, Glauber Piva, Meire Lia, Mariana Mariz, Marcelo Weksler, Net Pic, Paula Silva, Simone Dias e Tereza Raquel**. Obrigada em especial ao amigo **Arnaud Desbiez**, por estar vivo e ser essa pessoa tão iluminada, pelo privilégio de tê-lo como amigo.

Às gatunas **Ziggy Marley, Vênus** e a pequena **Zelda. Ziggy** foi minha grande companheira na escrita da tese, sempre ao lado do computador (ou em cima, para meu desespero!). Obrigada pelos “insights” sobre os carnívoros e por sempre me lembrarem do meu amor aos bichos, me trazendo força e inspiração.

Tenho uma família enorme, minha avó materna teve treze filhos, a paterna onze. Somos muitos, porém unidos. A família apoiou, rezou, visitou, fez farra, ou mesmo só de me tratarem sempre com carinho ajudaram bastante. Obrigada em primeiro lugar a vovó **Teresinha Portela**, que sempre deu valor à educação e com muita garra e coragem conseguiu que seus treze filhos tivessem curso superior. Ao meu tio **Carlos Wagner**, grande incentivador de meus estudos desde criança, aos

tios e tias *Cláudia, David, Edson, Gardênia, Henry, Rosamélia, Wartene*, meus primos que compartilham a vida insana da academia *Fábio e Erica*, aos primos queridos, *Júnior, Katia, Katia Clea e família, Nayla*, e todos os parentes das famílias *Portela e Rocha*.

Tenho a forte sensação que ganho muitos presentes da vida simplesmente por estar perto da natureza. Um desses presentes foi *Pedro Estrela* que conheci no meio do Cerrado. Pedro é meu cúmplice para tudo, pegar a bicharada, identificar os pequenos mamíferos, análises filogenéticas e tantas outras coisas. Muito obrigada por estar ao meu lado, por me dar força, carinho e por ser essa pessoa incrível que você é. ¡*Ahora si, todo bien!*

Família é tudo! Minha mãe, *Carmélia Portela*, é minha fortaleza. Mesmo sem entender minhas escolhas me deu apoio incondicional. Uma ligação tão forte que parece ser de outras vidas. Meu pai, *Adauto Rocha*, sempre teve sede de conhecer lugares, culturas. De pequena, prometeu que me mostraria o Brasil de norte a sul, leste e oeste (e nós fomos!), e aprendi tantas coisas que me ajudam muito pelo mundo afora. Minha irmã *Luciana Rocha* é minha companheira e meu exemplo de caráter e persistência. Meu padraсто *Wellington Mota* está sempre conosco, apoiando em todos os momentos dessa jornada. A pequena *Vitória Rocha* é minha fonte de esperança. Ter uma família assim é uma dádiva, eu não poderia desejar mais. Essa vitória é nossa, gratidão infinita, AMO VOCÊS!

Obrigada às instituições que forneceram infraestrutura e material de consumo ao projeto: Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz, Instituto para a Conservação dos Carnívoros Neotropicais – Pró-Carnívoros, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Pantanal, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros – CENAP. Ao diretor *Darlan Pádua* e toda equipe do escritório do Parque Nacional da Serra da Canastra - PNSC, em especial *Adaniel, Luciano, Paola e Silvia*. A *Aparecida Elorde* e todos da Secretaria de Saúde de São Roque de Minas.

Este estudo foi financiado pela Wildlife Conservation Society – Edital One World One Health (OWOH 2008/001). European Union Seventh Framework Program Grant (ChagasEpiNet 223034). Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT - 9777.256.476.13022008). Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG 07/2009). Consórcio Capim Branco de Energia. Neotropical Grassland Conservancy. Smithsonian Institution. Idea Wild. CNPq Projeto Universal nº 014/2008. Obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de doutorado por quatro anos.

A *todos* que contribuíram nesta tese, o meu expressivo muito obrigada!

Sumário

Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviações	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
Introdução geral	1
A tríade: parasito, hospedeiro e meio ambiente	1
Parasitas e a rede trófica	2
<i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Reservatórios silvestres	7
Carnívoros silvestres e <i>T. cruzi</i>	8
Objetivos	12
CAPÍTULO 1 - Food web connections and the transmission cycles of <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>Trypanosoma evansi</i> (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil.....	13
CAPÍTULO 2 - <i>Trypanosoma cruzi</i> TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil	22
CAPÍTULO 3 - <i>Trypanosoma cruzi</i> infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the <i>T. cruzi</i> transmission chain	34
Abstract	36
Keywords	36
Introduction	37
Material and Methods	39
Ethics Statement.....	39
Study areas	39
Carnivore capture and sample collection	40
<i>Trypanosoma cruzi</i> survey	40
<i>Trypanosoma cruzi</i> molecular characterization	41
Statistical analysis	42

Results	43
Pantanal	43
Serra da Canastra National Park (SCNP).....	44
Araguari/Cumari	44
<i>Trypanosoma cruzi</i> infection rates in relation to species diet.....	44
Neotropical wild carnivores as <i>Trypanosoma cruzi</i> host	44
Discussion	45
References	51
Figures and tables.....	59
Supporting Information.....	66
Discussão geral	77
Conclusões.....	90
Referências.....	91
Anexo - Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública	106

Lista de figuras

Capítulo 1

Figure 1. Possible transmission/infection routes of *Trypanosoma cruzi* among mammals from southern Pantanal, Brazil..... 19

Figure 2. Possible transmission/infection routes of *Trypanosoma evansi* among mammals from southern Pantanal, Brazil..... 19

Capítulo 2

Figure 1. Map of the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from Serra da Canastra National Park (SCNP) and its surroundings. (A) All mammals sampled; (B) *T. cruzi* infected mammals 25

Figure 2. *Trypanosoma cruzi* genotyping of domestic and wild mammal isolates from the Serra da Canastra National Park and surroundings, Brazil. (A) PCR products of the Mini-exon gene analysed by agarose electrophoresis gel stained with ethidium bromide. (B) PCR-RFLP products of 1f8 gene/Alw21I. (C) PCR-RFLP products of histone H3/AluI.....29

Capítulo 3

Figure 1. Spatial distribution of free-ranging carnivore species examined for *Trypanosoma cruzi* infection in Brazil..... 59

Figure 2. *Trypanosoma cruzi* genotyping of wild carnivore isolates from the Pantanal wetland, Mato Grosso do Sul State, Brazil 60

Figure 3. *Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores and the proportion of invertebrates in species' diet 61

Figure 4. *Trypanosoma cruzi* infectiveness rates in Neotropical carnivore species at the tips of their phylogeny..... 62

Figure S3. *Trypanosoma cruzi* infectiveness rates (%) of each species at the tips of the phylogeny and values on the phylogenetic eigenvector 1 (P.E.V. 1) from Agnarsson *et al.* (2010).. 76

Lista de tabelas

Capítulo 1

Table 1. Number of animals positive for <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>T. evansi</i> infection, summarized data from seven years follow-up in mammals from the southern Pantanal.....	17
Table 2. Molecular characterization of 68 isolates of <i>Trypanosoma cruzi</i> derived from sylvatic mammals from the southern Pantanal, Brazil (2002-2009)	17
Table 3. Natural history data of wild mammals studied in the southern Pantanal	18
Table 4. <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>T. evansi</i> co-infected mammal species from the southern Pantanal, Brazil	18

Capítulo 2

Table 1. <i>Trypanosoma cruzi</i> infection assessment through serology (IgG – IFAT/ELISA) and haemoculture (HC) in mammals from the Serra da Canastra National Park and surrounding areas, Brazil.....	28
--	----

Capítulo 3

Table 1. <i>Trypanosoma cruzi</i> infection assessment of wild carnivores from three study sites in Brazil and ecological data	63
Table 2. Neotropical wild carnivores infected by <i>Trypanosoma cruzi</i> from this study and literature records.....	64
Table S1. <i>Trypanosoma cruzi</i> infection rates in Brazil and species diet.....	66
Table S2. <i>Trypanosoma cruzi</i> infectiveness rates (%) of Neotropical wild carnivores from this study and literature records	68

Lista de abreviações

DTU - Discrete Typing Units

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

HC – Hemocultura / Hemoculture

IFAT - Immunofluorescence Antibody Test

PCR – Polymerase chain reaction

PNSC - Parque Nacional da Serra da Canastra

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

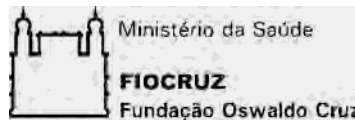
SCNP - Serra da Canastra National Park

A REDE TRÓFICA E O PAPEL DOS CARNÍVOROS SILVESTRES (ORDEM CARNIVORA) NOS CICLOS DE TRANSMISSÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tese de doutorado / Fabiana Lopes Rocha

Resumo

Pouco se sabe sobre a transmissão de *Trypanosoma cruzi* nos diferentes níveis da rede trófica e sobre o papel desempenhado pelos carnívoros silvestres, grupo de mamíferos alvo desse estudo, nos ciclos de transmissão deste parasito. *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um parasito multi-hospedeiro imerso em redes de transmissão complexas que incluem centenas de espécies de mamíferos e dezenas de espécies de triatomíneos, os insetos vetores. O novo perfil epidemiológico, expresso pelos crescentes casos humanos de infecção de *T. cruzi* por via oral, demonstra que muitos aspectos da epidemiologia da doença de Chagas ainda não foram esclarecidos. A natureza primariamente enzootica dessa parasitose ressalta a necessidade de se examinar o ciclo silvestre e o papel das diferentes espécies na manutenção do parasito como forma de esclarecer este novo cenário. Para tanto, examinamos seis ordens de mamíferos silvestres, cães domésticos e porcos ferais quanto à infecção por *T. cruzi* e seus distintos genótipos, através de testes sorológicos, parasitológicos e moleculares, ao longo de sete anos de estudo no Pantanal, Mato Grosso do Sul. Demonstramos que o sistema reservatório no Pantanal inclui espécies de hospedeiros que ocupam todos os habitats e estratos florestais, formando uma rede de transmissão na qual mamíferos especialistas e generalistas estão ligados através de uma robusta rede trófica. Nesse sistema, o quati (*Nasua nasua*) foi considerado o principal reservatório de *T. cruzi* e demonstrou potencial para atuar como bioacumulador e dispersor de todos os genótipos detectados na região, TcI, TcII e TcIII/TcIV. A ampliação da nossa amostragem para o Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC), Minas Gerais e para a região de Araguari/Cumari (Minas Gerais/Goiás) trouxe evidências de que a participação dos carnívoros nos ciclos de *T. cruzi* não foi um achado pontual, visto que as sete espécies examinadas nas três áreas de estudo estavam infectadas por *T. cruzi*. Potencial infectivo (expresso por hemocultivo positivo) foi demonstrado em um felino no PNSC, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), e em duas espécies de procionídeos no Pantanal, o quati e o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*). No PNSC, cães domésticos demonstraram serem bons sentinelas de áreas de transmissão de *T. cruzi* e dos distintos genótipos da área, TcI e TcII. Adicionalmente, fizemos uma análise global dos padrões de infecção nas diferentes espécies de carnívoros na América do Sul, compilando nossos resultados com dados de literatura. Das 21 espécies de carnívoros neotropicais avaliadas, doze foram reportadas naturalmente infectadas por *T. cruzi*, além de três espécies encontradas infectadas no presente estudo: a jaguatirica, o puma (*Puma concolor*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Cada espécie apresentou um potencial diferente para manter e dispersar *T. cruzi*, de acordo com suas características ecológicas e as particularidades das diferentes áreas de estudo. Encontramos uma correlação entre a dieta e taxas de infecção por *T. cruzi* nos carnívoros: quanto maior a proporção de invertebrados na dieta, maiores as taxas de infecção. Espécies da superfamília Musteloidea consistentemente exibiram testes parasitológicos positivos em diferentes estudos, demonstrando um alto potencial infectivo. Mesocarnívoros, que se alimentam de insetos e mamíferos, incluindo o quati, um hospedeiro que pode ser bioacumulador dos genótipos de *T. cruzi*, parecem ocupar o topo da cadeia de transmissão de *T. cruzi* e, portanto, podem ter um importante impacto nas redes de transmissão desse parasito.



FOOD WEB CONNECTIONS AND THE ROLE OF WILD CARNIVORES (ORDER CARNIVORA) IN THE *TRYPANOSOMA CRUZI* TRANSMISSION CYCLES

PhD Thesis / Fabiana Lopes Rocha

Abstract

Little is known on the *Trypanosoma cruzi* transmission in the different trophic levels of the food web and on the role played by Neotropical wild carnivores, the mammalian group target of this study, in the transmission cycles of this parasite. *T. cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is a multihost parasite immersed in complex transmission networks that include hundreds of mammalian species and dozens of triatomines species, the insect vectors. The new epidemiological scenario, expressed by the growing number of human cases due to *T. cruzi* oral infection, demonstrate that numerous aspects of Chagas disease epidemiology still remain unclear. The primarily enzootic nature of this parasitosis emphasize the importance of looking at the sylvatic cycle to examine the role of the different mammalian species in the maintenance of the parasite in order to understand this new scenario. Therefore, we examined six mammalian orders, domestic dogs and feral pigs for *T. cruzi* infection and its distinct genotypes, through serologic, parasitological and molecular tests, during a seven-year follow-up in the Pantanal, Mato Grosso do Sul State, Brazil. We demonstrated that the reservoir system in the Pantanal includes host species that occupy all habitat types and forest strata, constituting a transmission network involving generalist and specialist mammalian species that are linked through a robust food-web connection. In this system, the coati (*Nasua nasua*) was considered the main *T. cruzi* reservoir, and demonstrated potential to act as a bioaccumulator and disperser of all the *T. cruzi* genotypes detected in the region, TcI, TcII and TcIII/IV. The extension of our studies to the Serra da Canastra National Park (SCNP) - Minas Gerais State, and to the Araguari/Cumari regions (Minas Gerais/Goias States) provided evidence that the participation of wild carnivores in the *T. cruzi* transmission cycles was not a punctual finding, given that the seven carnivore species examined in the three study sites were infected by *T. cruzi*. Infectivity potential (expressed by positive hemoculture) was demonstrated in a felid from the SCNP, the ocelot (*Leopardus pardalis*), and in two procyonid species from the Pantanal, the coati and the raccoon (*Procyon cancrivorus*). In the SCNP, domestic dogs demonstrated to be good sentinels for *T. cruzi* transmission areas and the distinct genotypes circulating in the region, TcI and TcII. Additionally, we provided a comprehensive analysis of infection patterns among distinct carnivore species, by assembling our data with *T. cruzi* infection on South America carnivores' literature records. Twelve out of twenty-one Neotropical carnivores evaluated species were described to be infected by *T. cruzi*, besides other three species found infected in the present study: the ocelot, the puma (*Puma concolor*) and the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Each species demonstrated a different potential to maintain and disperse *T. cruzi*, according their ecological characteristics and peculiarities of the different study areas. Species diet was associated with *T. cruzi* infection rates: the higher the proportion of invertebrates in species diet, the greater *T. cruzi* infection rate. Musteloidea species consistently exhibit high parasitemias in different studies, which indicate their high infectivity potential. Mesocarnivores that feed on both invertebrates and mammals, including the coati, a host that can be bioaccumulator of *T. cruzi* genotypes, seem to take place at the top of *T. cruzi* transmission chain; therefore, they may have a huge impact on the transmission cycles of this parasite.

Introdução geral

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, é um parasito multi-hospedeiro que está imerso em redes de transmissão complexas que incluem centenas de espécies de mamíferos e triatomíneos da família Reduviidae, os insetos vetores. Embora *T. cruzi* seja capaz de infectar um número expressivo de espécies de mamíferos, de acordo com as particularidades da interação parasito-hospedeiro, algumas espécies mantêm parasitemias mais altas e/ou longas que outras, refletindo diferentes habilidades de transmitir o parasito, e desta forma, de atuarem como reservatórios. Ainda, as características ecológicas de cada espécie, bem como suas interações com outros hospedeiros mamíferos e vetores na rede trófica, são fundamentais na definição do seu papel nos ciclos de transmissão de um determinado parasito. Nesse sentido, pouco se sabe sobre a transmissão de *T. cruzi* nos diferentes níveis da rede trófica e sobre o papel desempenhado pelos carnívoros silvestres, grupo de mamíferos alvo deste estudo, nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*.

A tríade: parasito, hospedeiro e meio ambiente

Para a maioria das pessoas o termo “parasito” é associado a impactos negativos, doença grave ou até mesmo a morte dos indivíduos infectados. Isto não é surpreendente, visto que depender metabolicamente dos hospedeiros está no centro de muitas das diferentes definições de parasitismo (Smyth 1994) e essa dependência metabólica remete à exploração e necessariamente dano. Na verdade, parasitos podem ter efeitos positivos e negativos, seja considerando os indivíduos ou suas populações (Haine *et al.* 2004, Hatcher *et al.* 2006). Contudo, a visão de parasitismo associado a dano permeia pelos estudos de interação parasito-hospedeiro.

Parasitos exploram os seus hospedeiros tanto como um recurso metabólico quanto como um “habitat” (Loreau *et al.* 2005). Os habitats dos parasitos, os hospedeiros, são modulados por interações agonísticas, competição, fatores climáticos e outras variáveis do meio ambiente no qual estão inseridos. O potencial de causar dano, benefício ou nenhum dos dois está relacionado a fatores ligados ao parasito como, por exemplo, a virulência, que varia conforme o contexto dependendo da rota de transmissão, coinfeções e sistema imune, representando o “micro-habitat” do hospedeiro, que por sua vez está sujeito as influência das variáveis do meio externo (Brown *et al.* 2003, Ryan & Kohler 2010). O resultado da interação parasito-hospedeiro vai ser determinado pelo conjunto das variáveis do micro-habitat do hospedeiro e do hospedeiro com o meio ambiente, de modo que um mesmo parasito pode causar dano ao hospedeiro em uma circunstância e ser benéfico em outra (Thomas *et al.* 2000).

Parasitos e hospedeiros são componentes de um sistema complexo, adaptativo e mutável no tempo e no espaço, no qual suas inter-relações modulam toda uma comunidade de organismos e podem influenciar em maior ou menor grau o caminho evolutivo das espécies. Nesse sentido, parasitos são considerados importantes promotores de biodiversidade (Hudson *et al.* 2006, Hatcher *et al.* 2012). Portanto, as relações parasito-hospedeiro podem ser vistas como sistemas embutidos dentro de sistemas maiores representados pelas comunidades ecológicas e ecossistemas (Horwitz & Wilcox 2005). Nesse sentido, a transmissão de parasitos é um processo essencialmente ecológico que envolve a interação de muitos indivíduos e, frequentemente, duas ou mais espécies (Keesing *et al.* 2006). Analisar a relação parasito-hospedeiro sob a perspectiva de sistemas complexos e interdependentes é a forma mais adequada de compreender a epidemiologia dos ciclos de transmissão.

Parasitos e a rede trófica

As redes tróficas, conjunto de relações que ligam as espécies do ponto de vista alimentar, traçam o fluxo de energia no ecossistema (Winemiller & Polis 1996). Parasitos são ubíquos e ocorrem em todas as cadeias alimentares e todos os níveis tróficos. O parasitismo é estratégia mais comum de consumidores (De Meeus & Renaud 2002), no entanto, raramente parasitos são considerados como um elemento da rede trófica. Os poucos estudos que incluíram parasitos nos modelos de redes tróficas indicam que estes podem aumentar o conhecimento acerca da riqueza de espécies, número de conexões, amplitude e topologia das redes tróficas (Thompson *et al.* 2005, Lafferty *et al.* 2006, Hernandez & Sukhdeo 2008).

Numa rede trófica, parasitos podem eventualmente ocuparem a posição de presas, representando um aporte energético no ecossistema, apesar do seu tamanho pequeno. Por exemplo, em um estudo de predadores nas ilhas do Golfo da Califórnia, lagartos eram mais abundantes nas ilhas que tinham colônias de aves marinhas porque se alimentavam dos ecoparasitos das aves (Polis & Hurd 1996), ou no caso de macroparasitos, como os nematódeos, que podem ter uma contribuição na dieta do predador (Johnson *et al.* 2010).

Ainda, a sobrevivência de alguns parasitos pode ser diretamente relacionada às interações da rede trófica, como no caso de algumas espécies de parasitos que dependem da predação de um hospedeiro intermediário para um hospedeiro definitivo para completarem seus ciclos de vida (Choisy *et al.* 2003). Parasitos que infectam novos hospedeiros via rede trófica podem alterar o comportamento ou morfologia do hospedeiro, de forma a aumentar o risco de predação e assim alcançar o próximo hospedeiro (Poulin *et al.* 2005, Thomas *et al.* 2010). Não obstante, as interações

tróficas raramente são consideradas nos estudos parasitológicos (Chen *et al.* 2008, Sukhdeo 2010, Sukhdeo 2012).

Avaliar as interações dos componentes da rede trófica no estudo dos ciclos de transmissão de parasitos na natureza é fundamental, especialmente no caso de parasitos multi-hospedeiros, como *T. cruzi*, capaz de infectar centenas de espécies de mamífero e de ser transmitido diretamente através da via oral. Neste caso, a transmissão vai depender das interações tróficas entre eles. Nesse contexto, *T. cruzi* é um bom modelo de estudo da transmissão de parasitos via rede trófica e do fenômeno do parasitismo de modo geral, visto que é um parasito extremamente heterogêneo e marcadores moleculares permitem rastrear seus diferentes genótipos. A identificação dos genótipos de *T. cruzi* que infectam cada hospedeiro dentro de uma rede trófica contribui para o conhecimento da dinâmica de transmissão dos diferentes genótipos e dos fatores que modulam seus ciclos de transmissão numa determinada área, importante informação para auxiliar na implementação de estratégias de controle. Por outro lado, o conhecimento da dispersão dos genótipos de *T. cruzi* entre diferentes espécies pode trazer informações sobre aspectos ecológicos dos hospedeiros e sobre as conexões diretas entre eles na rede trófica.

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi (Chagas 1909), pertence à família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida. É um protozoário flagelado que circula na natureza em oito ordens de mamíferos e dezenas de espécies de triatomíneos da família Reduviidae, seus vetores (Noireau *et al.* 2009). *T. cruzi* é amplamente distribuído na natureza desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, abrangendo 21 países nas Américas (Roellig *et al.* 2008, Piccinali *et al.* 2010, Carrasco *et al.* 2012). A doença de Chagas, um dos possíveis resultados da infecção por *T. cruzi* em humanos, é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das treze doenças tropicais mais negligenciadas no mundo (Hotez *et al.* 2008). Atualmente, existem cerca de 8-9 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* na América Latina e estima-se que outros 100 milhões estejam em risco potencial de infecção em todo o mundo devido à migração humana de países endêmicos para não endêmicos (Rassi Jr. *et al.* 2010, Schmunis & Yadon 2010).

Estima-se que *T. cruzi* tenha emergido como espécie há cerca de 100 milhões de anos atrás no “supercontinente” formado pelos atuais continentes da América do Sul, Antártica e Austrália, que continuaram conectados após a separação da África (Stevens *et al.* 1999). Uma das hipóteses é que *T. cruzi* era transmitido diretamente entre marsupiais e xenartras, que representavam a fauna autóctone desse supercontinente e, posteriormente, por via vetorial para outros mamíferos, depois

da aquisição do hábito de hematofagia pelos triatomíneos há cerca de cinco milhões de anos (Schofield 2000). Uma hipótese alternativa sugere uma origem mais recente, entre 58-70 milhões de anos, baseado na hipótese de que *T. cruzi* evoluiu de um clado mais amplo de tripanosomas de morcegos que posteriormente se adaptou aos mamíferos terrestres (Hamilton *et al.* 2009, Hamilton *et al.* 2012). Independente da origem e tempo, desde então, *T. cruzi* foi se adaptando aos novos hospedeiros na medida em que estes chegaram à América do Sul: inicialmente os roedores e primatas, depois os morcegos e carnívoros e, por último, o homem. Assim, *T. cruzi* foi e ainda é mantido há milhões de anos como uma enzootia, de modo que a infecção no homem pode ser considerada recente na história evolutiva de *T. cruzi* (Guhl *et al.* 2000).

Essa diversidade de hospedeiros nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* fez com que este táxon sofresse diferentes pressões seletivas que resultaram na extrema diversidade genética que observamos hoje (Macedo *et al.* 2004, Freitas *et al.* 2006). A heterogeneidade de *T. cruzi* foi notada desde sua descoberta por Carlos Chagas (formas finas e largas) e, desde então, várias ferramentas metodológicas tem sido empregadas para determinar marcadores bioquímicos, biológicos e moleculares que possam auxiliar na compreensão da epidemiologia da doença de Chagas (Zingales *et al.* 2009, Rassi Jr. *et al.* 2010).

Atualmente, *T. cruzi* inclui seis genótipos ou Unidades Discretas de Tipagem (DTU - Discrete Typing Units), *T. cruzi* I (TcI) a *T. cruzi* VI (TcVI), além do TcBat, genótipo recentemente proposto descrito como restrito a morcegos (Zingales *et al.* 2009, Marcili *et al.* 2009). Estudos recentes reportam ainda variabilidade em isolados de TcI e recomendam a subdivisão deste genótipo em quatro subtipos TcI-a a TcI-d (Guhl & Ramirez 2011, Ramirez *et al.* 2012). As DTU TcI e TcII são consideradas as linhagens ancestrais e estima-se que a divergência entre elas tenha ocorrido entre 3 a 8 milhões de anos (Briones *et al.* 1999, Machado & Ayala 2001). TcIII e TcIV podem ter se originado de um evento antigo de troca genética entre TcI e TcII, seguido de mutações (Westenberger *et al.* 2005). Contudo, essa hipótese ainda é debatida e outro modelo de origem das DTU propõe TcIII como uma terceira linhagem ancestral (Freitas *et al.* 2006). As DTU TcV e TcVI são consideradas linhagens híbridas por apresentarem alelos intactos de TcII e TcIII tão distintos que não poderiam ter surgido independentemente (Lewis *et al.* 2011).

Todas essas DTU ocorrem no Brasil, mas são propostos diferentes distribuições geográficas e padrões ecoepidemiológicos. TcI é o genótipo mais frequente na natureza e o mais conhecido em termos de distribuição geográfica, variedade de espécies de hospedeiros, vetores e ecossistemas. TcII é o segundo mais frequente na natureza, embora geralmente seja descrito em ciclos mais focais (Zingales *et al.* 2012). Essa DTU tem sido reportada principalmente na região central do Brasil,

abaixo da Bacia Amazônica, onde foi associado à maioria dos casos humanos nas antigas áreas endêmicas do país (Di Noia *et al.* 2002). As DTU TcIII e IV (antigo Z3) são descritas como predominantemente associados à hospedeiros silvestres de várias ordens e biomas (Lisboa *et al.* 2009) e recentemente foram registrados em um surto de doença de Chagas aguda na região Amazônica (Monteiro *et al.* 2010, Monteiro *et al.* 2012). As DTU TcV e TcVI são reportadas como primariamente associadas a ciclos domésticos no sul do país, com raros registros em ciclos silvestres (Araujo *et al.* 2011, Zingales *et al.* 2012). Apesar dos esforços, cada nova evidência deixa claro que as associações de hospedeiros e ecótopos propostas até o momento para os diferentes genótipos ainda são pouco robustas e possivelmente refletem subamostragem de hospedeiros e ambientes.

As DTU podem circular nos ambientes doméstico, peridoméstico ou silvestre. Neste último ambiente, o ciclo de transmissão geralmente é tratado como um ciclo único, porém, essa é uma visão reducionista, pois na natureza podem existir vários ciclos silvestres conectados ou independentes em diferentes habitats e estratos florestais (Pinho *et al.* 2000, Rozas *et al.* 2007, Alvarado-Otegui *et al.* 2012). O conhecimento da epidemiologia e dinâmica de transmissão de cada genótipo é a base para se rastrear as possíveis fontes de infecção do homem e para compreensão dos fatores de risco de emergência de surtos da doença de Chagas. Além da importância em saúde pública, rastrear a dispersão das DTU na natureza é essencial para compreender a história natural e evolutiva de *T. cruzi*.

A infecção por *T. cruzi* pode ocorrer por várias vias. A via contaminativa ocorre quando o inseto vetor infectado, ao realizar seu repasto sanguíneo, elimina as formas tripomastigotas metacíclicas junto com as fezes. Esses parasitos penetram pelo local da picada quando o hospedeiro vertebrado coça ou esfrega o local. No hospedeiro mamífero, esses parasitos invadem as células nucleadas de praticamente todos os tecidos e se multiplicam na forma de amastigota. Nas células nucleadas ocorre uma nova diferenciação para a forma tripomastigota, seguida de rompimento da célula e liberação destas formas na corrente sanguínea. A transmissão para o inseto vetor se dá quando este ingere durante o repasto sanguíneo as formas tripomastigotas circulantes no sangue do hospedeiro mamífero. No vetor invertebrado, o parasito se diferencia em epimastigota, que é a forma replicativa no trato digestivo do inseto. Essas formas migram para a porção final do intestino do inseto, onde sofrem nova diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva eliminada nas fezes do inseto (Teixeira *et al.* 2012).

Na natureza, a via oral é a mais antiga e provavelmente a mais eficiente via de transmissão de *T. cruzi* (Noireau *et al.* 2009). A infecção de mamíferos por esta via pode ocorrer em diversas circunstâncias: (i) quando o animal coça o local da picada com a boca e ingere fezes contaminadas de triatomíneos; (ii) ingestão de frutos ou sementes contaminados por fezes infectadas de triatomíneos ou excreção de glândula de cheiro de *Didelphis spp.* que podem eliminar formas infectivas do parasito (metacíclicos) (Deane *et al.* 1984); (iii) ingestão de triatomíneos infectados; (iv) interações agonísticas que envolvam mordeduras com perfuração que permitam o contato da mucosa da boca com sangue infectado; ou (v) predação de mamíferos infectados (Thomas *et al.* 2007, Roellig *et al.* 2009a, Jansen & Roque 2010, PAHO 2009). Essa última (predador-presa) pode ocorrer pela ingestão de tripomastigotas sanguícolas e também pelas amastigotas presentes nos tecidos das presas, visto que amastigotas são infectivas (Mortara *et al.* 2008), o que destaca a importância das interações na rede trófica nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*.

Em humanos, além da forma contaminativa, a transmissão pode ocorrer por outros mecanismos não-vetoriais, como transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e infecção oral. Recentemente, a doença de Chagas tem sido reconhecida como uma doença emergente de origem alimentar pelo crescente número de surtos por via oral nas últimas décadas (Yoshida *et al.* 2011, Shikanai-Yasuda & Carvalho 2012). Esse novo perfil epidemiológico desafia as autoridades de saúde porque as medidas de controle anteriormente empregadas não são eficientes neste cenário e ressalta a importância de se olhar para os ciclos silvestres para compreender os componentes deste sistema complexo e os fatores ambientais que favorecem o aparecimento de casos humanos. De fato, apesar da doença de Chagas ter sido reconhecida desde sua descoberta por Carlos Chagas como uma enzootia há mais de um século (Chagas 1909), ainda existem muitas questões em aberto relativas à ecologia de *T. cruzi* e dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestres.

Um dos pontos de destaque para se compreender a complexa cadeia de transmissão de *T. cruzi* é a identificação das espécies que podem atuar como potenciais reservatórios nas áreas de transmissão. Esta avaliação deve ter um olhar abrangente e multidisciplinar, e envolve o conhecimento da diversidade de mamíferos da área em questão (potenciais reservatórios do parasito), das peculiaridades da interação parasito-hospedeiro nessas espécies, bem como das características ecológicas de cada uma, que vão favorecer (ou não) o contato com outros mamíferos e vetores que afinal modela a dinâmica de transmissão de *T. cruzi*.

Reservatórios silvestres

O encontro de um animal infectado não é suficiente para considerarmos este um reservatório. Um animal infectado é um hospedeiro do parasito, mas sua importância na manutenção do ciclo de transmissão numa dada área está relacionada à habilidade do parasito de persistir neste hospedeiro, bem como das inter-relações do hospedeiro na comunidade que favoreçam a transmissão deste parasito; esse conjunto é que vai determinar a competência da espécie animal em questão na manutenção do parasito e, portanto, seu papel como reservatório (Jansen & Roque, 2010).

As interações parasito-hospedeiro apresentam particularidades determinadas por fatores relacionados ao hospedeiro (sexo, idade, padrão comportamental, competência imunológica, coinfeções) e ao parasito (tempo de geração, potencial reprodutivo, estratégias de transmissão). Assim, consideramos *hospedeiros mantenedores* aqueles capazes de manter a infecção de um dado parasita. *Hospedeiros dispersores* são aqueles que apresentam um perfil de infecção que favorece a transmissão do parasito em questão (p. ex. alta transmissibilidade). É importante ressaltar que essas características são mutáveis, de modo que reservatórios mantenedores podem agir como dispersores por fatores como imunossupressão, estresse e infecções parasitárias concomitantes (Coors & Meester 2011, Ulrich & Schmid-Hempel 2012).

No caso de *T. cruzi*, a infectividade de uma determinada espécie de mamífero aos triatomíneos é garantida pela presença de formas infectantes do parasito na circulação sanguínea do mamífero que possam ser disponíveis ao vetor durante seu repasto sanguíneo. Essa característica é demonstrada pela detecção do parasito no sangue do mamífero através de testes parasitológicos que incluem exame a fresco, hemocultura e xenodiagnóstico (Jansen & Roque 2010). Considerando que uma vez infectado por *T. cruzi* um animal não se livra da infecção, com raras exceções, o encontro de um animal positivo em testes sorológicos indica que o animal está infectado, mas não reflete seu potencial de infectividade aos vetores.

A manutenção de parasitos multi-hospedeiros como *T. cruzi* numa determinada área depende da distribuição, abundância e comportamento das muitas espécies com as quais o parasito interage, não apenas das mais eficientes em manter o parasito (Brisson *et al.* 2011). Neste contexto, tomando como base principalmente os trabalhos de Ashford (1997) e Haydon e colaboradores (2002), consideramos como *reservatório* não apenas uma espécie de mamífero encontrada infectada, mas um sistema que inclui uma ou mais espécies de mamíferos responsáveis pela manutenção de longo prazo de um parasito na natureza.

Estudos com hospedeiros reservatórios devem considerar as diferentes características epidemiológicas e padrões de infecção, os quais se modificam de uma região para outra em função de: (a) das estratégias de vida e ciclo reprodutivo dos hospedeiros vertebrados; (b) do habitat e clima locais; (c) da presença, hábitos e capacidade vetorial do hospedeiro invertebrado e; (d) das peculiaridades da interação parasito-hospedeiro (Ashford 1996, Roque *et al.* 2005). Portanto, o sistema reservatório é multifatorial, imprevisível e dinâmico, formando uma unidade biológica que está em constante mudança em função das alterações do meio ambiente e deve ser considerado em intervalos determinados de tempo e espaço. Isto significa que generalizar o papel de uma espécie e os cenários epidemiológicos pode resultar no insucesso das medidas de controle.

Carnívoros silvestres e *T. cruzi*

A ordem Carnivora atualmente consiste de 287 espécies, distribuídas em 15 famílias que incluem os maiores predadores terrestres do mundo (ex: tigre, leão, onça pintada), os animais de estimação preferidos do homem (cães e gatos) e animais ícones (ex: panda, urso polar) (Wozencraft 2005, Agnarsson *et al.* 2010). Ocorrem naturalmente em todo o mundo, exceto na Austrália, Nova Guiné, Nova Zelândia, Antártica e muitas ilhas oceânicas (Nowak 1999). O nome deste grupo taxonômico advém das adaptações de suas espécies à predação, com um aparato de dentes, mandíbula e crânio especialmente fortes para capturar, matar e desmembrar suas presas. Uma característica desta ordem é o conjunto de dentes especializados ao corte, formado pelos dentes caninos e o par carniceiro (quarto pré-molar superior e primeiro molar inferior) (Eisenberg & Redford 1999). Assim como a dentição, toda a estrutura do corpo dos carnívoros é adaptada para caça: rápida locomoção, alta acuidade visual e olfatória e a presença de quatro a cinco dedos com garras cortantes em cada membro, outra característica do grupo (Nowak 2005).

As espécies da ordem Carnivora apresentam uma notável diversidade ecológica em características como período de atividade, sistema social, tamanho de área de vida, entre outros, ocupando praticamente todos os tipos de habitat e nichos ecológicos (Gittleman *et al.* 2001). Como grupo, os carnívoros apresentam uma grande variedade de tamanhos, sendo que o menor carnívoro, o furão (*Mustela nivalis*), pode pesar apenas 35 gramas e o gigante urso polar chega a pesar 800 kg (Nowak 2005). Contudo, a maioria das espécies desta ordem são carnívoros de médio porte (< 15kg), conhecidos como mesocarnívoros (Roemer *et al.* 2009). Ao longo do processo evolutivo, os carnívoros foram se diversificando também nos seus hábitos alimentares, variando desde espécies majoritariamente insetívoras, frugívoras, onívoras ou essencialmente carnívoras, as quais ocupam o topo das cadeias alimentares.

Os carnívoros de topo de cadeia alimentar são reconhecidos como importantes reguladores de ecossistemas, desempenhando um papel chave na regulação das cascatas tróficas, através de um efeito direto nas populações de presas por predação ou por efeito indireto dos predadores menores e herbívoros nas populações de plantas e insetos, modulando toda a estrutura da comunidade (Letnic *et al.* 2012). A posição de topo de cadeia resulta na interação com vários taxa e, conseqüentemente, dos organismos parasitando cada táxon. De fato, estudos demonstraram que quanto mais alto o nível trófico de um determinado táxon, maior a diversidade de seus parasitos (Lafferty *et al.* 2006, Chen *et al.* 2008). Essa interação dos carnívoros com vários taxa pode favorecer a exposição a parasitos multi-hospedeiros como *Trypanosoma cruzi*, capaz de infectar centenas de espécies de mamíferos e de ser transmitido diretamente através da via oral, uma das mais importantes na natureza (Noireau *et al.* 2009).

Algumas espécies de carnívoros já foram descritas naturalmente infectadas por *T. cruzi* e, considerando a eficiência da infecção por via oral, carnívoros podem ocupar uma posição única como bioacumuladores de parasitos e, provavelmente, dos seus distintos genótipos. Contudo, pouco se conhece sobre o papel dos carnívoros nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*. Os primeiros relatos datam das décadas de 1930-1940, com o trabalho pioneiro de Ferreira & Deane (1938) que identificou *T. cruzi* em duas das três iraras (*Eira barbara*) examinadas na região do Amazonas, e de Mazza (1940) que reportou a infecção em uma irara e uma raposa andina (*Lycalopex culpaeus andinus*) na Argentina. Nas décadas de 1960-1970, Leonidas Deane e o grupo liderado por Mauro Barreto conduziram uma série de estudos sobre reservatórios e vetores silvestres de *T. cruzi* e descreveram alguns espécimes de canídeos, mustelídeos e procionídeos infectados por *T. cruzi*, os quais nomearam de “reservatórios naturais” (Deane 1961, Deane 1964, Barretto 1964, Albuquerque & Barretto 1968, Ferriolli & Barretto 1968, Ferriolli & Barretto 1969, Albuquerque & Barretto 1970, Barretto & Ferriolli 1970, Barretto & Albuquerque 1971, Barretto & Ribeiro 1972, Barretto & Ribeiro 1979). Vale ressaltar que a identificação de *T. cruzi* naquela época era baseada em caracterização morfológica. Com os estudos subsequentes e a mudança no conceito de reservatório, os pesquisadores começaram a entender que as espécies diferem em sua capacidade de transmitir o parasito e de serem considerados como reservatórios.

Em estudos mais recentes, existem dados disponíveis principalmente acerca de duas espécies de procionídeos, o guaxinim norte-americano (*Procyon lotor*) e o quati (*Nasua nasua*) no Brasil, e de um mephitídeo, a jaratataca (*Conepatus chinga*) na Argentina (Ceballos *et al.* 2006, Herrera *et al.* 2008, Cardinal *et al.* 2008, Roellig *et al.* 2009b, Alves *et al.* 2011, Charles *et al.* 2012). Nas demais espécies, o que se sabe é que estão expostas aos ciclos de transmissão de *T. cruzi*

em diferentes ambientes, como demonstrado por testes sorológicos (Rosypal *et al.* 2007, Brown *et al.* 2010, Rosypal *et al.* 2010).

Essa ordem de mamíferos apresenta uma combinação de características biológicas que fornece várias oportunidades para se infectar por *T. cruzi* na natureza: vivem muito, possuem dieta eclética, grandes áreas de vida, dispersam por longas distâncias e possuem habilidade para explorar os estratos arbóreos e terrestres em diferentes tipos de habitats (Nowak 2005). Uma vez que carnívoros são reguladores de ecossistemas, eles também podem ter um efeito importante nas redes de transmissão de parasitos multi-hospedeiros, como as redes de *T. cruzi*, visto que eles predam em espécies de vários taxa. Portanto, a investigação da infecção por *T. cruzi* nos carnívoros é crucial para se compreender a ecologia e epidemiologia deste parasito e de seus diferentes genótipos.

Neste contexto, esta tese tem como objetivo geral avaliar a transmissão de *Trypanosoma cruzi* e de seus genótipos nos diferentes níveis da rede trófica e o papel desempenhado pelos carnívoros silvestres nos ciclos de transmissão deste parasito. Os materiais e métodos empregados, bem como os resultados obtidos estão organizados em três capítulos em formato de artigos científicos:

O primeiro capítulo, *Food web connections and the transmission cycles of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma evansi (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil*, trata da transmissão de *T. cruzi* e seus genótipos em seis ordens de mamíferos silvestres, além de cães domésticos e porcos ferais ao longo de sete anos de estudo na sub-região da Nhecolândia, Pantanal sul-matogrossense.

No segundo capítulo, *Trypanosoma cruzi TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil*, mapeamos e avaliamos a distribuição espacial da infecção por *T. cruzi* e de suas populações em carnívoros silvestres, pequenos mamíferos e cães domésticos, numa área de interface entre ambiente silvestre e doméstico.

No terceiro capítulo, *Trypanosoma cruzi infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the T. cruzi transmission chain*, avaliamos a infecção por *T. cruzi* em carnívoros silvestres em três áreas de estudo. Ainda, fizemos uma avaliação geral da infecção por *T. cruzi* em carnívoros da América do Sul, compilando nossos resultados e dados de literatura, para analisar os padrões de infecção e as possíveis correlações entre as distintas espécies de carnívoros, especialmente considerando sua dieta e filogenia.

Por fim, em anexo, o artigo “*Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública*” é uma revisão de literatura sobre patógenos em carnívoros brasileiros, que inclui considerações sobre métodos diagnósticos, estratégias de controle e manejo, bem como implicações para a conservação das espécies e saúde pública.

Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a transmissão de *Trypanosoma cruzi* e de seus genótipos nos diferentes níveis da rede trófica e o papel desempenhado pelos carnívoros silvestres nos ciclos de transmissão deste parasito.

Objetivos específicos:

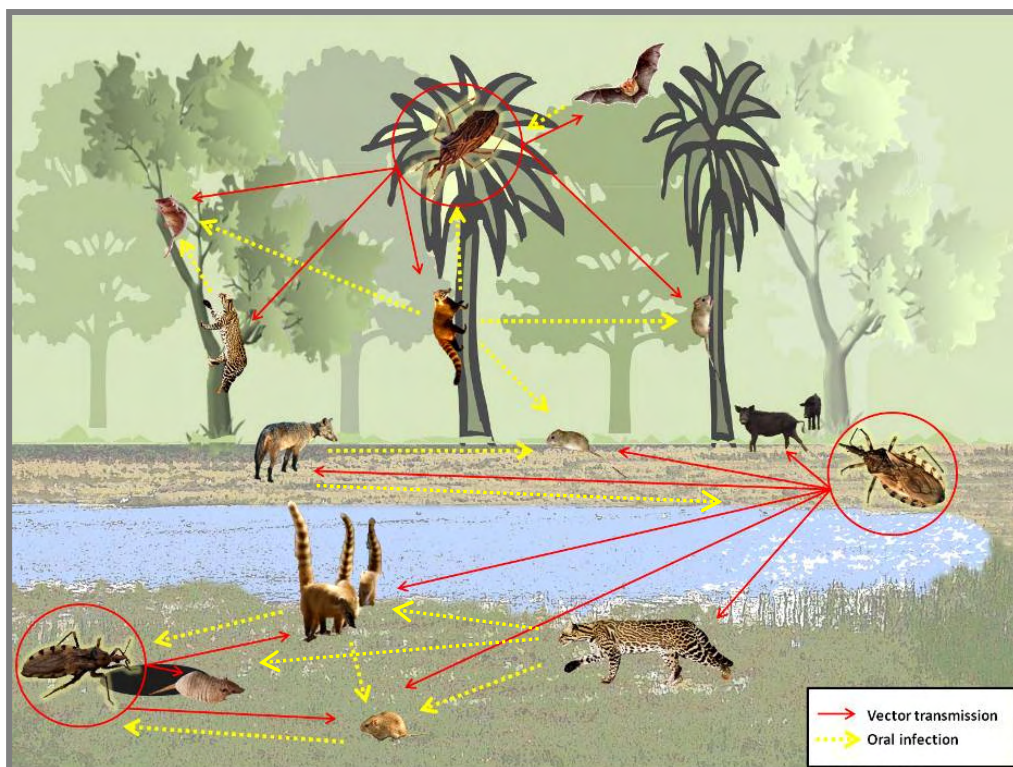
- (i) Avaliar o ciclo de transmissão de *T. cruzi* e de seus genótipos em seis ordens de mamíferos silvestres, cães domésticos e porcos ferais no Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, por testes sorológicos, parasitológicos e moleculares;
- (ii) Mapear e avaliar a distribuição espacial da infecção por *T. cruzi* e de seus genótipos em carnívoros silvestres, pequenos mamíferos e cães domésticos, nos ambientes silvestre e peridoméstico, através de testes sorológicos, parasitológicos e moleculares, no Parque Nacional da Serra da Canstra (PNSC) e arredores, Minas Gerais;
- (iii) Diagnosticar a infecção por *T. cruzi* e a competência infectiva, por métodos parasitológicos e sorológicos na comunidade de carnívoros do Pantanal e PNSC, e por métodos sorológicos na região de Araguari/Cumari (Minas Gerais/Goiás). Caracterizar os isolados de *T. cruzi* por métodos moleculares.
- (iv) Fazer uma análise global da infecção por *T. cruzi* em carnívoros silvestres da América Sul, compilando resultados deste estudo e dados de literatura, e verificar possíveis correlações das taxas de infecção e competência infectiva entre as diferentes espécies, especialmente considerando a dieta e filogenia.

CAPÍTULO 1

Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil.

Heitor Miraglia Herrera, **Fabiana Lopes Rocha**, Cristiane Varela Lisboa, Vitor Rademaker, Guilherme Mourão e Ana Maria Jansen.

Artigo publicado na *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2011), 105: 380– 387. Doi: 10.1016/j.trstmh.2011.04.008



Possíveis rotas de transmissão/infecção de *Trypanosoma cruzi* entre mamíferos e vetores no Pantanal, Mato Grosso do Sul.

(Ilustração: Fabiana Rocha)



Contents lists available at ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil

H.M. Herrera^{a,b,*}, F.L. Rocha^{a,c}, C.V. Lisboa^a, V. Rademaker^a, G.M. Mourão^b, A.M. Jansen^a^a Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, FIOCRUZ/RJ. Av. Brasil 4365. CEP: 21045-900 - Rio de Janeiro, RJ^b Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, EMBRAPA/Pantanal. Rua 21 de Setembro, 1880. CEP: 79320-900 - Corumbá, MS^c Tríade - Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação - Rua Silveira Lobo, 32, Caixa Postal 48, Bairro Casa Forte, Recife-PE, CEP: 52061-030

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2010

Received in revised form 13 April 2011

Accepted 13 April 2011

Available online 20 May 2011

Keywords:

*Trypanosoma cruzi**Trypanosoma evansi*

Transmission cycles

Reservoir host

Oral transmission

Pantanal

ABSTRACT

We examined by parasitological tests (hemocultures and buffy coat) infection by *Trypanosoma cruzi* and *T. evansi* in blood samples from *Leopardus pardalis*, *Cerdocyon thous* and domestic dogs. Besides, 25 *T. cruzi* isolates previously derived from feral pigs and small wild mammals were here characterized by miniexon gene and demonstrated to be in the TcI genotype. Herein, we make an overall analysis of the transmission cycle of both trypanosome species in the light of the assemblage of data collected over the last seven years. The carnivore *Nasua nasua* was confirmed to play a major role in the transmission cycles of both *T. cruzi* and *T. evansi* since it was the species that had the higher prevalence and higher parasitemias by both flagellate species. In addition, our results show that both trypanosomatid species may be found throughout the Pantanal landscape, in all forest strata, as shown by the infection of carnivore, arboreal and terrestrial scansorial marsupial species in complex and seasonal transmission cycles. We propose that transmission of *T. cruzi* and *T. evansi* in the southern Pantanal region takes place via an intricate ecological trophic network involving generalist and specialist mammal species that are linked through a robust food-web connection.

© 2011 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Trypanosomatidae species *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* are of considerable health importance since these flagellates are, respectively, the etiologic agents of Chagas disease (American trypanosomiasis) and of animal trypanosomiasis. *Trypanosoma cruzi* is distributed in the different biomes of the American continent, between latitudes 41°N and 46°S, while *T. evansi* is found throughout tropical and subtropical areas of the world. Although members of a family of highly divergent eukaryotes, these

two trypanosome species display different life cycles that result in distinctive lifestyle strategies. However, as a common feature, these two trypanosome species infect a broad range of sylvatic mammalian species and are able to inhabit a wide variety of host tissues.^{1,2}

In Brazil, besides the still occurring congenital cases and the classical contaminative infection cases, new cases of Chagas Disease are mainly associated to the ingestion of contaminated food probably originated from infected vectors. In fact, the oral transmission has been demonstrated as an effective mechanism and, after the main domiciliary vector *T. infestans* and the blood bank transmission of *T. cruzi* were controlled in Brazil, infection by oral route came to be the most important and permanent transmission mechanism.³

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25984324; fax: +55 21 25606572.
E-mail address: herrera@ioc.fiocruz.br (H.M. Herrera).

Trypanosoma cruzi is characterized by an extremely high level of genetic diversity revealed by biochemical, biological and molecular tools and currently six discrete typing units (DTUs), respectively TcI to TcVI, are recognized in the taxon.^{4,5} Moreover, in Brazil, distinct epidemiological scenarios have already been proposed such as a putative association of the genotypes TcI and TcII/formerly TcIIb⁵ with, respectively, the sylvatic and the domestic transmission cycles.⁶ In spite of all these studies this is still an intensively discussed topic. Furthermore, the expressive amount of available data has still left several gaps in the knowledge of the intricate *T. cruzi* transmission network in the wild, probably because examination and follow-up of free ranging mammals is a difficult task.

Animal trypanosomiasis due to *T. evansi*, popularly known in the Pantanal as 'Mal de Cadeiras', is a severe acute disease in horses and dogs, sub-clinical in cattle.^{7,8} Moreover, capybaras support infections without apparent damage.⁸ This monomorphic flagellate species is transmitted only mechanically by biting flies of the genera *Tabanus* and *Stomoxys* and similar to other African salivarian trypanosomes has a huge diversity of surface glycoprotein coat.²

The Pantanal is a 160 000 km² floodplain located in the centre of the South American continent, formed by the upper Paraguay River and its tributaries. It is a mosaic of seasonally inundated native grasslands, savannas and scrub savannas, river corridors, lakes, gallery forests and patches of scrub and semi-deciduous forests. In this highly diverse environment, in which different wildlife and domestic species shares the same habitats, the landscape dynamics and resource availability change according to a multi-year variation of flooding intensity.^{8,9} Although parasites are ubiquitous in ecological communities and represent the most common consumer strategy among organisms, only recently have they been routinely included in food web studies.¹⁰ In fact, predators often coincidentally ingest parasites when feeding, and in some cases the effect of predation is even greater on the parasite than on prey. In the wild, trypanosomes are very efficiently transmitted by the oral route and are therefore imbibed in a food chain and/or, depending on the local fauna composition, in a network of interactions, a food web, where most consumers feed on multiple species and are, in turn, fed upon by multiple other species – a phenomenon called trophic transmission.^{10,11}

Studies that include a long term follow up of trypanosomatid infections among free-living wild animals are quite scarce. Therefore, the main purpose of this paper was to contribute with the knowledge of variables that are involved in the transmission cycles of *T. cruzi* and *T. evansi* in the Pantanal wetland. Herein we extended our previous studies on *T. cruzi* and *T. evansi* to the carnivores ocelot (*Leopardus pardalis*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and sympatric domestic dogs. We also performed characterization by minixon gene of previously obtained *T. cruzi* isolates derived from one feral pig *Sus scrofa* and twenty four small mammals (rodents and marsupials), maintained in liquid nitrogen in our laboratory. We reappraised our previous data in the light of the present study in order to evaluate the importance of trophic webs (predator–prey

links) as determining the flow of *T. cruzi* and *T. evansi* in a natural ecosystem.

2. Methods

2.1. Study areas and habitats

This study was performed in southern Pantanal (19°34'54"S and 56°14'62"W), where the climate is tropical semi-humid with an average annual temperature of 25 °C (average minimum temperature 19.2 °C, average maximum temperature 32.3 °C). Weather conditions are markedly seasonal; the dry season occurs from May to October and the wet season from November to April, with the major concentration of rainfall between December and February. During the wet season, many areas of open grasslands flood; in the dry season, the land dries out and only scarce pools, creeks, and some lakes remain. In addition, the Pantanal is subject to a predictable annual monomodal flood pulse as well as multiyear variation of flooding intensity, with an alternation of high-flood years and significantly drier ones.⁹

Five different phytophysiognomies may be distinguished in the studied area: (a) gallery forest: dense semi-deciduous forest along the banks of perennial rivers (b) forest patches: higher ground covered by dense semi-deciduous forest, free of seasonal flood; (c) savanna: small, twisted or gnarled trees, thinly spaced by herbaceous layers formed by grasses and shrubs; (d) forest patches/grassland border covered mainly by dense bushes of bromelia mixed with shrubs and vines and (e) grassland: seasonally flooded plains including the edges of different types of water bodies. Habitat differences in extension and shapes form a mosaic of vegetation characteristic of the region.

2.2. Capture methods

Free-living mammals were trapped with the authorization of Brazilian Government Institute for Wildlife and Natural Resources Care (IBAMA), license number 183/2005, immobilized with zolazepan and tiletamina cloridrato (Zoletil 50) and, after handling and recovering from anesthesia, immediately released. Blood was collected in commercial tubes containing EDTA as anticoagulant. All animal procedures were in accordance with bio-security techniques and individual safety equipment was used in all procedures involving animals and biological samples. Domestic dogs were sampled with owner authorization. All animal procedures were carried out in accordance to the rules of project approved by the Experimental Animal Research Committee CEUA-FIOCRUZ (L-015/07 and L-068/08).

2.3. Trypanosome survey

We sampled 42 crab-eating foxes, 10 ocelots and 69 domestic dogs for parasitological tests. In the field, search for *T. evansi* was made using the buffy coat technique (BC).¹² Hemoculture (HC) was performed for *T. cruzi* in two tubes containing Novy, McNeal, and Nicolle medium covered with an overlay of liver infusion tryptose mixed

with 10% fetal calf serum and 140 mg/ml of gentamicin sulfate. Each tube was inoculated with 0.2 ml of blood from each animal sampled. The HC tubes were examined in the laboratory twice monthly up to five months. Animals were considered with high parasitemia when positive in BC test for *T. evansi* and HC for *T. cruzi*. We characterized by miniexon gene 25 *T. cruzi* isolates derived from 24 small mammals and one feral pig, collected in a southern Pantanal region during 2002–2009, archived in our laboratory. Epimastigote forms collected from cultures at the end of the log phase were centrifuged, washed, and incubated with proteinase K and SDS (sodium dodecyl sulfate). The DNA of the lysed cells was extracted with phenol-chloroform and precipitated after the addition of sodium acetate and ethanol. Differential amplification of part of the non-transcribed spacer of the miniexon gene could be achieved using a pool of five oligonucleotides for the PCR as described elsewhere.¹³ The amplification products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis, followed by ethidium bromide staining and UV visualization. Four isolates were used as controls: CIGS 18 (*T. cruzi* isolate derived from *Saguinus bicolor bicolor* from the Amazon Forest typed as TcI), GLT 725 (*T. cruzi* isolate from *Leontopithecus rosalia* from the Atlantic Rainforest typed as TcII/formerly TcIIb), Rb III (*T. cruzi* isolate derived from *Rhodnius brethesi* from the Amazon Forest typed as TcIII/TcIV – formerly Z3) and H14 (*T. rangeli* isolate acquired from Coleção de Tripanosomatídeos/Oswaldo Cruz Institute - FIOCRUZ).

We also investigated the presence of high parasitemias for both *T. cruzi* and *T. evansi* in all mammals sampled in the southern Pantanal region in studies already published by our group during 2000–2007.

Immunofluorescence antibody test (IFAT) for detecting IgG was conducted as already described.⁸ We used trypanosome antigen deriving from axenic medium (*T. cruzi*) or ionic exchange column (*T. evansi*). No crossed seroreactivity was observed when dilutions below 1:40 were used. Negative control serum samples were obtained from animals born at a wildlife breeding center located in the Oswaldo Cruz Institute or in captive animals native to non endemic area for trypanosome species. Positive controls were obtained from animals positive by BC or HC. Standardization of the protocol was undertaken in order to establish suitable working dilutions for each specific fluorescein antibody conjugate as well as their respective cut-off values as published elsewhere.^{8,14–16} The cut-off values for *T. cruzi* and *T. evansi* were 1:40 for crab-eating fox, ocelot and dogs. Mixed serological results for *T. cruzi* and *T. evansi* were defined as positive IFAT for each trypanosomatid, irrespective of differences in antibody titer. The results were analyzed together with *T. cruzi* and *T. evansi* eco-epidemiological data acquired in our laboratory between 2000 and 2007.

3. Results

The ocelot and crab-eating fox seem to be involved to some degree in the *T. evansi* transmission net, but not in that of *T. cruzi* (Table 1). Actually, positive IFAT showed that these carnivores are exposed to infection by both trypanosome species, but the negative HC and the single BC

throughout strongly suggest low transmissibility potential of these carnivores and their role as dead end hosts of both *T. cruzi* and *T. evansi*.

Domestic dogs were implicated in the *T. evansi* transmission cycle, but not in that of *T. cruzi*. Indeed, HCs were negative throughout, contrasting with the presence of *T. evansi*, as demonstrated by positive BC (Table 1).

Small wild mammals were involved in the transmission cycle of the *T. cruzi* genotype TcI but not TcII. All characterized *T. cruzi* isolates derived from these animals were demonstrated to belong to genotype TcI (Table 2).

There is a well established, widespread and long lasting transmission cycle of *T. evansi* and *T. cruzi* in the Pantanal, involving almost all extant mammal species. The results obtained herein, added to previous results from the same locality,^{8,13–16} show that southern Pantanal is highly enzootic for both *T. cruzi* and *T. evansi* (Tables 1 and 2).

The arboreal *Oecomys mamorae* and the terrestrial *Trichomys pachyurus* were the more abundant species among small mammals in the study area (Table 3). In addition, the coati (*Nasua nasua*) and the peccaries (*Pecary tajacu* and *Tayassu pecari*) were the higher in biomass and bats in richness ($n = 11$).

The role played by each host species in the *T. cruzi* and *T. evansi* transmission cycles in the southern Pantanal was singular. Thus, the eclectic carnivore *Nasua nasua* (coati) was the main reservoir species of *T. cruzi* and *T. evansi* in which these trypanosomatids may establish sympatric infections as observed in four coati specimens (Table 4). The coati was the mammal with the highest transmissibility potential for its high biomass and high prevalence of positive parasitological tests (32.7% positive HC and 51.4% positive BC) throughout the study time.

In contrast, the role of bats in the transmission cycle of the trypanosomatids was only marginally important for *T. cruzi* and unimportant for *T. evansi* in the study area (Table 1). Similar to the armadillos, bats have been incriminated in different *T. cruzi* transmission cycles,^{6,17} but this was not the case in the Pantanal region. Moreover, bats may be considered as maintenance hosts of *T. evansi*, as seen by the low parasitemias, recorded only by PCR (Table 1). The vampire bat *Desmodus rotundus* may have special importance, because it may maintain and transmit *T. evansi*.²

Small wild rodent species seem to play equivalent roles in the transmission cycles of both *T. cruzi* and *T. evansi*, since they showed comparable overall serum prevalence (20.3% and 17.3%, respectively) and similar positive HC and BC percentages (respectively 14.9% and 17.1%).¹⁴

In spite of their low relative abundance, marsupials play a role in the *T. cruzi* transmission cycle in the southern Pantanal, since they show high seroprevalence (48.6%) and parasitemias (38.9%). In contrast, the role of marsupials in the transmission of *T. evansi* seems to be unimportant, although they were exposed (13.9% of positive IFAT titers). In fact, positive BC was found only in one *Philander frenatus* (Table 1).¹⁴

Armadillos and suiformes apparently play only a negligible role in the maintenance of both trypanosomatid species *T. cruzi* and *T. evansi* in the southern Pantanal (Table 1). In fact, just one specimen of the suiformes, had a positive HC (TcI) (Table 2). Moreover, as has already

Table 1Number of animals positive for *Trypanosoma cruzi* and *T. evansi* infection, summarized data from seven years follow-up in mammals from the southern Pantanal

Taxon	Species	<i>T. cruzi</i>			<i>T. evansi</i>				
		IFAT	HC	No. sampled	IFAT	BC	PCR	No. sampled	
Carnivores	<i>Nasua nasua</i> ^{8,15}	101	33	158	35	18	22	115	
	<i>Cerdocyon thous</i> ^a	16	-	42	8	1	ND	42	
	<i>Leopardus pardalis</i> ^a	3	-	10	5	1	ND	8	
	Total of wild carnivores		33	210		18		165	
Large rodent ⁸	<i>Canis familiaris</i> ^{a, 8}	5	-	69	27	3	11	69	
	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>				5	7	24		
Small rodents ¹⁴	<i>Oecomys mamorae</i>	27	5	93	14	5	ND	82	
	<i>Thrichomys pachyurus</i>	5	1	71	16	1	ND	72	
	<i>Clyomys laticeps</i>	6	1	30	9	1	ND	45	
	<i>Holochilus brasiliensis</i>	5	-	19	1	-	ND	20	
	<i>Cerradomys scotti</i>	2	-	11	-	-	ND	11	
	<i>Calomys callosus</i>	2	-	8	1	-	ND	7	
	Total of small rodents	47	7	232	41	7		237	
	Marsupials ¹⁴	<i>Gracilinanus agilis</i>	5	4	14	2	-	ND	13
		<i>Monodelphis domestica</i>	9	2	12	1	-	ND	12
		<i>Thylamys spp.</i>	2	-	7	1	-	ND	7
<i>Philander frenatus</i>		2	1	4	1	1	ND	4	
Suiformes ¹⁶	Total of marsupials	18	7	37	5	1		36	
	<i>Pecari tajacu</i>	39	-	68	35	-	11	68	
	<i>Tayassu pecari</i>	2	-	8	3	-	1	8	
	<i>Sus scrofa</i> (feral)	12	1	21	9	-	4	21	
Armadillos ^{8,31}	Total of suiformes	53	1	97	47	-	16	97	
	<i>Euphractus sexcinctus</i>	ND	1	19	ND	-	1	8	
Bats ¹⁷	<i>Artibeus jamaicensis</i>	ND	1	4	ND	-	3	6	
	<i>Phyllostomus hastatus</i>	ND	2	4	ND	-	-	1	
	<i>Glossophaga sorecina</i>	ND	-	2	ND	-	-	3	
	<i>Carolia sp.</i>	ND	-	1	ND	-	1	3	
	<i>Chrotopterus auritus</i>	ND	-	1	ND	-	-	1	
	<i>Tonatia sp.</i>	ND	-	1	ND	-	1	1	
	<i>Platyrrhinus sp.</i>	ND	-	2	ND	-	1	5	
	<i>Sturnira lilium</i>	ND	-	1	ND	-	-	1	
	<i>Diaemus sp.</i>	ND	ND	0	ND	-	-	1	
	<i>Desmodus rotundus</i>	ND	-	3	ND	-	1	5	
	<i>Noctilio sp.</i>	ND	ND	0	ND	-	-	2	
	<i>Mollossus sp.</i>	ND	-	2	ND	ND	ND	0	
	<i>Myotis sp.</i>	ND	-	7	ND	-	2	2	
	Total of bats		3	28			9	31	
Total			52	623		26		574	

The data of hemoculture (HC) and buffy coat (BC) represent the number of parasitologically positive animals. The data of Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) represent the number of seropositive animals. -: negative results; ND: not done.

^a Present study.

Table 2Molecular characterization of 68 isolates of *Trypanosoma cruzi* derived from sylvatic mammals from the southern Pantanal, Brazil (2002–2009)

Species	No. sampled	<i>T. cruzi</i> Genotype						Reference
		TcI	TcII	Z3 ^a	TcI / TcII	TcI / Z3 ^a	TcII / Z3 ^a	
<i>Nasua nasua</i>	158	20	10	2	6	1		Herrera et al., 2008 ¹⁶
<i>Oecomys mamorae</i>	136	10						Present study
<i>Thrichomys pachyurus</i>	274	2						Present study
<i>Clyomys laticeps</i>	76	1						Present study
<i>Cerradomys scotti</i>	11	2						Present study
<i>Gracilinanus agilis</i>	80	5						Present study
<i>Thylamys macrurus</i>	19	2						Present study
<i>Monodelphis domestica</i>	33	1						Present study
<i>Philander frenatus</i>	10	1						Present study
<i>Sus scrofa</i> (feral)	32	1						Present study
<i>Euphractus sexcinctus</i>	19			1				Lisboa et al. 2009 ³¹
<i>Artibeus jamaicensis</i>	4						1	Lisboa et al. 2008 ¹⁷
<i>Phyllostomus hastatus</i>	4		1				1	Lisboa et al. 2008 ¹⁷
Total	856	45	11	3	6	1	2	

Blank cells indicate a negative result.

^a Currently classified as TcIII or TcIV following Zingales et al. 2009.⁵

Table 3
Natural history data of wild mammals studied in the southern Pantanal

Species	Common name	Diet	Strata occurrence	Body weight, kg	Density, ind/km ²	Relative abundance, %
<i>Nasua nasua</i>	Coati	Car-Fr/Gr-In	S	4	12.2	
<i>Cerdocyon thous</i>	Crab-eating fox	Car-Fr/Gr-In	T	5	0.4	
<i>Leopardus pardalis</i>	Ocelot	Car-Fr/Gr-In	T-S	8	0.2	
<i>Pecari tajacu</i>	White lipped peccary	Fr-Br/Gz	T	32	6.2	
<i>Tayassu pecari</i>	Collared peccary	Fr-Br/Gz	T	18	4.3	
<i>Sus scrofa (feral)</i>	Feral pig	Fr-Br/Gz	T	35	5.2	
<i>Euphractus sexcinctus</i>	Six-banded armadillo	Car-Fr/Gr-In	T-F	3.3	1.2	
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	Capybara	Br/Gz	T	30	2.1	
<i>Oecomys mamorae</i>	Arboreal rice rat	Fr/Gr-In	S	0.072		30
<i>Thrichomys pachyurus</i>	Punaré	Fr/Gr-In	T	0.27		24
<i>Clyomys laticeps</i>	Broad-headed spiny rat	Fr/Gr-In	T	0.205		13
<i>Holochilus brasiliensis</i>	Marsh rat	Fr/Gr-In	T	0.168		6
<i>Cerradomys scotti</i>	Lindbergh's Oryzomys	Fr/Gr-In	T-S	0.097		3
<i>Calomys callosus</i>	Large vesper mouse	Fr/Gr-In	T	0.045		3
<i>Gracilinanus agilis</i>	Agile gracile opossum	Fr/Gr-In	T-S	0.035		10
<i>Thylamys macrurus</i>	Paraguayan fat-tailed mouse opossum	Fr/Gr-In	T-S	0.061		6
<i>Monodelphis domestica</i>	Gray short-tailed opossum	Fr/Gr-In	T-S	0.081		3
<i>Philander frenatus</i>	Southeastern four-eyed opossum	Fr/Gr-In	T-S	0.281		2
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Common fruit bat	Fr-In	W			
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Spear nosed bat	Fr-In	W			
<i>Glossophaga soricina</i>	Pallas's long-tongued bat	Fr-In	W			
<i>Carollia sp.</i>	Gray short-tailed bat	Fr-In	W			
<i>Chrotopterus auritus</i>	Woolly false vampire bat	Fr-In	W			
<i>Tonatia sp.</i>	Round-eared bat	Fr-In	W			
<i>Platyrrhinus sp.</i>	Broad-nosed Bat	Fr-In	W			
<i>Sturnira lilium</i>	Little yellow-shouldered bat	Fr-In	W			
<i>Desmodus rotundus</i>	Vampire Bat	Fr-In	W			
<i>Mollossus sp.</i>	Black Mastiff Bat	Fr-In	W			
<i>Myotis sp.</i>	Whiskered bats	Fr-In	W			

Table adapted from Desbiez 2007⁹ with data from Herrera et al. 2007¹⁴ and Lourival and Fonseca 1997.³² Blank cells indicate not done. Fr/Gr: Frugivore/Granivore; Br/Gz: Browser/Grazer; In: Invertebrate; Car: Carnivore; T: Terrestrial; S: Scansorial; F: Fossorial; W: Winged. The Relative Abundance was estimated by dividing the number of individuals of a given species by the total number of mammals captured.

Table 4
Trypanosoma cruzi and *T. evansi* co-infected mammal species from the southern Pantanal, Brazil

Species	Co-infection n (%)		No. sampled
	IFAT	HC/BC	
<i>Nasua nasua</i>	35 (22.1)	4 (11.4)	158
<i>Cerdocyon thous</i>	4 (9.5)	-	42
<i>Canis familiaris</i>	6 (8.7)	-	69
<i>Oecomys mamorae</i>	2 (2.7)	-	74
<i>Thrichomys pachyurus</i>	1 (1.4)	-	71
<i>Clyomys laticeps</i>	1 (2.2)	-	45
<i>Monodelphis domestica</i>	1 (8.3)	-	12
<i>Sus scrofa</i>	8 (38.1)	-	21

The data of hemoculture (HC) / buffy coat (BC) are expressed by a rate of number of parasitological positive and seropositive animals. The data of Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) represent the number of seropositive animals. -: negative results.

been reported, feral pigs efficiently control infections by *T. evansi*, since both experimental and natural infections resulted in low parasitemia.¹⁶

4. Discussion

As eclectic parasites, *T. cruzi* and *T. evansi* infect a broad range of mammal species in diverse ecologic niches, presenting therefore distinct and peculiar epidemiological patterns. In this sense, each particular habitat of a biome displays different infected mammal species involved in distinct transmission cycles, that can be connected or not.

Apart from high *T. cruzi* infection prevalence and a high infectivity potential, the importance of the coati is

guaranteed by its ability in maintaining the three main genotypes of *T. cruzi* (TcI, TcII and TcIII/TcIV – formerly Z3) in single and mixed infections (TcI/TcII and TcI/TcIII/TcIV – formerly Z3).¹⁵ Coati are also an important reservoir of *T. evansi*, as may be observed in expressive prevalence in single as well as in co-infections with *T. cruzi*.

The enzootic cycle of *T. cruzi* in nature has probably been maintained for millions of years, in great part by oral route transmission, through the ingestion of infected triatomines and/or small mammals by armadillos, marsupials, primates and carnivores.^{2,3,18} Additionally, apart of being able to survive in the gastric environment, *T. cruzi* shows an enhanced competence in invading cells.¹⁹ *Trypanosoma evansi* oral transmission has already been reported.²⁰ Altogether, these

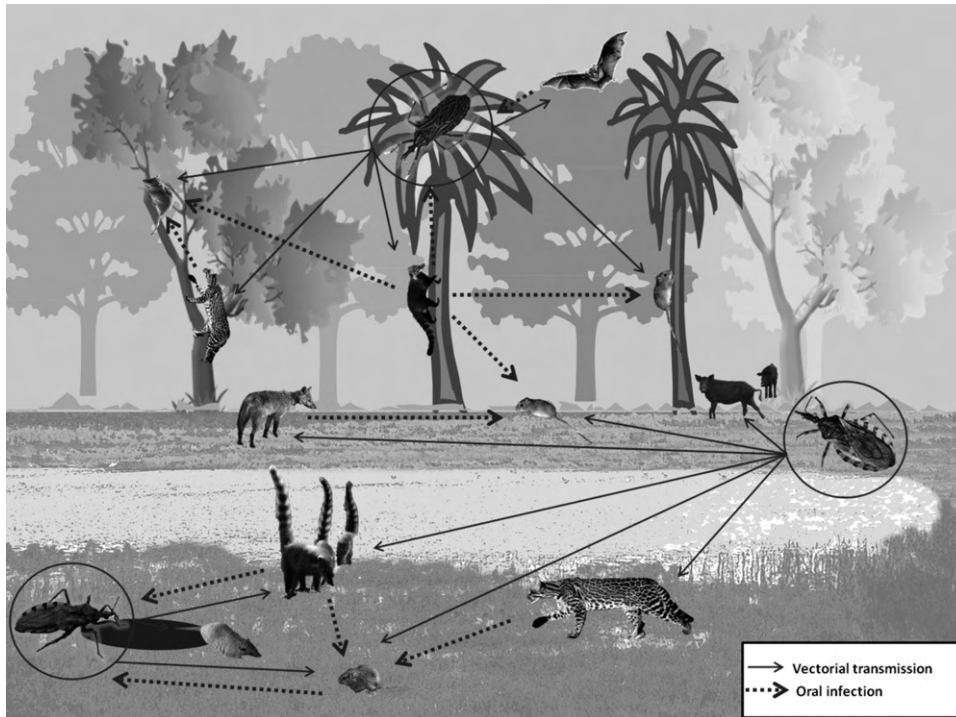


Figure 1. Possible transmission/infection routes of *Trypanosoma cruzi* among mammals from southern Pantanal, Brazil.

results suggest the importance of a trophic transmission as a mechanism of bioaccumulation of these flagellate species in the studied area.

Interestingly, medium sized carnivores such as crab-eating foxes and ocelots, although positioned high in

the food-chain as are the coatis, did not present high parasitemias. This phenomenon may be linked to the peculiarities of the feeding behavior of these taxa. In fact, the ingestion of triatomine bugs by coatis is highly probable since coatis are omnivorous and in this sense

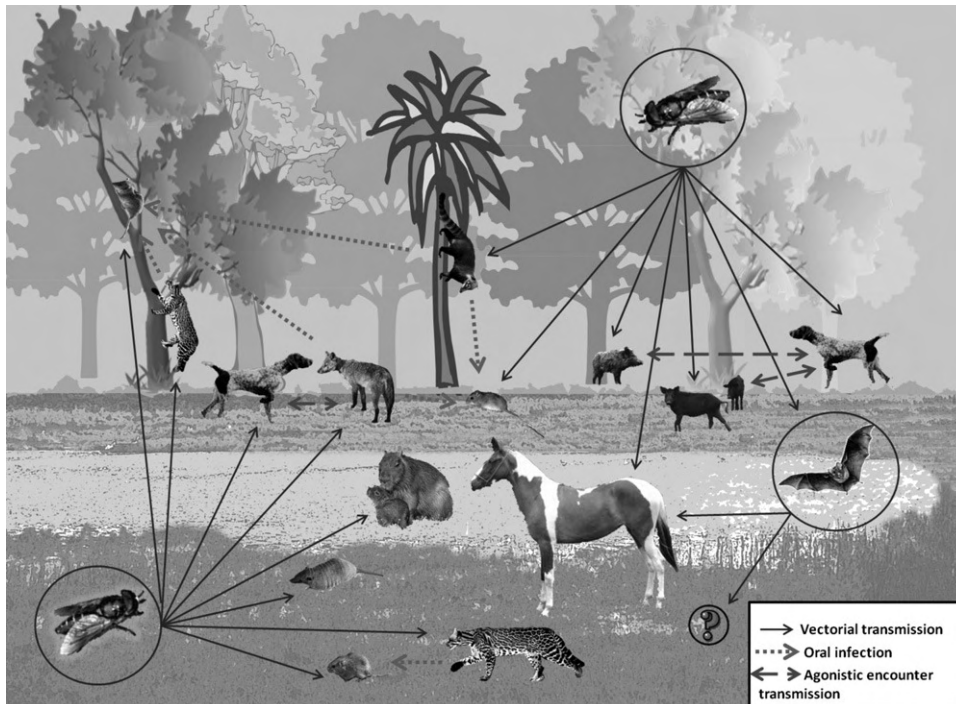


Figure 2. Possible transmission/infection routes of *Trypanosoma evansi* among mammals from southern Pantanal, Brazil.

predominantly insectivorous and frugivorous, and the consumption of vertebrates is occasional.²¹ In addition, the coati uses all habitats of its large home range and are thus more exposed to infection. Ocelot and crab-eating foxes display distinct foraging habits: the crab-eating fox, despite being an opportunist predator, feeds on fruits, small mammals and a minor amount of insects.²² Compared to the other carnivore species of this study ocelots are the more specialist depending predominantly on small mammalian prey.²³

Our data allow us to suppose that ocelot and crab-eating fox populations may be only marginally exposed to *T. evansi* infections in the southern Pantanal region since domestic felids and canines are extremely susceptible to *T. evansi*.^{2,8,24} and we have not found positive BC in these free-living carnivore species. This may also be the case of the rodents that are recognized as extremely susceptible to experimental infection by *T. evansi*,²⁵ displaying parasitemias of 10⁶ to 10⁹. Due to the high parasitemias, broad range of habitats and niches that are occupied by the rodents besides its expressive abundance,¹⁴ they certainly constitute at least part of the ecological complex of reservoir hosts for both *T. cruzi* and *T. evansi* in the southern Pantanal. Among the six species of small rodents sampled, only *Oecomys mamorae* and *Trichomys pachyurus* seem to have some importance for the maintenance of respectively *T. cruzi* and *T. evansi* enzooties in the studied area, due to their high relative abundance and higher seroprevalence and parasitemias for both flagellate species (Tables 1 and 3).

Considering that all strains isolated from small rodent and marsupial species belong to the TcI group, and the carnivore coati were found harboring the three main genotypes, as well as mixed strains, three hypotheses may come to mind: (i) positive selection of TcI genotype by small rodents and marsupials species, (ii) small wild mammals do not support TcII infections and die, (iii) small mammals are not exposed to TcII and TcIII/TcIV – formerly Z3. All these hypotheses show weak but also strong and defensible points since *T. cruzi* subpopulation selection, independent transmission cycles in a same forestall fragment and/or mortality of small rodents in experimental conditions have already been described.^{6,18,19,26}

Concerning domestic dogs, our data are in contrast to several studies that showed that infected dogs constitute a major domestic reservoir of *T. cruzi* and a risk factor for domestic transmission throughout Latin America,^{18,27} an observation that reinforces the epidemiological complexity of the transmission cycle of this trypanosomatid species. Domestic dogs may become infected by *T. evansi* via vectorial transmission as well as by ingestion of infected blood and/or meat of infected mammals. In fact, dogs are frequently seen to fight with coatis and crab-eating foxes, and have been observed feeding on feral pig and capybara carcasses (Herrera HM, personal communication). Domestic dogs are important in the *T. evansi* epidemiology, because they represent a threat of infection for horses due to their close proximity with horsemen during cattle management practices.

Encounters among predators and prey in the studied area are facilitated by the presence of the large quantity of the palm tree *Attalea phalerata* in the forest patches. This

habitat supplies refuge and an immense quantity of fruit to coatis, small rodents, feral pigs and armadillos even during the dry season.⁹ Moreover, bugs and flies rest at night on 'acurizal' palm tree branches.^{28,29}

The coati and the arboreal rice rat are key species for the maintenance of the life cycles of *T. cruzi* and *T. evansi* in the southern Pantanal area because they displayed the greatest *T. cruzi* and *T. evansi* serum prevalence and highest parasitemias (as seen by positive HC and BC); they have large population densities; they are found from the ground to canopy trees; they include invertebrates in their diet; and share the same frond-sheet ecological niche of *Attalea phalerata* for search for food and shelter.^{14,15,21}

The data presented herein strongly suggest that the capybara, a very important reservoir host for *T. evansi*⁸ is an unimportant host in the *T. cruzi* transmission cycle. Its exclusive herbivorous diet besides its very dense fur are the probable barriers for *T. cruzi* infection.

Undoubtedly, all mammal species examined compose an ecological network of reservoir hosts for *T. cruzi* and *T. evansi* in the southern Pantanal. However, the importance of each mammal species in the dispersion and/or maintenance of both pathogenic trypanosomatids in the studied area may be extremely inconstant, due to:

- (i) The complexity of the Pantanal ecologic process and its inter-relationships, expressed by the climatic instability of a floodplain, with consequent multi-annual wet and dry periods and strong impact on distribution, community structure and population size of many plant and animal species. This natural weather variation determines ecological patterns and processes, conferring a temporal (pluri-annual) enzootic asymmetry in many infectious-parasitic diseases in the Pantanal environment.
- (ii) The human encroachment expressed by the transformation of natural vegetation into pasture that negatively affects habitat and species diversity, decreasing the natural ecological buffer system and inducing changes in host-parasitic relationships.

Our data strongly support that, even though vectorial transmission has an obvious role in the epidemiology of Chagas disease and animal trypanosomiasis, the maintenance of *T. cruzi* and *T. evansi* in the Pantanal is also warranted by a complex network via oral route – predation (Figures 1 and 2). This pathway allows these flagellated parasites to spread from prey to predators by a mechanism known as trophic transmission. Carnivores may become infected by *T. cruzi* and *T. evansi* via ingestion of small mammals, a group of animals that are a well known host for these trypanosome species in the studied area.^{8,14} Furthermore, the ingestion of bugs and flies by small mammal species, armadillos and coatis^{21,29,30} also has to be considered as a part of the trophic connections of trypanosome transmission cycles in the Pantanal region.

Authors' contributions: HMH and AMJ designed the study protocol; CVL carried out the culture, isolation and molecular characterization of *T. cruzi* isolates; RFL, VR and CVL carried out the serological tests; GMM, VR and RFL carried

out the collection and treatment of samples and revised the article for intellectual content; AMJ and HMH analyzed and interpreted the data; AMJ and HMH drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. AMJ and HMH are guarantors of the paper.

Acknowledgements: We would like to express our sincere gratitude to Dr. Vera Bongertz for her critical reading and revision of the manuscript. We wish to thank Ana Cláudia Machado Duarte and Mônica Caroline de Oliveira Campos for their technical support. We thank Dr. Erich Fisher/UFMS for capture of bat specimens in the Pantanal, MS.

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq n^o 05/2004); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ/E-26/101.754/2008); Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde/Fiocruz (PAPES III – 0250250108); ChagasEpiNet (Health-2007-2.3.4.-1); Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) - 41/100.224/2005 and 9777.256.476.13022008.

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: The present work has the endorsement of the Ethical Commission for Experimentation with Animal Models (CEUA) from Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, RJ, Brazil (registration number: L-015/07 and L-068/08). All animal captures were in accordance with the licenses obtained from the Brazilian Government Institute for Wildlife and Natural Resources Care (IBAMA): 229/2000, 228/2000, 007/2005, 183/2005, 003/2006, 100/2006 and 015/2007.

References

- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 1973;**27**:347–82.
- Hoare CA. *The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Oxford: Blackwell Scientific; 1972.
- Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;**39**(Suppl 3):113–7.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000;**30**:35–44.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. Second Satellite Meeting: a new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;**104**:1051–4.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 2005;**35**:225–33.
- Dávila AM, Herrera HM, Schiebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomiasis in the Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 2003;**117**:1–13.
- Herrera HM, Dávila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 2004;**125**:263–75.
- Desbiez ALJ. *Wildlife conservation in the Pantanal: habitat alteration, invasive species and bushmeat hunting* [PhD Thesis]. Durrell Institute of Conservation and Ecology (DICE), University of Kent, Canterbury; 2007.
- Chen HW, Liu WC, Davis AJ, Jordán F, Hwang MJ, Shao KT. Network position of hosts in food webs and their parasite diversity. *Oikos* 2008;**117**:1847–55.
- Johnson PT, Dobson AP, Lafferty KD, Marcogliese DJ, Memmott J, Orlofske SA, et al. When parasites become prey: ecological and epidemiological significance of eating parasites. *Trends Ecol Evol* 2010;**25**:362–71.
- Woo PTK. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 1970;**27**:384–6.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;**95**:97–9.
- Herrera HM, Rademaker V, Abreu UG, D'Andrea PS, Jansen AM. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop* 2007;**102**:55–62.
- Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;**156**:314–8.
- Herrera HM, Abreu UG, Keuroghlian A, Freitas TP, Jansen AM. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *Parasitol Res* 2008;**103**:619–24.
- Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol* 2008;**156**:314–8.
- Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg* 2008;**79**:742–9.
- Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int* 2008;**57**:105–9.
- Raina AK, Kumar R, Rajora VS, Sridhar, Singh RP. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. *Vet Parasitol* 1985;**18**:67–9.
- Alves-Costa CP, da Fonseca GAB, Christóforo C. Variation in the diet of the brown-nosed coati (*Nasua nasua*) in southeastern Brazil. *J Mammal* 2004;**85**:478–82.
- Pedó E, Tomazzoni AC, Hartz SM, Christoff AU. Diet of crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnivora, Canidae), in a suburban area of southern Brazil. *Rev Bras Zool* 2006;**23**:637–41.
- Abreu KC, Moro-Rios RF, Silva-Pereira JE, Miranda JMD, Jablonski EF, Passos FC. Feeding habits of ocelot (*Leopardus pardalis*) in Southern Brazil. *Mammal Biol* 2008;**73**:407–11.
- da Silva AS, Spanevello R, Stefanello N, Wolkmer P, Costa MM, Zanette RA, et al. Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. *Res Vet Sci* 2009;**88**:281–4.
- Menezes VT, Queiroz AO, Gomes MA, Marques MA, Jansen AM. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitol Res* 2004;**3**:193–200.
- Pinho AP, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000;**5**:509–14.
- Gürtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 2007;**134**:69–82.
- Bassi RMAB, da Cunha MCIC, Coscarón S. A study of behavior of tabanids (Diptera, Tabanidae) from Brazil. *Acta Biol Par* 2000;**29**:101–15.
- Teixeira AR, Monteiro PS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauriapires L, et al. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis* 2001;**7**:100–12.
- Bocchiglieri A, Mendonça AF, Campos JB. Diet composition of *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia, Didelphidae) in dry woodland areas of Cerrado in central Brazil. *Mammalian* 2010;**74**:225–7.
- Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol* 2009;**165**:19–24.
- Lourival RFF, Fonseca GAB. Análise de Sustentabilidade do Modelo de Caça Tradicional, no Pantanal da Nhecolândia, Corumbá, MS. In: Valladares-Padua C, Bodmer RE, Cullen Jr L, editors. *Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil*. MCT-CNPq and Sociedade Civil Mamirauá; 1997. p. 123–72.

CAPÍTULO 2

***Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil**

Fabiana Lopes Rocha, André Luiz Rodrigues Roque, Ricardo Corassa Arrais, Jean Pierre Santos, Valdirene dos Santos Lima, Samanta Cristina das Chagas Xavier, Pedro Cordeiro-Estrela, Paulo Sérgio D'Andrea e Ana Maria Jansen

Artigo publicado na Parasitology (2013), 140: 160-170. Doi: 10.1017/S0031182012001539



Coleta de amostras em mamíferos para investigação da infecção por *T. cruzi* no Parque Nacional da Serra da Canastra, MG. Começando da foto superior esquerda (no sentido do relógio): carnívoros silvestres, pequenos mamíferos, cães domésticos e paisagem típica da Serra da Canastra.

(Fotos: Fabiana Rocha e Moema Camoleze)

Trypanosoma cruzi TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil

FABIANA LOPES ROCHA^{1,2,3}, ANDRÉ LUIZ RODRIGUES ROQUE¹, RICARDO CORASSA ARRAIS⁴, JEAN PIERRE SANTOS⁵, VALDIRENE DOS SANTOS LIMA¹, SAMANTA CRISTINA DAS CHAGAS XAVIER¹, PEDRO CORDEIR-ESTRELA², PAULO SÉRGIO D'ANDREA² and ANA MARIA JANSEN^{1*}

¹ Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. Pav. Rocha Lima 516. Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21045-900, Brazil

² Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21045-900, Brazil

³ Triade – Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação – Rua Silveira Lobo, 32, Caixa Postal 48, Bairro Casa Forte. Recife-PE. CEP: 52061-030, Brazil

⁴ Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal. Universidade de São Paulo, USP. Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87. Cidade Universitária. São Paulo – SP. CEP: 05508-270, Brazil

⁵ Instituto Pró-carnívoros. Av. Horácio Neto, 1030 – Parque Edmundo Zanon. Atibaia-SP – CEP: 12945-010, Brazil

(Received 6 June 2012; revised 11 July and 31 July 2012; accepted 19 August 2012; first published online 12 October 2012)

SUMMARY

Aiming to better understand the ecological aspects of *Trypanosoma cruzi* transmission cycles, wild carnivores, small mammals and dogs were examined for *T. cruzi* infection in the Serra da Canastra National Park region, Brazil. Isolates were genotyped using mini-exon gene and PCR-RFLP (1f8 and H3) genomic targets. *Trypanosoma cruzi* transmission was well established in the area and occurred in both wild and peridomestic environments. Dog seroprevalence was 29.4% (63/214) and TcI and TcII genotypes, besides mixed infections were observed. Only TcI was detected in wild mammals. Marsupials displayed lower relative abundance, but a high prevalence of positive haemocultures (4/22), whereas rodents displayed positive haemocultures (9/113) mainly in the abundant *Akodon montensis* and *Cerradomys subflavus* species. The felid *Leopardus pardalis* was the only carnivore to display positive haemoculture and was captured in the same region where the small mammal prevalence of *T. cruzi* infection was high. Two canid species, *Chrysocyon brachyurus* and *Cerdocyon thous*, were serologically positive for *T. cruzi* infection (4/8 and 8/39, respectively), probably related to their capacity to exploit different ecological niches. Herein, dog infection not only signals *T. cruzi* transmission but also the genotypes present. Distinct transmission strategies of the *T. cruzi* genotypes are discussed.

Key words: transmission cycles, trophic network, reservoir, Discrete Typing Units, Chagas disease, Serra da Canastra National Park, Brazil.

INTRODUCTION

The aetiological agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, is a multi-host parasite found in more than 100 mammalian species and capable of infecting almost all cell types (Noireau *et al.* 2009). Human infections have been generally associated with contact with the contaminated feces of infected triatomine bugs, besides blood transfusion, organ transplantations, congenital transmission and oral transmission. Indeed, this latter has been responsible for the most recent outbreaks in Brazil and is probably the most ancient route of infection among wild animals (Noireau *et al.* 2009,

Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). The continually new human cases demonstrate that numerous aspects of Chagas disease epidemiology still remain unclear, probably because the transmission cycles of the parasite are maintained in intricate transmission networks that embrace several mammalian and vector species, resulting in unique epidemiological scenarios.

Trypanosoma cruzi is a highly diverse complex of genetic lineages. The current nomenclatural consensus recognizes 6 major genotypes or 'Discrete Typing Units' (DTUs) within the taxon, *T. cruzi* I (TcI) to *T. cruzi* VI (TcVI) (Zingales *et al.* 2009). To date, all of them occur in Brazil, although with different geographical distribution patterns and ecological characteristics. TcI is described to be an ubiquitous lineage in view of the diversity of its hosts, vectors and habitats. The TcII lineage is reported to have a more restricted geographical distribution and to

* Corresponding author: Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. Pav. Rocha Lima 516. Rio de Janeiro-RJ. CEP: 21045-900, Brazil. Fax: +55 21 2560 6572. E-mail: jansen@ioc.fiocruz.br

occur in focal transmission cycles. However, it has been described in several mammalian taxa and biomes (Lisboa *et al.* 2006, 2008; Herrera *et al.* 2008), suggesting that it may be much more widespread than is currently acknowledged. TcIII is found mainly in the Amazonia biome, although sparsely reported throughout the country. TcIV has been recorded in northern and northeastern Brazil, whereas TcVI has been found in the middlewestern and southern regions (Zingales *et al.* 2012). TcV is described to occur in Argentina, Bolivia, Paraguay and in northeastern Brazil (Araujo *et al.* 2011). This broad distribution in distinct mammalian host species suggests that we are far from understanding the dispersion strategies of each lineage and its consequence for the epidemiology of *T. cruzi* infection.

The importance of each mammalian species in the maintenance and dispersion of a multi-host parasite like *T. cruzi* will rely mainly on the ability of the parasite to persist in the mammalian host and be transmitted to the vector, besides the host's relative abundance. In this sense, we consider as reservoir a species or community responsible for the long term survival of a parasite in a given area (Ashford, 1996), in which the role of each host species should be interpreted at intervals of time and space as well as accounting for the community composition and environmental characteristics. Thus, the importance of domestic dogs as reservoirs of *T. cruzi* varies throughout Latin America. In northwestern Argentina, dogs displaying high parasitaemias and infectiousness to vectors for long periods have been recorded (Gurtler *et al.* 2007), whereas in most countries, including Brazil, dogs display high seroprevalence but rarely present high parasitaemia levels (Roque *et al.* 2008; Pineda *et al.* 2011; Xavier *et al.* 2012). With regard to small mammals, a considerable number of marsupial and rodent species have been found naturally infected (World Health Organization, 2002). From these, species of the opossum genus *Didelphis* have been generally pointed out as the main reservoir, mostly due to the fact that studies focused mainly on this synanthropic genus, thus discounting other mammal species that may compose the *T. cruzi* reservoir system within a given area.

Little is known about the role of carnivores in the *T. cruzi* transmission network, probably because the examination of free-ranging carnivores requires long-term and technically challenging studies. Data are available for 2 Procyonidae species, the raccoon (*Procyon lotor*) and the ring-tailed coati (*Nasua nasua*) (Herrera *et al.* 2008; Kribs-Zaleta, 2010), but for wild canid and felid species, the only available information is that they are exposed to the *T. cruzi* transmission cycles in different environments, as expressed by positive serological tests (Brown *et al.* 2010; Herrera *et al.* 2011). In essence, carnivores have

great potential to be important reservoirs due to the high diversity in their ecological niches that might range from insectivorous to carnivorous diet in different forest strata and habitats (Nowak, 2005), favouring contact with different components of the *T. cruzi* transmission net. Besides, top predators can be bioaccumulators of parasites (Cleaveland *et al.* 2006), and this may be also the case for *T. cruzi*, since the oral transmission is a highly efficient route for this parasite. Along with their huge biomass and broad home range, these characteristics give them a great potential to amplify and spread the parasite populations.

The Serra da Canastra National Park (SCNP) is a natural landscape conservation unit in Minas Gerais state, one of the oldest known endemic areas for Chagas disease in Brazil. Herein, the aim of this study was to evaluate *T. cruzi* transmission in both peridomestic and sylvatic environments in the SCNP region. The role played by the different components of the *T. cruzi* reservoir net: wild carnivores, small mammals and sympatric domestic dogs and the maintenance of distinct *T. cruzi* lineages in the area are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was conducted within the Serra da Canastra National Park–SCNP (UTM 23K 345499/7764402) and adjacent areas, in Minas Gerais state, southeastern Brazil (Fig. 1). It is an important remnant of the Cerrado biome and shelters huge populations of some vulnerable mammalian species, such as the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). Many streams and rivers, including the São Francisco river, originate in the highlands of the SCNP. The vegetation is basically made up of highland grasslands, with some spots of stone fields, scrub savanna and riparian vegetation occurring sparsely alongside the river courses. The altitude varies from 700 to 800 meters above sea level in valleys and above 1000 meters on the plateau. The climate is tropical, the dry season occurs from March to October and the wet season from November to February. Annual rain precipitation ranges from 1200 to 1800 mm and average temperature is around 22–23 °C (IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, 2005).

The park was created in 1972 with a total area of 2000 ha of which only 715 ha are managed by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), whereas the remaining areas are still privately owned. The park is surrounded by small rural properties (<100 ha) whose economy is based on cattle ranching for artisanal cheese production and coffee plantations. Total rural population is 5500 inhabitants (Bizerril *et al.* 2011).

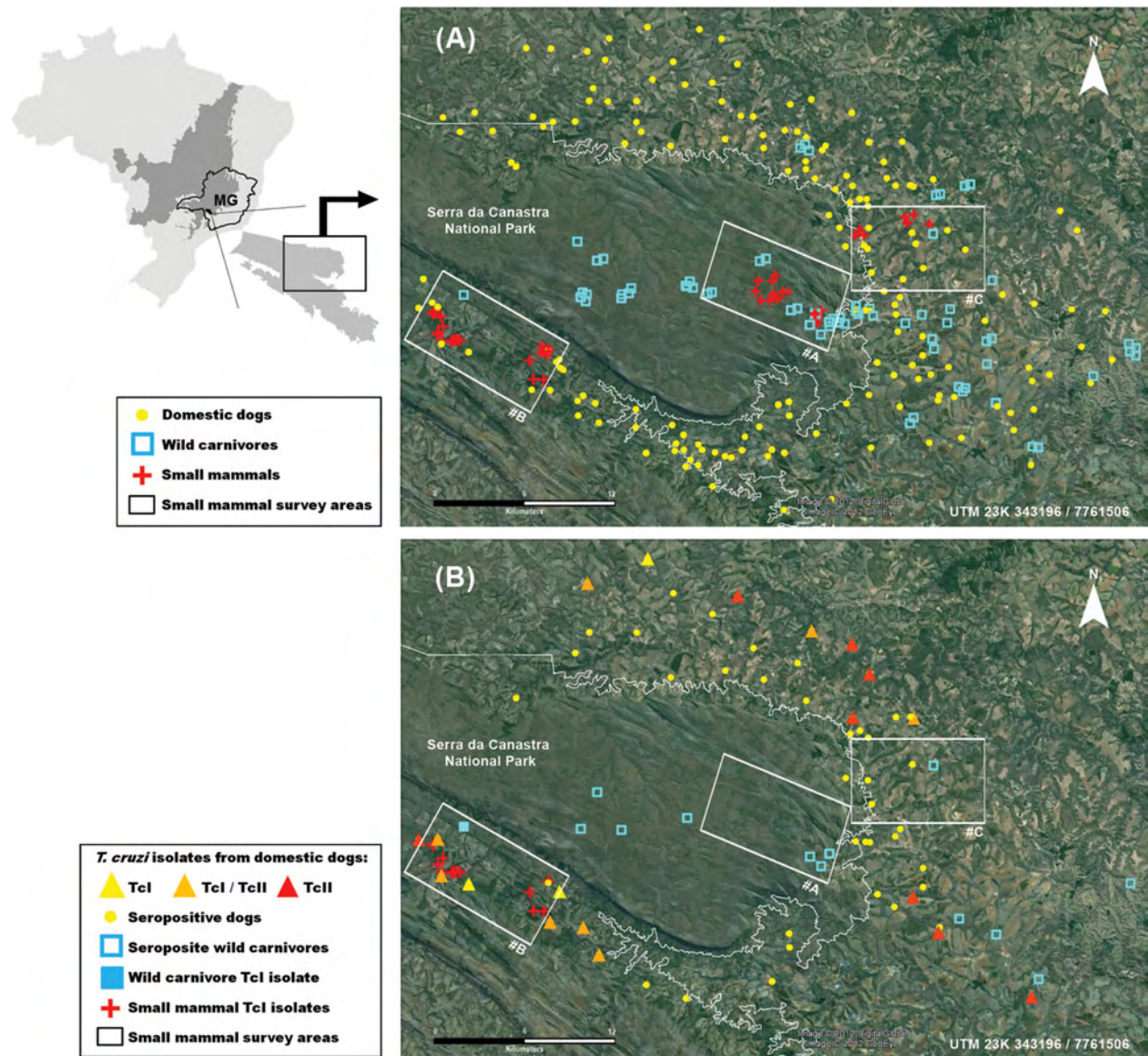


Fig. 1. Map of the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from Serra da Canastra National Park (SCNP) and its surroundings. (A) All mammals sampled; (B) *T. cruzi* infected mammals. Triangles represent domestic dog isolates (genotypes according to the figure legend); blue squares represent infected wild carnivores and red crosses represent infected small mammals. The white squares indicate small mammal survey areas: #A – within SCNP, #B – Vão dos Cãndidos region and #C – Cerradão/São Roque region. In the upper left figure the study site in Brazil, the grey shade corresponds to the limits of the Cerrado biome and the black contour shows Minas Gerais state (MG) limits.

Dog surveys

A house-to-house census of dogs was undertaken in farms located 5 to 20 km from the park border during annual rabies vaccination campaigns from 2007 to 2010. The annual average domestic dog population for the 4 years follow-up was 557 ± 59 individuals. After owner consent, blood samples were collected by puncture of the cephalic vein through a Vacutainer® system. Age class was based on the owner information and confirmed with dental condition status. We considered as juveniles dogs younger than 6 months and adults as the dogs older than that.

Our sample included 214 dogs, composed by 177 adults and 39 juveniles, ranging from 3 months

to 14 years. The sex ratio was 3:1 (161 males/53 females). In the calculation of the prevalence of *T. cruzi* infection, resampled infected dogs were counted once.

The majority of adult dogs (71%) were used in cattle raising and slept outside the house. Owners also reported that their dogs hunt and that they go out by themselves for several consecutive days. The juvenile dogs were reported to be restricted only to peridomestic areas.

Capture of wild mammals

Wild carnivores. These were captured from March 2007 to August 2011 using box traps made with

galvanized wire mesh baited with sardine and boiled chicken. Traps were disposed both inside the park and on adjacent farmlands. We immobilized the animals with an intramuscular injection of a combination of zolazepan and tiletamine (Zoletil[®]) at dosages of 3 mg/kg for maned wolves, 8.3 mg/kg for ocelots (*Leopardus pardalis*) and 10 mg/kg for hoary foxes (*Lycalopex vetulus*) and crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). We also used a subcutaneous injection of 0.04 mg/kg of atropine sulphate, whenever necessary. Anaesthetized animals were weighed, measured and had their teeth condition assessed in order to estimate age and were marked with ear-tags or radiocollars for individual identification. We took blood samples by puncture of the cephalic vein stored in Vacutainer[®] tubes for haemoculture and serological tests. Animals were released at the site of capture after recovery from anaesthesia. Total capture effort was 3819 traps/night.

Small wild mammals. These were captured using live traps (Sherman[®]–H. B. Sherman Traps, Tallahassee, FL, USA and Tomahawk[®] Tomahawk Live Traps, Tomahawk, WI, USA) baited with a mixture of banana, peanut butter, oat, bacon/sardines. Traps were set for 5 consecutive nights along linear transects, placed on the ground at 10 m intervals and alternating between trap type, in 3 field expeditions (May 2010, February 2011 and August 2011). Traps were placed into distinct habitat types inside SCNP (gallery forest, stone fields, savanna, and grasslands) as well as in 2 vicinal regions under anthropogenic influence, ‘São Roque/Cerradão’ and ‘Vão dos Cãndidos’. The last region is within the official limits of the SCNP, but not managed as a conservation unit, since there are still several privately owned farmlands. Total capture effort was 3126 traps-nights, equally distributed among the 3 expeditions. We calculated the relative abundance of small mammals as the number of individuals of each species divided by the total number of individuals multiplied by 100. Identification of specimens was based on external and cranial morphological characters and on karyological analyses as described by Bonvicino *et al.* (2005). Voucher specimens were deposited in the Mammal Collection of the National Museum–UFRJ (Rio de Janeiro, Brazil). Blood samples were collected by cardiac puncture after anaesthesia with an intramuscular injection of ketamine (10–30 mg/kg) associated with acepromazine (5–10 mg/kg) for rodents (proportion 9:1) or xylazine (2 mg/kg) for marsupials (1:1).

All animal handling procedures followed the Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research (Sikes and Gannon, 2011). The project had permission from the Brazilian government environmental agency (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) (SISBIO license

number 18635–3) and was endorsed by the ethics committee of the Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ (CEUA P-292–06), in accordance to Brazilian regulations. Appropriate biosecurity techniques and individual protection equipment were used during all procedures involving animals and biological sample collecting and handling.

Trypanosoma cruzi infection

The *T. cruzi* infection survey was performed by parasitological and/or serological methods. If insufficient blood was collected, priority was given to haemoculture. Parasitological tests were based on examination of fresh blood smears (microscopic analysis) and haemoculture (HC), the latter performed as follows: 0.3 ml of blood from each animal was cultured in 2 tubes containing Novy-McNeal-Nicole (NNN) medium with liver infusion tryptose (LIT) overlay. Tubes were examined every 15 days up to 5 months. When positive, parasites were amplified, cryopreserved and deposited in the Collection of Trypanosomatids from wild mammals, domestic animals and vectors–COLTRYP (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil).

For the detection of anti-*T. cruzi* IgG antibodies in sera we used the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) as previously described by Camargo (1966) and the Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA, Biomanguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil). We also searched for IgM antibodies through the IFAT to identify recent *T. cruzi* infection among HC-positive dogs and other dogs from the same farms. The antigen used in serological assays for all species was obtained from a *T. cruzi* isolate derived from dogs of this study area harvested from axenic culture. For small mammals, rodent sera were tested with a commercial anti-rat IgG conjugate (FITC, Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA), whereas marsupial sera were tested with an intermediary anti-opossum serum raised in rabbits followed by a commercial anti-rabbit conjugate. Wild canids and felids were tested using domestic dog and cat conjugates, respectively. The cut-off value titre adopted for IFAT was 1:40 for dogs and marsupials and 1:10 for rodents (Herrera *et al.* 2005). The cut-off value for ELISA was optical absorbance ≥ 0.200 mean ± 3 S.D. For wild carnivores, the test was performed with a non-specific conjugate and since there are no available data on IFAT cut-off values for some carnivore species of this study, we performed a PCR in all ELISA-positive serum samples besides a subsample of ELISA negative samples ($n=5$). Therefore, the cut-off value adopted was 1:20, as it was the lowest serum dilution in which parasites could be detected by PCR. Each reaction included 2 positive and 2 negative control sera.

In order to detect mixed-infection and/or cross-reaction with *Leishmania* spp. we performed an

IFAT test using *L. infantum* and *L. braziliensis* parasites harvested from axenic culture as antigens (cut-off: 1:40). For wild and domestic canids, we also used the Rapid Test for Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (TR DPP[®], BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil).

Samples were considered positive when parasites were isolated by HC or when the sera showed reactivity in at least 2 of the serological tests. Samples that had IFAT-IgG concomitant positive values for *T. cruzi* and *Leishmania* sp. with non-corresponding ELISA, DPP or that displayed borderline results were attributed to cross-reaction and were considered indeterminate.

Trypanosoma cruzi molecular characterization

Genomic DNA was extracted from cultures and wild carnivore serum samples using standard phenol-chloroform protocols (Vallejo *et al.* 1999). Characterization was carried out in 3 steps: (1) multiplex PCR amplification of the mini-exon gene following conditions described by Fernandes *et al.* (2001) for the identification of 3 DTU *T. cruzi* groups: Tc1 (TcI – 200 basepairs), Tc2 (TcII/TcV/TcVI – 250 basepairs) and Zymodeme 3 (TcIII/TcIV – 150 basepairs), besides *T. rangeli* (100 basepairs) or mixed infections; (2) PCR amplification of nuclear 1f8 gene followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of fragments digested by Alw21I enzyme (Rozas *et al.* 2007) to discriminate TcII from hybrids (TcV and TcVI) DTU's in isolates previously typed as Tc2 or mixed Tc1/Tc2 in mini-exon assays and (3) PCR-RFLP of histone H3/AluI (Westenberger *et al.* 2005) to rule out hybrids (TcV and TcVI) in mixed Tc1/Tc2 infections, as it could possibly overlap digested fragments in 1f8/Alw21I assay. Both PCR-RFLP 1f8/Alw21I and histone H3/AluI were performed with minor modifications in the conditions described by Rozas *et al.* (2007). Each reaction included a negative control and positive control samples from those *T. cruzi* strains representing the DTUs to be typed. PCR products were visualized in 2% agarose gel after ethidium bromide staining and visualized under ultraviolet light.

Spatial and statistical analyses

In order to verify the spatial distribution of trypanosomatid infection, locations of each individual captured were accessed through a hand-held GPS receiver using the WGS 84 Datum geodetic coordinate system. Locations were analysed in a Geographic Information System platform using GPS trackmakerPRO[®] software (Geostudio Tecnologia, Brazil) juxtaposed on a base map modified from Google earth[®] software (v. 6.2, Google Inc., USA)

To examine the distribution pattern of *T. cruzi*-infected dogs, the mean geographical distance was compared among infected dog locations ($n=76$) to the mean distance distribution across 10 000 randomly assigned samples of the same size using R 2.13 software. Spatial autocorrelation of seropositive dogs was tested with Moran's I. Maps with discriminated locality of infected hosts and parasite genotypes were also prepared. Statistical tests were conducted with $\alpha=0.05$.

The degree of concordance between IFAT-IgG and ELISA assays was assessed by the kappa statistic using SYSTAT 11 for Windows. To test for the influence of sex and age class on *T. cruzi* infection rates in dogs the 3-dimensional Chi-square contingency table was used. We also compared the *T. cruzi* infection among domestic dogs, carnivores, rodents and marsupials and applied a Chi square test to verify whether infection rate is independent of taxonomic group.

RESULTS

Trypanosoma cruzi infection in dogs

Dogs are included in a well-established *T. cruzi* transmission cycle in all the geographical regions surrounding the Serra da Canastra National Park, as demonstrated by the high parasitological and serological *T. cruzi* infection prevalence (Table 1, Fig 1).

Trypanosoma cruzi was isolated from the blood of 19 dogs (7.9%, $n=214$), collected on the same expedition (September/2010). Genotyping revealed the presence only of 2 main *T. cruzi* lineages: TcI ($n=3$) and TcII ($n=8$), besides mixed TcI/TcII infections ($n=8$) (Figs 1 and 2). After 5 months, we re-examined 10 out of the 19 dogs that previously displayed positive HC and none of them tested positive. Among the remaining HC-positive dogs, 6 died and 3 disappeared.

Prevalence was calculated considering the total number of examined dogs during the study. A total of 63 dogs (29.4%) were seropositive for *T. cruzi* (Table 1), including 8 (12.7%) individuals that were co-infected with *Leishmania* sp. Once infected, *T. cruzi*-positive testing dogs maintained serological titres, as observed during re-sampling. Seventeen dog samples were considered indeterminate by the serological assays. We found no significant difference in the *T. cruzi* infection rate between the dogs' sex or age class (Chi square = 2.69; D.F. = 7; $P=0.9$). The agreement between IFAT-IgG and ELISA was 78% with a kappa value of 0.522 (moderate agreement). ELISA presented higher sensitivity to detect the dog's acute phase since it was positive in 15 out of 19 HC-positive dogs, whereas IFAT detected infection in only 4 of them.

Six juvenile dogs (3–6 months old) displayed positive HC, demonstrating that *T. cruzi*

Table 1. *Trypanosoma cruzi* infection assessment through serology (IgG – IFAT/ELISA) and haemoculture (HC) in mammals from the Serra da Canastra National Park and surrounding areas, Brazil

Species (common name)	N	Capture location ¹	Small mammals relative abundance (%) ²	Serology (Positive/N)	HC (Positive/N)	Genotype
<i>Akodon montensis</i>	27	a,b	20.0	0/17	1/27	TcI
<i>Akodon</i> spp. ³	13	a,b	9.6	0/5	1/13	TcI
<i>Calomys</i> spp. ⁴	14	b	10.4	0/3	3/14	TcI
<i>Cerradomys subflavus</i>	15	a,b	11.1	0/13	4/15	TcI
<i>Necomys lasiurus</i>	28	a,b	20.7	0/21	0/28	–
<i>Nectomys squamipes</i>	3	a,b	2.2	0/3	0/3	–
<i>Oligoryzomys</i> spp. ⁵	4	a,b	3.0	0/2	0/4	–
<i>Oxymycterus delator</i>	9	a,b	6.7	1/8	0/9	–
Total rodents	113		83.7	1/72 (1.4%)	9/113 (7.9%)	–
<i>Caluromys philander</i>	1	b	0.7	0/0	1/1	TcI
<i>Didelphis albiventris</i>	4	a,b	3.0	0/4	0/4	–
<i>Gracilinanus agilis</i>	4	a	3.0	0/2	0/4	–
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	1	a	0.7	0/1	0/1	–
<i>Marmosops incanus</i>	5	b	3.7	4/4	3/5	TcI
<i>Monodelphis</i> spp. ⁶	7	a,b	5.2	2/5	0/7	–
Total marsupials	22		16.3	6/16 (37.5%)	4/22 (18.1%)	–
<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Maned wolf)	39	a,b	–	8/39	0/30	–
<i>Cerdocyon thous</i> (Crab-eating fox)	8	a,b	–	4/8	0/3	–
<i>Lycalopex vetulus</i> (Hoary fox)	10	a,b	–	0/10	0/6	–
<i>Leopardus pardalis</i> (Ocelot)	1	b	–	1/1	1/1	TcI
<i>Conepatus semistriatus</i> (Skunk)	2	a,b	–	0/0	0/2	–
Total wild carnivores	60		–	13/58 (22.4%)	1/42 (2.4%)	–
<i>Canis lupus familiaris</i> (Dog)	214		–	63/214 (29.4%)	19/214 (7.9%)	TcI (3) TcII (8) TcI-TcII (8)

¹ Capture location site: a, SCNP; b, Farmlands; (–), not applicable.

² Number of individuals of each species divided by the total number of individuals * 100.

³ *Akodon* sp. ($n=6$; a, b), *A. lindberghi* ($n=5$; a), *A. cursor* ($n=1$; a).

⁴ *Calomys* sp. ($n=3$; b) *C. tener* ($n=11$; b).

⁵ *Oligoryzomys* sp. ($n=2$, b), *O. nigripes* ($n=1$; a), *O. rupestris* ($n=1$; a).

⁶ *Monodelphis americana* ($n=3$; b), *M. domestica* ($n=3$; b) and *M. sorex* ($n=1$; a).

transmission also occurs within the peridomestic environment. An active transmission in that region was confirmed by, among other factors, the serological conversion observed in 4 dogs 1 year after the first examination and the 4 HC-positive dogs that displayed concomitant positive IFAT-IgM, indicative of recent infection. Further, 28.3% ($n=46$) of the dogs amid farms with HC-positive dogs had IFAT-IgM antibodies (corroborated by ELISA), suggestive of recent infection in this scenario. The *T. cruzi* infection in dogs was spatially autocorrelated (Moran's I: observed=0.674; expected=–0.004; s.d.=0.076; P -value=0) and not homogeneously distributed ($P < 0.004$), suggesting that transmission occurred throughout the SCNP surrounding areas, though with hotspot transmission foci (Fig. 1, and see Supplementary Material, online version only).

Trypanosoma cruzi infection in wild mammals

A total of 60 wild carnivores belonging to 5 species were examined for *T. cruzi* infection. The only felid species examined, the ocelot, tested positive both in fresh blood preparations and at the first HC reading (7 days after blood culture) along with an elevated serology titre (1:160); altogether indicative of high parasitaemia levels. The ocelot's *T. cruzi* isolate was genotyped as TcI (Table 1).

The wild canids were exposed to infection as demonstrated by serology but none were parasitologically positive by HC suggesting they may not be infective to vectors. The crab-eating fox had the highest serum prevalence rate (50%–4/8) followed by the maned wolf (20.5%–8/39) (Table 1). Titres ranged from 1:20 to 1:80 (IFAT). All hoary fox samples were seronegative. Three (5.8%) maned wolf

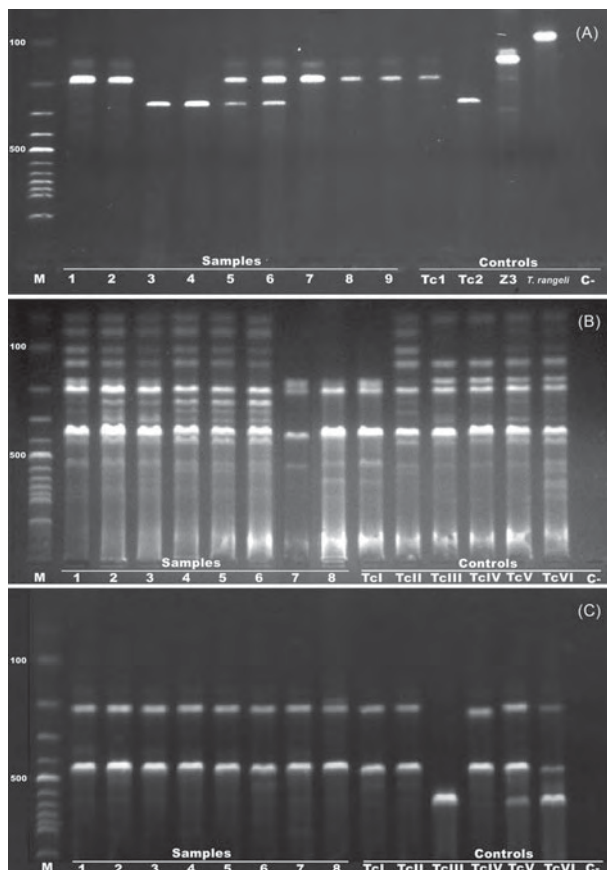


Fig. 2. *Trypanosoma cruzi* genotyping of domestic and wild mammal isolates from the Serra da Canastra National Park and surroundings, Brazil. (A) PCR products of the Mini-exon gene analysed by agarose electrophoresis gel stained with ethidium bromide. Lanes: M, Molecular weight markers (100 bp DNA ladder); 1–6, dog isolates; 7, wild carnivore isolate (*Leopardus pardalis*); 8, rodent isolate (*Akodon montensis*); 9, marsupial isolate (*Marmosops incanus*); Control samples: TcI (TcI – 200 bp), Tc2 (TcII/TcV/TcVI – 250 bp), Z3 (TcIII/TcIV – 150 bp), *T. rangeli* (100 bp). (B) PCR-RFLP products of 1f8 gene/Alw21I. Lanes: 1–3, dog isolates characterized as mixed Tc1/Tc2 in Mini-exon gene assay; 4–6, dog isolates characterized as Tc2; 7–8, dog isolates characterized as Tc1. Control samples: PCR-RFLP 1f8/Alw21I digestion patterns of TcI to TcVI. (C) PCR-RFLP products of histone H3/AluI. Lanes: 1–8, dog isolates characterized as mixed Tc1/Tc2 infection in Mini-exon gene assay. Control samples: PCR-RFLP H3/AluI digestion patterns of TcI to TcVI.

samples were considered indeterminate. The agreement between IFAT-IgG and ELISA was 82% with a kappa value of 0.628 (substantial agreement). The 2 specimens of the skunk (*Conepatus semistriatus*) examined only by HC tested negative.

Concerning the small mammals, relative abundances and fauna richness were comparable inside SCNP and farmlands (Table 1). The marsupials displayed high parasitaemia levels, mainly *Marmosops incanus* since 3 out of 4 seropositive individuals were positive on both fresh blood

examination and HC. Positive HC was also achieved from the only captured *Caluromys philander*. Infection by IFAT was detected in the marsupial species *Marmosops incanus*, *Monodelphis americana* and *Monodelphis domestica* (prevalence of 37.5%), titres ranged from 1:40 to 1:320. Rodents from *Akodon*, *Calomys* and *Cerradomys* species also presented parasitaemias detected by HC in 9 individuals (Table 1). Of these positive rodents, we could collect sufficient blood to perform the IFAT assay from only 3 that tested negative. One *Oxymycterus delator* was the only seropositive sample (prevalence of 1.4%). The small mammal isolates were all characterized as TcI (Table 1, Fig. 1).

All *T. cruzi*-infected small mammals were collected in the 'Vão dos Cândidos' region as well as the infected ocelot (Fig. 1). The infected crab-eating foxes and 4 maned wolves were captured in farmland regions. Four serologically positive maned wolves displayed home range areas exclusively inside the SCNP, as confirmed by our parallel observations using radio telemetry techniques (May-Junior *et al.* 2009).

Comparing the 2 farmland areas, in the 'Vão dos Cândidos' region both small mammals and dogs presented high prevalence of positive HC (13/65–20% and 6/25–24%, respectively) whereas in the 'Cerradão/São Roque' region, neither small mammals ($n=7$) nor dogs ($n=21$) displayed positive HC. Overall, the proportion of *T. cruzi* infection varied significantly in different taxonomic groups. Domestic dogs tended to have more positive diagnoses than predicted by chance, whereas rodents had fewer positive diagnoses (Chi square = 21.56; D.F. = 3; $P<0.001$).

DISCUSSION

In the present study we describe a well-established and broadly distributed *T. cruzi* cycle in all geographical regions surrounding SCNP, which includes wild and domestic animals. The presence of dogs with high parasitaemia, as demonstrated by positive haemoculture (HC), contrasts with previous studies in Brazil, in which none or a minority of individuals displayed positive HC (Herrera *et al.* 2005; Roque *et al.* 2008; Xavier *et al.* 2012). The herein positive HC dogs reflect probably the initial phase of infection, typically characterized by a short period of detectable parasitaemia (Machado *et al.* 2001). A similar pattern in naturally infected dogs was observed in Monte Alegre, in the state of Pará, in Northern Brazil (Xavier *et al.* 2012). Besides, serological conversion observed during the follow up attested that they are continually being exposed to *T. cruzi* infections.

Dogs may become infected by the contaminative route (Gurtler *et al.* 2007) or by ingesting infected triatomines, a highly efficient transmission route

(Pineda *et al.* 2011). Another possible infection route might be by hunting of infected small mammals (Herrera *et al.* 2011). Actually, with regards to the 2 areas where we simultaneously sampled for small mammals and dogs, dog infection was coincident with small mammal infection. In the SCNP, *T. cruzi* transmission might occur not only in the wild, but also in the peridomestic environment, as demonstrated by the infected juvenile dogs. Herein, besides acting as sentinel hosts, as already described in other Brazilian areas (Xavier *et al.* 2012), dogs were also able to signal the presence of the 2 main *T. cruzi* genotypes in the area, TcI and TcII.

In the SCNP, the huge distance among the infected dogs along with the fact that the foci of peridomestic vectors are residual and submitted to regular spraying rule out the existence of a *T. cruzi* transmission cycle supported solely by dogs. Thus, the finding of TcII genotype infecting only dogs, contrasting with TcI which was also found infecting wild mammals is an apparent paradox. At a first glance the explanation could rely on TcII circulation exclusively in mammalian groups not sampled in this study, such as armadillos and bats (Yeo *et al.* 2005; Lisboa *et al.* 2008). However, this seems an oversimplified explanation; a similar picture was observed in a Chagas Disease outbreak in Santa Catarina state, where TcII was found in humans and triatomines but not in the mammalian fauna (Roque *et al.* 2008; Steindel *et al.* 2008). Moreover, reports of TcII in different wild mammal species and biomes demonstrate that this genotype is also maintained in wild cycles (Lisboa *et al.* 2006; Herrera *et al.* 2008). This raises the question on where the TcII is hidden in nature. This could reflect the transmission strategy of this genotype. In analogy with the r-k ecological selection theory, the parasitaemia curve of TcII within its mammal hosts resemble an r strategist – one precocious and short period of high parasitaemia (Andrade and Magalhaes, 1996) and ultimately would impact on the dispersion strategy of this genotype in the wild. This kind of strategy does not impede TcII transmission in the wild, but hampers parasite detection, as a consequence, it may be underestimated in nature. Further, we cannot rule out the oddities in host-parasite interactions. For instance, the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*) maintains long-lasting TcII infection with high prevalence of positive HC throughout (Lisboa *et al.* 2006), whereas the opossum *Didelphis aurita* can control and even eliminate TcII in experimental conditions (Jansen *et al.* 1991). Here, we report for the first time TcII isolation and molecular characterization in dogs from Brazil, a well-studied *T. cruzi* host. This reinforces the view that the spectrum of mammal host infected by this genotype is currently underestimated.

Undoubtedly, from our results, none is more puzzling than the high number of dogs in early stages

of infection in broadly distributed and unlinked areas simultaneously. This raises the idea that still unknown variables must be involved in the dispersion of *T. cruzi* among several host species and that these variables are included in a broader phenomenon. For instance, only recently El Niño Southern Oscillation (ENSO) and similar phenomena have been taken into account to influence living organisms (Hanf *et al.* 2011). Whatever the cause, the frequent occurrence of unsolved questions in biological systems may be related to our limitation in analysing them detached from a linear, Cartesian focus. Parasitic transmission nets are clearly complex systems since they are essentially dynamic, multivariate, non-linear and unpredictable, rendering a reductionist and deterministic focus interpretation of this phenomenon worthless. Indeed focusing these phenomena in the light of the chaos theory could perhaps fill the several gaps in the current knowledge of this issue (Mazzocchi, 2008). Taking into account the presence of several dogs geographically separated and recently infected by *T. cruzi* may be a stochastic phenomenon, or the signal that the maximum transmission fitness was achieved in that moment; indeed, a feature described to be the characteristic of the edge of the chaos.

The role of each wild mammal species in the *T. cruzi* transmission networks will depend on the ability of the parasite to be transmitted to its vector, as well as the abundance and distribution of its mammal host species. In SCNP, rodents and marsupials were shown to be equally important for the maintenance of *T. cruzi*. The marsupials, regardless of their low relative abundance, displayed high prevalence of positive HC, in particular the arboreal *Marmosops incanus* and *Caluromys philander*. Rodents also displayed positive HC, mainly in highly abundant species, i.e. the terrestrial *Akodon montensis* and *Cerradomys subflavus*, pointing to the epidemiological importance of these mammals in the local transmission net. Moreover, *T. cruzi* infection was spread among terrestrial and arboreal mammals, demonstrating that parasite transmission was occurring in both strata. We observed high *T. cruzi* infection rates in the area despite the low relative abundance of the common *Didelphis* genus, generally described as one of the most important and competent mammalian reservoir of the parasite (Yeo *et al.* 2005). This emphasizes the characteristic dynamics of *T. cruzi* transmission cycles that should be examined as an unique ecological system.

Herein, we observed that 3 wild carnivore species, the ocelot, the crab-eating fox and the maned wolf were infected by *T. cruzi* in the SCNP region, but they probably play distinct roles as a result of their pattern of *T. cruzi* infection and peculiar ecological characteristics. The ocelot was the only carnivore that displayed patent parasitaemia (positive fresh blood examination and HC). To the best of our knowledge this is the first report of an ocelot naturally infected

with *T. cruzi*. In comparison to the other 2 carnivore species of this study, the ocelot is the one which better exemplifies the bioaccumulator role in a prey-predator chain since it has a more carnivorous diet, consuming mainly small mammalian prey, besides birds (Rocha-mendes *et al.* 2010). In fact, this infected ocelot was the only carnivore captured in the 'Vão dos Cãndidos' region, where small mammals displayed high parasitaemia levels. Probably, *T. cruzi* infection in top predators with a more restricted carnivorous diet, such as the ocelot, is highly dependent on the prevalence of infection of the local mammal fauna that can be preyed, since infection by the contaminative route is less probable if we consider that this animal is nocturnal, very active and generally does not use dens (except during birthing). In the Pantanal, where small mammals had low infection rates, none of the 10 ocelots tested were positive in HC (Herrera *et al.* 2011).

The crab-eating fox seems to be highly exposed to *T. cruzi* infections, as demonstrated in this study and also in the Pantanal region of Brazil (Herrera *et al.* 2011). This might be related to its capacity to exploit different ecological niches. The crab-eating fox is known to be one of the most plastic carnivore species: it has an omnivorous diet—including insects and small mammals, opportunistic behaviour and is a habitat generalist (Juarez and Marinho, 2002). Also, it has great flexibility in the use of disturbed habitats (Michalski *et al.* 2006). These traits increase the probability of contact with a variety of components of the *T. cruzi* cycle pointing the crab-eating fox as a good sentinel for *T. cruzi* transmission areas.

The maned wolves were highly exposed and can also be considered a good sentinel for transmission. Accounting for its omnivorous diet and home range areas of 80 km² on average (Jacomio *et al.* 2009), this species can play a unique role that is to signal the transmission in large areas, in particular in wild environments which are generally difficult to access. This was the case of maned wolves from our study that signalled the *T. cruzi* transmission both inside SCNP and its surroundings. The distinct prevalence rates between them indicate that the transmission was occurring mostly outside of the conservation unit, given that only 16% (4/25) of the maned wolves that were captured and recaptured within the park area over the 5-year follow-up tested positive, whereas 28% (4/14) of the wolves from outside SCNP tested positive. Taken together with the finding that no other mammal captured inside the park was positive for *T. cruzi* infection, we can conclude that the *T. cruzi* cycle inside SCNP is less expressive than in its surroundings.

This study reports the current *T. cruzi* enzootic transmission in one of the oldest endemic areas for Chagas disease in Brazil. We surmise that the *T. cruzi* transmission is well established all around the SCNP region, and that this transmission includes

2 genotypes of the parasite: TcI and TcII. Therein, dogs, small mammals and carnivore species were shown to participate in the *T. cruzi* transmission net and parasite transmission was occurring in both arboreal and terrestrial strata, as well as in the peridomicile. An understanding of the peculiar characteristics of this net, as well as each host-parasite relationship, is the key to identify the risk of disease outbreaks. This is the first study to corroborate evidence that dogs can be used not only to report *T. cruzi* transmission areas but also the genotypes present in the area, which reinforces their role as sentinels for surveillance programmes. The observed *T. cruzi* eco-epidemiological profile should increase awareness of the necessity for continuous surveillance in order to prevent re-emergence of Chagas disease in this area.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to Dr Vera Bongertz for revising the English version, Carlos A. Zucco for his help with statistical analysis and the three anonymous referees for their helpful suggestions. We are grateful to Moema Camoleze, Gregor Daflon, Caio Motta, Camylla Pereira, Vitor Araújo, João Batista, Fabiano Fernandes, Dayana Motta and Nikolaos Dimitriadis for their assistance during fieldwork. We are also grateful to Marcos Lima, Carlos Ruiz, Kerla Monteiro, Juliana Barros and Cinthia Gomes for excellent laboratory work. The authors thank Darlan Padua, Luciano and all workers from SCNP/ICMBio office as well as Aparecida Elorde from the Municipal Department of Health of São Roque de Minas for logistic support and information. Special thanks to all the partners of the Maned Wolf Conservation Project that made this work possible, especially to Marcelo Bizerril, Flávio Rodrigues, Rogério de Paula, Ronaldo Morato, Nucharin Songsasen, Eduardo Eizirik, Carla Cruz, Kátia Leal, Wanila Santos and Pró-canívoros Institute.

FINANCIAL SUPPORT

Wildlife Conservation Society—OWOH 2008-001. European Union Seventh Framework Program Grant—ChagasEpiNet 223034. National Research Center for the Conservation of Natural Predators—CENAP/ICMBio. Research Foundation of the Minas Gerais State—FAPEMIG 07/2009 PDJ-CNPq500091/2010-2. A doctoral grant was provided by CAPES to F.L.R.

REFERENCES

- Andrade, S. G. and Magalhaes, J. B. (1996). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **30**, 27–35.
- Araujo, C. A., Waniek, P. J., Xavier, S. C. and Jansen, A. M. (2011). Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Experimental Parasitology* **127**, 308–312. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.013.
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* **14**, 523–532. doi: 0738-081X(96)00041-7
- Bizerril, M. X. A., Soares, C. C. and Santos, J. P. (2011). Linking community communication to conservation of the maned wolf in central Brazil. *Environmental Education Research* **17**, 815–827.
- Bonvicino, C. R., Lemos, B. and Weksler, M. (2005). Small mammals of Chapada dos Veadeiros National Park (Cerrado of Central Brazil): ecologic,

- karyologic, and taxonomic considerations. *Brazilian Journal of Biology* **65**, 395–406. doi: S1519-69842005000300004.
- Brown, E. L., Roellig, D. M., Gompper, M. E., Monello, R. J., Wenning, K. M., Gabriel, M. W. and Yabsley, M. J.** (2010). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among eleven potential reservoir species from six states across the southern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **10**, 757–763. Doi: 10.1089/vbz.2009.0009
- Camargo, M. E.** (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* **8**, 227–235.
- Cleaveland, S., Meslin, F. X. and Breiman, R.** (2006). Dogs can play useful role as sentinel hosts for disease. *Nature, London* **440**, 605. Doi: 10.1038/440605b
- Fernandes, O., Santos, S. S., Cupolillo, E., Mendonça, B., Derre, R., Junqueira, A. C., Santos, L. C., Sturm, N. R., Naiff, R. D., Barret, T. V., Campbell, D. A. and Coura, J. R.** (2001). A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**, 97–99.
- Gurtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M. V., Kitron, U. and Cohen, J. E.** (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* **134**, 69–82. Doi: http://dx.doi.org/10.1017/S0031182006001259.
- Hanf, M., Adenis, A., Nacher, M. and Carne, B.** (2011). The role of El Niño Southern Oscillation (ENSO) on variations of monthly *Plasmodium falciparum* malaria cases at the Cayenne General Hospital, 1996–2009, French Guiana. *Malaria Journal* **10**, 100. doi: 10.1186/1475-2875-10-100.
- Herrera, H. M., Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Olifiers, N., Bianchi, R. C., Rocha, F. L., Mourao, G. M. and Jansen, A. M.** (2008). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 1133–1139. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.04.041.
- Herrera, H. M., Rocha, F. L., Lisboa, C. V., Rademaker, V., Mourao, G. M. and Jansen, A. M.** (2011). Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **105**, 380–387. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.04.008.
- Herrera, L., D'Andrea, P. S., Xavier, S. C., Mangia, R. H., Fernandes, O. and Jansen, A. M.** (2005). *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **99**, 379–388. doi: 10.1016/j.trstmh.2004.07.006.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis** (2005). *Plano de manejo do Parque Nacional da Serra da Canastra*. IBAMA, Brasília.
- Jacomo, A. T. D., Kashivakura, C. K., Ferro, C., Furtado, M. M., Astete, S. P., Torres, N. M., Sollmann, R. and Silveira, L.** (2009). Home range and spatial organization of maned wolves in the Brazilian grasslands. *Journal of Mammalogy* **90**, 150–157. Doi: http://dx.doi.org/10.1644/07-MAMM-A-380.1.
- Jansen, A. M., Leon, L., Machado, G. M., da Silva, M. H., Souza-Leao, S. M. and Deane, M. P.** (1991). *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: parasitological and serological follow-up of the acute infection. *Experimental Parasitology* **73**, 249–259. doi: 0014-4894(91)90096-F.
- Juarez, K. M. and Marinho, J.** (2002). Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. *Journal of Mammalogy* **83**, 925–933. doi: http://www.jstor.org/stable/1383498.
- Kribs-Zaleta, C.** (2010). Estimating contact process saturation in sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e656. doi: 10.1371/journal.pntd.0000656.
- Lisboa, C. V., Mangia, R. H., Luz, S. L., Kluczkowski, A., Jr., Ferreira, L. F., Ribeiro, C. T., Fernandes, O. and Jansen, A. M.** (2006). Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology* **133**, 603–611. doi: 10.1017/S0031182006000722.
- Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Herrera, H. M., Gerhardt, M., Cupolillo, E. and Jansen, A. M.** (2008). *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary Parasitology* **156**, 314–318. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.06.004.
- Machado, E. M., Fernandes, A. J., Murta, S. M., Vitor, R. W., Camilo, D. J., Jr., Pinheiro, S. W., Lopes, E. R., Adad, S. J., Romanha, A. J. and Pinto Dias, J. C.** (2001). A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 958–965.
- May-Junior, J. A., Songsasen, N., Azevedo, F. C., Santos, J. P., Paula, R. C., Rodrigues, F. H., Rodden, M. D., Wildt, D. E. and Morato, R. G.** (2009). Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases* **45**, 81–90.
- Mazzocchi, F.** (2008). Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Reports* **9**, 10–14. doi: 10.1038/sj.embor.7401147.
- Michalski, F., Crawshaw, P. G., de Oliveira, T. G. and Fabian, M. E.** (2006). Notes on home range and habitat use of three small carnivore species in a disturbed vegetation mosaic of southeastern Brazil. *Mammalia* **70**, 52–57. Doi: 10.1515/MAMM.2006.004.
- Noireau, F., Diosque, P. and Jansen, A. M.** (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research* **40**, 26. doi: 10.1051/vetres/2009009.
- Nowak, R. M.** (2005). *Walker's Carnivores of the World*. The John Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Pineda, V., Saldana, A., Monfante, I., Santamaria, A., Gottdenker, N. L., Yabsley, M. J., Rapoport, G. and Calzada, J. E.** (2011). Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Veterinary Parasitology* **178**, 360–363. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.043.
- Rocha-mendes, F., Mikich, S. B., Quadros, J. and Pedro, W. A.** (2010). Feeding ecology of carnivores (Mammalia, Carnivora) in Atlantic Forest remnants, Southern Brazil. *Biota neotropical* **10**, 1–10.
- Roque, A. L., Xavier, S. C., da Rocha, M. G., Duarte, A. C., D'Andrea, P. S. and Jansen, A. M.** (2008). *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene* **79**, 742–749.
- Rozas, M., De, D. S., Adai, V., Coronado, X., Barnabe, C., Tibyarenc, M., Solari, A. and Dujardin, J. C.** (2007). Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *The Journal of Infectious Diseases* **195**, 1381–1388. doi: 10.1086/513440.
- Shikanai-Yasuda, M. A. and Carvalho, N. B.** (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases* **54**, 845–852. doi: 10.1093/cid/cir956.
- Sikes, R. S. and Gannon, W. L.** (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* **92**, 235–253. Doi: 10.1644/10-MAMM-F-355.1.
- Steindel, M., Kramer, P. L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T. C., Stoco, P. H., Murta, S. M., de Carvalho-Pinto, C. J. and Grisard, E. C.** (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **60**, 25–32. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E. and Macedo, A. M.** (1999). Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica* **72**, 203–212. doi: S0001-706X(98)00085-0.
- Westenberger, S. J., Barnabe, C., Campbell, D. A. and Sturm, N. R.** (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* **171**, 527–543. doi: 10.1534/genetics.104.038745.
- World Health Organization** (2002). *Control of Chagas disease*. WHO Technical Report Series No 905. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xavier, S. C., Roque, A. L., Lima, V. S., Monteiro, K. J., Otaviano, J. C., Ferreira da Silva, L. F. and Jansen, A. M.** (2012). Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**, e1647. doi: 10.1371/journal.pntd.0001647.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., Lopez, E., Gonzalez, N., Patterson, J. S., Gaunt, M. W., de Arias, A. R. and Miles, M. A.** (2005). Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology* **35**, 225–233. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.10.024.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M. and Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 1051–1054. doi: S0074-02762009000700021.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G. and Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 240–253. doi: 10.1016/j.mee-gid.2011.12.009.

CAPÍTULO 3

***Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain**

Fabiana Lopes Rocha, André Luiz Rodrigues Roque, Juliane Saab de Lima, Carolina Cheida Carvalho, Frederico Gemesio Lemos, Fernanda Cavalcanti de Azevedo, Ricardo Corassa Arrais, Daniele Bilac, Heitor Miraglia Herrera, Guilherme Mourão & Ana Maria Jansen.

Manuscrito formatado nas normas do jornal PLoS One



Algumas das espécies de carnívoros silvestres encontradas naturalmente infectadas por *Trypanosoma cruzi* neste estudo. Começando do canto superior esquerdo (sentido do relógio): lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), quati (*Nasua nasua*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*).

Fotos: Fabiana Rocha.

***Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain.**

Fabiana Lopes Rocha^{1,2,3}, André Luiz Rodrigues Roque¹, Juliane Saab de Lima⁴, Carolina Carvalho Cheida⁵, Frederico Gemesio Lemos^{3,6}, Fernanda Cavalcanti de Azevedo³, Ricardo Corassa Arrais^{3,7}, Daniele Bilac¹, Heitor Miraglia Herrera⁸, Guilherme Mourão⁹ & Ana Maria Jansen^{1*}

¹ Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

² Instituto Brasileiro para Medicina da Conservação, TRIÁDE, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, PCMC, Araguari, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁵ Programa de Pesquisa em Vida Selvagem/Projeto Carnívoros, Instituto de Pesquisas Cananéia (IPEC), Cananéia, São Paulo, Brazil.

⁶ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, UFG, Catalão, Goiás, Brazil.

⁷ Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil..

⁸ Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁹ Laboratório de Vida Selvagem, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil.

* Corresponding author: jansen@ioc.fiocruz.br. Fax: +55-21-2560-6572.

Abstract

Little is known on the role played by Neotropical wild carnivores in the *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. We investigated *T. cruzi* infection in wild carnivores from three sites in Brazil through parasitological and serological tests. The seven carnivore species examined were infected by *T. cruzi*, but high parasitemias detectable by hemoculture were found only in two Procyonidae species. Genotyping by Mini-exon gene, PCR-RFLP (1f8/Akw21I) and kDNA genomic targets revealed that the raccoon (*Procyon cancrivorus*) harbored TcI and the coatis (*Nasua nasua*) harbored TcI, TcII, TcIII-IV and *Trypanosoma rangeli*, in single and mixed infections, besides four *T. cruzi* isolates that displayed odd band patterns in the Mini-exon assay. These findings corroborate the coati can be a bioaccumulator of *T. cruzi* Discrete Typing Units (DTU) and may act as a transmission hub, a connection point joining sylvatic transmission cycles within terrestrial and arboreal mammals and vectors. Also, the odd band patterns observed in coatis' isolates reinforce that *T. cruzi* diversity might be much higher than currently acknowledged. Additionally, we assembled our data with *T. cruzi* infection on Neotropical carnivores' literature records to provide a comprehensive analysis of the infection patterns among distinct carnivore species, especially considering their ecological traits and phylogeny. Altogether, fifteen Neotropical carnivore species were found naturally infected by *T. cruzi*. Species diet was associated with *T. cruzi* infection rates, supporting the hypothesis that predator-prey links are important mechanisms for *T. cruzi* maintenance and dispersion in the wild. Distinct *T. cruzi* infection patterns across carnivore species and study sites were notable. Musteloidea species consistently exhibit high parasitemias in different studies which indicate their high infectivity potential. Mesocarnivores that feed on both invertebrates and mammals, including the coati, a host that can be bioaccumulator of *T. cruzi* DTU's, seem to take place at the top of the *T. cruzi* transmission chain.

Keywords

Transmission cycles, trophic network, reservoir, Discrete Typing Units, Chagas Disease, Carnivora.

Introduction

The hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* is a multihost parasite that infects mammalian species from eight orders and dozens of triatomine species, the insect vectors [1,2]. This parasite is the etiological agent of Chagas disease, one of the most important parasitic infections in Latin America [1,3]. From the distinct *T. cruzi* infection routes, nowadays the oral route has increasing importance due to the high number of oral infection outbreaks in the last decades in Brazil and other Latin American countries [4,5]. This current epidemiological scenario challenges health authorities because previously employed control measures are not effective against this scenario. Moreover, it emphasizes the importance of looking at the sylvatic cycle to understand all components of this complex system and the environmental factors that underlie the emergence of human cases. Indeed, despite having been recognized by Carlos Chagas as an enzootic parasite already when he described this taxon more than one century ago [6], there are still many open questions regarding the *T. cruzi* ecology and transmission in sylvatic environments.

Trypanosoma cruzi exhibits huge biological, biochemical and genetic diversity. Presently, six major genotypes or Discrete Typing Units (DTU) are acknowledged within the taxon, *T. cruzi* I (TcI) to *T. cruzi* VI (TcVI), besides the newly coined TcBat genotype, as yet described as restricted to bats [7–9]. Recent studies also reported intraspecific variability within these genotypes, such as TcI isolates [10]. These DTU's are recognized to be valid units to discriminate *T. cruzi* genotypes, albeit putative associations with vectors and hosts, and the extent of their range are still poorly known. TcI is the most widespread DTU with respect to its geographical distribution [8]. TcII, classically associated to human cases in domestic cycles [8], is also more and more observed infecting sylvatic mammals in several biomes throughout South America [11,12]. The knowledge concerning TcIII-TcVI is more recent and as new evidence accumulates, we can observe more clearly that the already proposed associations of genotypes with particular hosts, vectors or ecotopes are still under debate and possibly reflect subsampling [11–13].

Trypanosoma cruzi is maintained in complex transmission nets that occur in overlapping or independent transmission cycles in distinct sylvatic ecotopes [13–15]. Although *T. cruzi* is potentially able to infect all mammalian species [16], according to the particularities of host, parasite genotype and their interactions, some species might maintain longer and/or higher parasitemias than others, which will probably reflect different potentials of these hosts to infect vectors and, thus, to serve as reservoirs in a particular intervals of time and space [17]. In this sense, the potential to infect vectors is directly related to the presence of trypomastigotes in the

bloodstream of a given mammalian species, thus available to be taken up by the vector during its blood meal. The mammal infection by oral route occurs when the animal ingests infected bug's feces, food contaminated with the parasite or by preying on infected bugs or mammals [18]. This latter (predator-prey route) can occur through the ingestion of bloodstream trypomastigotes and also by the amastigotes present in the prey tissues as they are capable of infecting host cells [19–21]. Another important feature to be accounted is the ecology of each mammalian host species, which might enhance (or not) contact among mammals and vectors that ultimately shape *T. cruzi* transmission dynamics.

Species from the mammalian order Carnivora display a remarkable ecological diversity, having occupied virtually every habitat, vegetational zone and ecological niche. Regardless of their special adaptations for predation, they are widely diverse in their feeding ecology (frugivorous, insectivorous and hypercarnivorous – up to 70% of meat) and likewise in traits such as body size, home range, sociality and activity [22]. Carnivorans were reported to be naturally infected by *T. cruzi* [23] and, considering the efficiency of the *T. cruzi* oral infection route [24], may occupy a unique position as bioaccumulators of parasites and, perhaps, distinct *T. cruzi* DTU's. Nevertheless, little is known of their role in *T. cruzi* transmission cycles, probably because carnivores are difficult to study as they require specialized management and costly long-term studies. The investigation of *T. cruzi* infection in wild carnivores is essential because this mammalian order exhibits a combination of biological traits that expose themselves to several opportunities of infection by *T. cruzi* in nature: eclectic feeding behavior, long-lived, broad range areas, disperse long distance and the ability to explore both arboreal and terrestrial strata in different habitats. Free-ranging carnivorans, recognized to play a crucial role in regulating ecosystems [25], might also have an important effect in multi-host parasitic transmission webs, like that of *T. cruzi*, as they prey on species from several taxa.

The aim of this study was to determine the role of Neotropical wild carnivores in the *T. cruzi* transmission cycle. Here, we investigated *T. cruzi* infection in the carnivore community of three different sites in Brazil and evaluated the infection patterns in the light of the species ecological traits. We additionally appraised the *T. cruzi* infection records in South America carnivore species to provide a comprehensive analysis of their infection patterns and the possible correlations among distinct carnivore groups (especially considering their habitat, diet and phylogeny). The hypothesis that carnivores are bioaccumulators of *T. cruzi* parasites belonging to distinct DTU's is also discussed.

Material and Methods

Ethics Statement

This study was approved by the ethics committee of Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ (CEUA P-292-06). The capture and sample collection of wild carnivores had permission from the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO license number 25078-2 for Pantanal, number 11124-2 for PNSC and number 14576-2 for Araguari/Cumari), in accordance to Brazilian regulations. All animal handling procedures followed the Guidelines of the American Society of Mammalogists [26]. Appropriate biosecurity techniques and individual protection equipment were used during all procedures of collection and handling of the biological samples.

Study areas

Field studies were carried out in three sites in tropical areas of Brazil (Fig. 1). The first site is a research station in the central region of the Pantanal, named Nhecolândia, in the Municipality of Corumbá, Mato Grosso do Sul State ($18^{\circ} 58.50'S$ $56^{\circ} 37.40' W$). The Pantanal is a large Neotropical wetland recognized for its abundant and diverse wildlife. The research station is covered by a mosaic of forest patches, savannas, scrub savannas, seasonally flooded grasslands and several permanent or temporary lakes. This area is subjected to annual and multi-annual variations of flooding intensity, with an alternation of high-flood and severe drought years [27]. The second site is the Serra da Canastra National Park – SCNP ($20^{\circ} 15.32'S$, $46^{\circ} 27.75' W$) and surroundings, a conservation unit in the southwest of the Minas Gerais State. The area is a 200,000 hectare remnant of the Cerrado biome, covered with grasslands, interspersed with areas of rocky outcrops, scrub savanna and riparian vegetation. The climate is tropical, the dry season occurs from March to October and the wet season from November to February [28]. The third site comprise extensions within the Municipalities of Araguari, Minas Gerais State ($18^{\circ} 37.81' S$, $48^{\circ} 10.54' W$) and Cumari, Goiás State ($18^{\circ} 22.02' S$, $48^{\circ} 5.48' W$). Most of this area is occupied by cattle farms covered with exotic pasture vegetation (*Brachiaria sp.*), although there are still small patches of original Cerrado vegetation. The climate has two well-defined seasons, the wet season from September to March, and the dry season, from April to August [29]. The latter two areas are within the Cerrado biome, which is a vast area of tropical savanna, encompassing about 204 million hectares in the central part of the Brazilian territory [30].

Carnivore capture and sample collection

Wild carnivores were captured: (i) from August 2009 to February 2012 in the Pantanal, except for the ring-tailed coatis, which capture ended in April 2010; (ii) from April 2004 to August 2008 in the SCNP region; and (iii) from April 2008 to July 2011 in the Araguari/Cumari region. For most carnivore species, we used box traps made with galvanized wire mesh baited with a mixture of bacon, eggs, sardine, fruits, boiled chicken and live chicken according to the target species and study sites. Specifically, pumas (*Puma concolor*) were captured with foot-snares not baited and set along trails previously monitored through camera-traps, while crab-eating raccoons (*Procyon cancrivorus*) were actively searched during night periods and captured using a handheld fishing net. We immobilized the animals with an intramuscular injection of a combination of zolazepan and tiletamine (Zoletil[®]) at dosages of 3-20 mg/kg according to the target species. Anesthetized animals were marked with ear-tags, PIT-tags (passive-integrated-transponder) and/or VHF or GPS radio collars for individual identification. We took blood samples by puncture of the cephalic vein stored in Vacutainer[®] tubes with EDTA for hemoculture (only in the Pantanal) and serological tests. Animals were released at the site of capture after total recovery from anesthesia. Total capture effort was 2,430 traps-nights in Pantanal, 4,153 traps-nights in SCNP and 1,340 traps-nights in Araguari/Cumari region.

Trypanosoma cruzi survey

We examined a total of 208 free-ranging carnivores belonging to seven species. The *T. cruzi* infection survey was performed by serological assay and, in the case of the Pantanal, also by hemoculture (HC). This latter was performed as follows: 0.6 ml of blood from each animal was cultured in two tubes (0.3 ml each) containing Novy-Mc Neal-Nicole (NNN) medium with liver infusion tryptose (LIT) overlay. Tubes were examined every fifteen days up to five months. When positive, parasites were grown in LIT, cryopreserved and deposited in the Trypanosomatid collection from wild and domestic animals and vectors - COLTRYP (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro-RJ, Brazil).

For the detection of anti-*T. cruzi* IgG antibodies in sera, we performed the Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) as described by Camargo [31]. The antigens were prepared using the reference strains F90 (TcI) and Y (TcII) from axenic culture and mixed in equal proportions. Wild canids and felids were tested using domestic dog and cat fluorescein conjugates (SIGMA[®]), respectively, whereas Procyonidae species were tested by IFAT using a goat anti-raccoon IgG fluorescein conjugate (KPL[®]). We adopted an IFAT cut-off value of 1/40 for all

species, due to the possibility of cross-reaction with other trypanosomatid parasites. Each reaction included two positive and two negative control sera.

In order to detect possible dual infection or cross-reaction with *Leishmania* spp. sera were also tested by IFAT test using *L. infantum* (IOC/L579 – MHOM/BR/1974/PP75) and *L. braziliensis* (IOC/L566 – MHOM/BR/1975/M2903) promastigotes obtained from the Collection of Leishmania from Oswaldo Cruz Institute (CLIOC) mixed in equal proportion as antigens (cut-off: 1:40). Wild canids were additionally tested for *Leishmania* infection using the Rapid Test for Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (TR DPP®, BioManguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) and the Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA, Biomanguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil). Cut-off value for ELISA was optical absorbance ≥ 0.200 mean ± 3 SD. If positive for *Leishmania* infection in IFAT, DPP or ELISA, samples were considered positive to *T. cruzi* only when the IFAT titer for *T. cruzi* was 1/80 or higher.

For the seroprevalence calculation, each individual was counted once (positive/total number of sampled individuals). For the hemoculture prevalence, we incorporated all samples, including recaptured individuals.

Seropositive animals that had negative results in the parasitological test were considered to be infected with *T. cruzi* but with low parasitemia, thus probably less prone to be infective to the vectors. Parasitological tests, such as hemoculture, xenodiagnosis or fresh blood examination, are less sensitive and when positive reflect high parasite burden. Thus, positive hemocultures demonstrate their transmissibility potential, *i.e.*, the potential of these hosts to infect vectors.

***Trypanosoma cruzi* molecular characterization**

Epimastigote forms collected from positive hemocultures at the end of the log phase were washed, and incubated with proteinase K and SDS (sodium dodecyl sulfate). The genomic DNA of the lysed cells was extracted with standard phenol-chloroform protocols [32]. Characterization was carried out by multiplex PCR amplification of the non-transcribed spacer of the mini-exon gene (MMPCR) [33]. DTU's were identified according to amplicon size: 150 bp (TcIII/TcIV), 200 bp (TcI) and 250 bp (TcII/TcV/TcVI), besides *T. rangeli* – TR (100 bp) [34]. When MMPCR resulted in TcII/TcV/TcVI band pattern we performed a PCR amplification of the nuclear 1f8 gene followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of fragments digested by Alw21I enzyme [35] to discriminate TcII from hybrids (TcV and TcVI). We additionally performed kDNA PCR amplification [32], which distinguishes *T. rangeli* (a specific 760 bp band besides variable

fragments of 300-450 bp) from *T. cruzi* (only one 330 bp band) in order to confirm *T. cruzi* in isolates that could not be characterized with the previous genomic targets. Each reaction included sterile distilled water instead of DNA as a negative control and positive control samples from *T. cruzi* strains representing the DTUs. PCR products were visualized under ultraviolet light after electrophoresis in 2% agarose gel with ethidium bromide staining.

Statistical analysis

We used chi-square tests ($\alpha=0.05$) to investigate significant differences between seroprevalence rates for the different species and host sex in each study area.

In order to determine if *T. cruzi* infection rates in wild carnivores was associated with species diet, we retrieved data on the diet of the different species from the literature, taking into account the study site. The only exception was for the crab-eating raccoon, as there are no studies on its diet performed in the Pantanal. We first made scatter diagrams of the proportion of invertebrates in the species diet and the *T. cruzi* exposure rates to visualize the mathematical function that best represented the relationship between these variables. From the graphic analysis we estimated the linear regression model. Species with $n < 10$ specimens per study site were excluded from this analysis. The *T. cruzi* exposure rates, hosts and diet assigned for each species, besides the references used are shown in supporting information (Table S1).

To test if infectiveness rates (the potential of the host to infect vectors as demonstrated by positive hemoculture, xenodiagnosis or fresh blood examination) between different taxa were phylogenetically autocorrelated we used the phylogenetic topology of Agnarsson et al. [36] to compute proximity matrices. For this, we calculated the infection rate (%) for each species as the total positive/total examined * 100. A complete list of data sets and source references is shown in supporting information (Table S2). We used Moran's autocorrelation index [37], Abouheif's test [38] with Abouheif's original matrix proximity calculus, Thioulouse et al. [39] implementation and patristic distances. Statistical significance of tests was done using 1,000 MonteCarlo permutations. We also tested for the phylogenetic effect of infectivity using ANOVA on phylogenetic eigenvector decomposition of the phylogenetic tree [40]. All computations were done under R 2.13 software and used packages ade4 [41], adephylo [42], ape3.0-5 and phylobase [43].

Results

Pantanal

The four examined carnivore species, the ocelot (*Leopardus pardalis*), the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), the ring-tailed coati (*Nasua nasua*) and the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*), were infected by *T. cruzi* as demonstrated by the high rates of positive IFAT tests, but high parasitemias, expressed by positive hemocultures, were found only in the two Procyonidae species (Table 1).

The two ocelots examined tested positive in the IFAT (titers 1:80 and 1:160) and the other three carnivore species were similarly exposed to *T. cruzi* infection (range 48-75%), as no significant differences was found in the seroprevalence rates among them ($\chi^2 = 3.62$, $df = 2$, $p < 0.16$). The crab-eating fox seroprevalence was 63% and titers did not exceed 1:80. The seroconversion observed among 7 out of 8 recaptured individuals, pointed to the existence of an active *T. cruzi* transmission cycle. For the two Procyonidae species, the seroprevalence were 48% and 75%, for the ring-tailed coati and crab-eating raccoon, respectively, with titers reaching up to 1:320. Gender difference in seroprevalence was observed only in the ring-tailed coati, being higher in females (77%) than males (35%) ($\chi^2 = 6.3$; $df = 1$, $p < 0.01$).

The prevalence of positive HC was nearly two times higher for ring-tailed coatis (29%) than for crab-eating raccoons (15%). Moreover, one ring-tailed coati was HC positive in the first capture and also in the second capture 14 months later.

We obtained 20 *Trypanosoma sp.* isolates morphologically similar to *T. cruzi* and *T. rangeli* through hemoculture, of these, three (two from ring-tailed coatis and one from crab-eating raccoon) could not be characterized due to contamination during field procedures. Genotyping from the 16 ring-tailed coati isolates revealed that twelve of them were TcI in single infections (n = 6, 37.5%) and mixed infections: TcI and TcII/TcV/TcVI (n=2, 12.5%), TcI and TcIII/IV (n=1, 6.3%) or TcI and *Trypanosoma rangeli* (n=3, 18.8%). The single characterized isolate from the crab-eating raccoon was genotyped as TcI.

We were unable to define the *T. cruzi* genotype in four ring-tailed coati's isolates (numbers 7, 9, 14, 15 – Fig. 2). The MMPCR characterization on these isolates resulted on multiple bands pattern across repeated experiments, including an odd band about 320bp (isolates 7, 9 and 14). The 1f8/Alw21I assay confirmed only DTU TcI. The kDNA assay confirmed the four isolates were *T. cruzi*.

Serra da Canastra National Park (SCNP)

An active *T. cruzi* transmission cycle among carnivores was also observed in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) population from the SCNP region. Seroprevalence was 26% and among non-infected recaptured individuals (n=10), 4 seroconverted after one-year follow-up and other 2 seroconverted after two years. In all cases, titers did not exceed 1:80. No significant differences was found between genders ($\chi^2 = 0.36$; $df = 1$, $p < 0.54$).

Araguari/Cumari

In this region none of the maned wolves (n=4) displayed positive serological tests and we found a significant difference in the *T. cruzi* infection rates among the other three examined species ($\chi^2 = 8.79$, $df = 2$, $p < 0.01$) (Table 1).

The two puma specimens tested positive in the IFAT (titers - 1:40 and 1:160). In the two canid species, the hoary fox's (*Lycalopex vetulus*) seroprevalence rate (71%) was two times higher than that of the crab-eating fox's (33%). Titers for both species reached up to 1:320. Neither species had differences in seroprevalence amid gender (hoary fox: $\chi^2 = 0.68$; $df = 1$, $p = 0.40$; crab-eating fox: $\chi^2 = 0.29$; $df = 1$, $p = 0.58$).

Trypanosoma cruzi infection rates in relation to species diet

T. cruzi infection rates in wild carnivores significantly increased with the proportion of invertebrates in the species diet ($r^2 = 0.623$; $df = 9$; $p < 0.004$; Fig. 3). In addition, the four felids examined, which include a high proportion of mammals in their diet, were all infected (Table 1).

Neotropical wild carnivores as Trypanosoma cruzi host

Data on Neotropical wild carnivore *T. cruzi* hosts combining our results and literature records were assembled in Table 2. Fifteen Neotropical carnivore species belonging to five families were described to be infected by *T. cruzi* by serological and/or parasitological methods in Argentine, Brazil, Chile and Colombia.

Distinct *T. cruzi* infection patterns among carnivore species were notable. Procyonids demonstrated to have a high potential to infect vectors, in particular the ring-tailed coati, given the persistently high parasitological prevalence rates (Table 2). Also, this species was recorded harboring the main *T. cruzi* lineages in single and mixed infection, corroborating its bioaccumulator

potential. In spite of the few data available, mustelids might also display high potential to infect vectors and one species was recorded harboring mixed infections. Regarding the Mephitidae family, one single species, the skunk (*Conepatus chinga*) was found infected: parasitological tests consistently tested positive and this species harbored TcIII in single infections in Argentina. In canid species, high parasitemias were observed only in a few individuals of the *Lycalopex* genus and one crab-eating fox. The *T. cruzi* infection in felids is poorly reported: one ocelot was reported to have high parasitemia and the serological detection of *T. cruzi* infection in pumas suggests that they may also be involved in the *T. cruzi* network (Table 2).

The aforementioned differences in infection pattern among carnivore species were not phylogenetically autocorrelated, as none of the tests revealed a significant influence of carnivore phylogeny on *T. cruzi* infection detected by hemoculture/xenodiagnosis assays. For Moran's test $I=0.059$, and the expected null value was -0.055 ($p = 0.198$). Abouheif's test with different proximity matrices were also not significant even though patristic distance retrieved marginally significant results ($p = 0.077$ – original; $p = 0.099$ – Thioulouse, $p = 0.044$ - patristic). The global ANOVA of infectiveness on phylogenetic structure was not significant ($p= 0.277$). However, tests on each of the 7 eigenvector showed that the first phylogenetic eigenvector, which contrasts the superfamily Musteloidea vs. families Canidae and Felidae was significant ($p = 0.02689$, Fig. S3). This indicates a difference in infectiveness rates between these groups (Fig. 4).

Discussion

Fourteen Neotropical carnivore species belonging to five families were already described to be infected by *T. cruzi* in Argentine, Brazil, Chile and Colombia. The fifteenth one, the puma was found infected in the present study. Distinct *T. cruzi* infection patterns across carnivore species and study sites were notable, as also observed among the seven species herein studied in three different areas of Brazil. Particularly interesting is the finding that carnivore species, mainly procyonids and mustelids, often exhibited high parasitemias and were able to harbor the main *T. cruzi* genotypes, both in single and mixed infections. We also evidenced that species diet could influence the *T. cruzi* infection rates.

In the Pantanal the *T. cruzi* cycle included all examined carnivore species, as previously reported in the same study site [14]. Notwithstanding, based on the positive hemoculture only the ring-tailed coatis and the crab-eating raccoons demonstrated a potential to infect vectors. This is in accordance with previous studies that report the role played by the ring-tailed coati as the main reservoir of *T. cruzi* in the Pantanal due to its high prevalence of infection, long-lasting parasitemia

and infection with the main *T. cruzi* lineages [14,44,45]. Moreover, the coati has numerous paths for contact with *T. cruzi*, as it occupies both arboreal and terrestrial strata in several habitat types and can prey on infected insects and mammals [46]. Another coati's ecological characteristic that facilitates infection by *T. cruzi* is its behavior of construction of arboreal nests for resting and reproduction, as we have found several of these nests infested with triatomine bugs in our recent field observations (J. Saab, *unpublished data*). Along with its potential to infect vectors and the capacity to maintain multiples lineages of the parasite [44,45], this species may be considered a network hub, a common connection point joining transmission cycles maintained within terrestrial and arboreal mammals and vectors.

We observed a temporal change in the ratio of infection by the different *T. cruzi* lineages in the coati population of the Pantanal in comparison to former reports. Previously, single TcI and TcII/TcV/TcVI infections were reported to occur in similar ratios, whereas TcIII/TcIV (formerly Z3) and *Trypanosoma rangeli* (TR) occurred in minor proportion [44]. Herein, TcI has prevailed over TcII/TcV/TcVI whereas TcIII/TcIV, which was not reported in the past few years [45], was isolated again from the coati population. We also observed a gradual increase in the prevalence of *T. rangeli* (3% - [44]; 7% - [45]; 20% this study). It is well-known that the striking variation of the flooding intensity in the Pantanal, as well as other environmental changes, has a strong effect on the local community structure, modulating vectors, hosts and consequently their parasites density, distribution and interrelationships [27,47]. In the same manner changes in the hosts' environment are expected to impact the parasite subpopulation (in this case, *T. cruzi* DTU's), but the outcome of this impact might be different according to each subpopulation dynamics. For instance, TcI infects a huge variety of mammal host species and its infection is described as resulting in high and long lasting parasitemias [8,17,48]. This is not the case of TcII and probably may also not be the case of TcIII/TcIV (formerly Z3), which infection results in short period parasitemias and are described to occur in more restricted transmission cycles [8,17]. Therefore the distribution of TcI in a given environment is expected to be less impacted by environmental changes than TcII and TcIII/TcIV (formerly Z3). Likewise with any other living being populations, *T. cruzi* subpopulations might also expand and retract according to the resources available. Moreover, competitive exclusion and interactions between tripanosomatid species and/or *T. cruzi* subpopulations certainly take a role in modulating the ratios of infection. In any case, this highlight how complex and dynamic the *T. cruzi* transmission cycles can be, even regarding a single species in a small snippet of time and space.

We were not able to define the *T. cruzi* genotype in four out of 16 ring-tailed coati isolates, as they displayed multiple bands, besides and additional odd band pattern of 320bp in the MMPCR assay. The other two molecular targets employed confirmed only TcI and excluded *T. rangeli*,

showing that the band pattern observed was not related to multiple infections. In this sense, we are probably facing *T. cruzi* isolates with odd band patterns in the MMPCR assay, a method routinely used worldwide and recently validated for a rapid typing of *T. cruzi* DTU groups [34]. Indeed, unusual profiles within different molecular targets, including the mini-exon gene, had already been observed in *T. cruzi* wild mammal isolates [49]. Rather than methodological constraints, these observations may point out that any time we might deal with undiscovered/unusual lineages which the most employed markers are not capable of characterizing, especially while working with isolates derived from wild hosts. These findings reinforce that the diversity of *T. cruzi* might be much higher than currently acknowledged, as evidenced, for example, by the recent description of the Tcbat [50].

As already observed [45], the ring-tailed coati was the only carnivore species examined in this study to display gender differences in the infection rate. Coatis have an unique social system among carnivore species; males and females have marked differences in their ecology, as females live in groups while most adult males are solitary (except during the breeding season) [51]. The rate of infection by *T. cruzi* in a specific host is driven by contact processes among vector-parasite-host; thus we might expect that these ecological dissimilarities lead to different infection ratios. In the case of ring-tailed coatis, females were observed to have differential habitat use during reproductive period [52] and to spend more time in nests, whereas males' coatis are not involved in parental care [53]. This may put females at greater risk for exposure to *T. cruzi*, as these nests are a suitable ecotope for triatomines (J. Saab, *unpublished data*), indicating that habitat use and not gender is the deciding factor here.

The crab-eating raccoon was another Procyonidae species implicated in the maintenance and dispersion of *T. cruzi* in the Pantanal region. Different from the congener common raccoon *Procyon lotor*, widely studied and the most commonly reported *T. cruzi* host in North America (along with *Didelphis virginiana*) [54], the crab-eating raccoon is poorly studied. This raccoon species is nocturnal, omnivorous and highly associated with water. Shelter sites in Pantanal were frequently registered in clusters of terrestrial bromeliad (*Bromelia balansae*) (C. Cheida, *unpublished data*), a recognized habitat for the vector species *Triatoma sordida* and *Pastrongylus megistus*, both known to occur in the Mato Grosso do Sul State [55]. The high parasitemias observed in this study corroborate that the crab-eating raccoon, just as the other procyonids, has a potential to infect triatomines.

The crab-eating foxes and the ocelots from the Pantanal, although highly exposed, did not display high parasitemias. Regarding the crab-eating foxes, our hypothesis is that the pattern of *T.*

cruzi infection in this species, and probably in other wild canid species, is similar to that found in domestic dogs, which is characterized by a short period of patent parasitemia during the acute phase, followed by a chronic phase with low recovery of positive hemocultures, even in reinfections [56]. Also, in spite of its plasticity in diet and habitat preferences [29], this species has much less capacity to explore microhabitats suitable for triatomines than the coatis with its great ability with its paws and snout [57]. Besides, differently from coatis, the crab-eating fox are restricted to the terrestrial environment. On the other hand, the ocelot has the most carnivorous diet among these three species and can explore both terrestrial and arboreal strata. In such hypercarnivorous, *T. cruzi* infection might reflect the rates of infection among their prey [15]. Indeed, ocelots from the Pantanal tested negative in hemoculture and the small mammals from the same region were reported to display low HC prevalence [58].

A *T. cruzi* transmission cycle involving another carnivore species, the maned wolf, was also observed in the Serra da Canastra National Park region. Our results on *T. cruzi* infection in maned wolves verified by serology are in accordance with a previous study conducted by us [15] and both reported seroconversion. Together, this eight-year follow-up attested that *T. cruzi* is enzootic among maned wolves from SCNP, and also that transmission is well-established and active in the area.

In Araguari/Cumari region, the two tested puma were infected by *T. cruzi*, possible due to the top chain position of this species, besides the classical contaminative route. Indeed, to the best of our knowledge, this is the first such report from a top predator. Infection rates in the hoary fox was two times higher than the infection rates in the crab-eating fox, and the other canid species examined, the maned wolf, tested negative. The present study represents the first sizable data on the hoary fox since a single specimen was previously described infected in the early 70's [59]. Amongst those three canids, the hoary fox seems to be the most likely to be exposed to triatomine bugs due to their ecological characteristics. It is the only Neotropical canid with a predominantly insectivore diet and also the only of those three canids to use armadillo burrows regularly [29,60], a recognized ecotope for some vectors in this area, such as the *Panstrongylus* species [55,61].

The oral transmission has been constantly suggested as the principal mechanism of parasite dispersion among free-ranging mammals and recently, even humans [5,62]. This route may be of particular importance for carnivore species, since many of them feed on both insects and mammals [63], thus providing several opportunities for infection throughout its life. The classic contaminative route may also be present in some of these infections, but it is probably less prone to be the most effective because some of these carnivores are very active at night, do not use permanent dens, and the contaminated feces still would have to pass the usually dense fur of these carnivorans. Herein,

we demonstrated that the higher the proportion of invertebrates in species diet, the greater *T. cruzi* infection rate. Interestingly, the *T. cruzi* exposure rate in the three canid species, the hoary fox, the crab-eating fox and the maned wolf, scales in the proportion of the amount of invertebrates in their diet. The transmission by the ingestion of infected triatomines is highly efficient and was already demonstrated in the carnivores striped skunk (*Mephitis mephitis*) [64] and raccoon (*Procyon lotor*) [21]. Our results suggest that carnivore species with insectivorous diet would have more probability of contact with triatomine bugs while foraging. For top-chain species, the infection through the ingestion of infected prey might also be an important infection route [19].

Our assemblage on *T. cruzi* infection among Neotropical carnivore species corroborated epidemiological evidence that they are involved in the *T. cruzi* transmission networks, though with variable potential to amplify and disperse parasite populations according to the species ecological characteristics and regional peculiarities. The long-term maintenance of the *T. cruzi* transmission cycles will rely on vector feeding upon mammals displaying patent parasitemias. Herein, we found that species belonging to the superfamily Musteloidea were more likely to display high parasitemias and thus to infect vectors. One common component within this group is that, despite the adaptations to predation of vertebrates as other carnivore species, many species are omnivores [22]. Mesocarnivores feed on both invertebrates and mammals and thus seems to take a place at the top of the *T. cruzi* transmission chain. In fact, the frequent findings of mixed infection, as demonstrated by the coati, corroborate the bioaccumulator potential expected for mammals at the top of the parasite chains.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Dr. Pedro Cordeiro-Estrela for his help with phylogenetic analysis and to Dr. Vera Bongertz for revising the English version. We also grateful to Magyda Dahrough, Caio F. da Motta, Mozart C. de Freitas Júnior, Frederico A. de Sousa, Daniel Rocha and Hugo C. M. Costa for all efforts and assistance during field work. We would also like to thank Valdirene Lima for the consistently helpful comments in genotyping analysis. Marcos Lima, Carlos Ruiz, Kerla Monteiro, Juliana Barros and André Pereira provided essential support and guidance during laboratory work. We thank Embrapa Pantanal for logistical and institutional support. We are in debt with the Maned Wolf Conservation Project team for kindly contributing maned wolf's samples, especially to Flávio Rodrigues, Jean Pierre Santos, Joares May-Júnior, Rogério Cunha de Paula, Ronaldo Morato and Pró-canívoros Institute.

Funding

This study was funded by ChagasEpiNet 223034. Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) - 9777.256.476.13022008. National Research Center for the Conservation of Natural Predators – CENAP/ICMBio. Wildlife Conservation Society – OWOH 2008_001. Consórcio Capim Branco de Energia. CNPq Edital Universal 014/2008. PDJ-CNPq 150608/2013-6. Smithsonian Institution. Neotropical Grassland Conservancy. Idea Wild. U.S. Fish and Wildlife Service. A doctoral grant was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to FLR and CCC.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FLR GM AMJ;

Performed the experiments: FLR JSL CCC FGL FCA RCA DB HMH;

Analyzed the data: FLR ALR GM AMJ;

Wrote the manuscript: FLR ALR AMJ

References

1. WHO (2002) Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 905: 1-109.
2. Noireau F, Diosque P, Jansen AM (2009) *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res 40: 26.
3. Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR (2008) The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. PLoS Negl Trop Dis 2: e300.
4. Toso MA, Vial UF, Galanti N (2011) Oral transmission of Chagas' disease. Rev Med Chil 139: 258-266.
5. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB (2012) Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis 54: 845-852.
6. Chagas C (1909) Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 159-218.
7. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 1051-1054.
8. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol 12: 240-253.
9. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, et al. (2009) A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology 136: 641-655.
10. Ramirez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunuba ZM, Guhl F (2012) Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. Infect Genet Evol 12: 1743-1750.
11. Rozas M, Botto-Mahan C, Coronado X, Ortiz S, Cattán PE, et al. (2007) Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77: 647-653.
12. Araujo CA, Waniek PJ, Xavier SC, Jansen AM (2011) Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. Exp Parasitol 127: 308-312.

13. Perez E, Monje M, Chang B, Buitrago R, Parrado R, et al. (2012) Predominance of hybrid discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in domestic *Triatoma infestans* from the Bolivian Gran Chaco region. *Infect Genet Evol.* Doi: 10.1016/j.meegid.2012.09.014.
14. Herrera HM, Rocha FL, Lisboa CV, Rademaker V, Mourao GM, et al. (2011) Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 380-387.
15. Rocha FL, Roque AL, Arrais RC, Santos JP, Lima VD, et al. (2013) *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology* 140: 160-170.
16. Tibayrenc M (2010) Modelling the Transmission of *Trypanosoma cruzi*: The Need for an Integrated Genetic Epidemiological and Population Genomics Approach. *Modelling Parasite Transmission and Control* 673: 200-211.
17. Roellig DM, McMillan K, Ellis AE, Vandeberg JL, Champagne DE, et al. (2010) Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 137: 959-966.
18. Jansen AM, Roque ALR (2010) Domestic and wild mammalian reservoir. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. *American trypanosomiasis Chagas Disease - one hundred years of research*. London: Elsevier. pp. 249-276.
19. Thomas ME, Rasweiler Iv JJ, D'Alessandro A (2007) Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 559-565.
20. Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, et al. (2008) Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem* 47: 101-109.
21. Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ (2009) Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *J Parasitol* 95: 360-364.
22. Nowak, R. M. (2005) *Walker's carnivores of the world*. USA: The John Hopkins University Press. 313 p.
23. Barretto MP, Ribeiro RD (1979) Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. *Rev Ins Adolfo Lutz* 39: 25-36.
24. Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS (2011) Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol* 27: 459-466.

25. Letnic M, Ritchie EG, Dickman CR (2012) Top predators as biodiversity regulators: the dingo *Canis lupus dingo* as a case study. *Biological Reviews* 87: 390-413
26. Sikes RS, Gannon WL (2011) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92: 235-253.
27. Alho CJR, Silva JSV (2012) Effects of Severe Floods and Droughts on Wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil) - A Review. *Animals* 2: 591-610.
28. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (2005) Plano de manejo do Parque Nacional da Serra da Canastra: 1-94.
29. Lemos FG, Facure KG, Azevedo FC (2011) A first approach to the comparative ecology of the hoary fox and the crab-eating fox in a fragmented human altered landscape in the Cerrado Biome at Central Brazil. In: Rosalino LM, Gheler-Costa C, editors. *Middle-sized carnivores in agricultural landscapes*. New York: Nova Sciences Publishers. pp. 143-160.
30. Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG (2010) Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* 166: 113-124.
31. Camargo ME (1966) Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 8: 227-235.
32. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM (1999) Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop* 72: 203-212.
33. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, et al. (2001) A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 97-99.
34. Aliaga C, Breniere SF, Barnabe C (2011) Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infect Genet Evol* 11: 1155-1158.
35. Rozas M, De DS, Adai V, Coronado X, Barnabe C, et al. (2007) Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment--length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis* 195: 1381-1388.
36. Agnarsson I, Kuntner M, May-Collado LJ (2010) Dogs, cats, and kin: a molecular species-level phylogeny of Carnivora. *Mol Phylogenet Evol* 54: 726-745.
37. Moran PAP (1948) The Interpretation of Statistical Maps. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology* 10: 243-251.
38. Abouheif E (1999) A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evolutionary Ecology Research* 1: 895-909.

39. Thioulouse J, Chessel D, Champely S (1995) Multivariate analysis of spatial patterns: a unified approach to local and global structures. *Environmental and Ecological Statistics* 2: 1-14.
40. Diniz JAF, De Sant'ana CER, Bini LM (1998) An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia. *Evolution* 52: 1247-1262.
41. Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1-20.
42. Jombart T, Dray S (2010) Adephylo: exploratory analyses for the phylogenetic comparative method. *Bioinformatics* 26: 1907-1909.
43. Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.
44. Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, et al. (2008) The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 1133-1139.
45. Alves FM, Olifiers N, Bianchi RC, Duarte AC, Cotias PM, et al. (2011) Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 835-841.
46. Desbiez ALJ, Bodmer RE, Tomas WM (2010) Mammalian Densities in a Neotropical Wetland Subject to Extreme Climatic Events. *Biotropica* 42: 372-378.
47. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol* 30: 1395-1405.
48. Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ (2009) Genetically different isolates of *Trypanosoma cruzi* elicit different infection dynamics in raccoons (*Procyon lotor*) and Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Int J Parasitol* 39: 1603-1610.
49. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, et al. (2009) Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg* 81: 1041-1049.
50. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, et al. (2009) A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136: 641-655.
51. Hirsch BT (2011) Long-term adult male sociality in ring-tailed coatis (*Nasua nasua*). *Mammalia* 75: 301-304.

52. Bianchi, R. C. (2009) Ecologia de mesocarnívoros em uma área no Pantanal Central, Mato Grosso do Sul. [Thesis]. Corumbá: Federal University of Mato Grosso do Sul. 193 p.
53. Hirsch BT, Maldonado JE (2011) Familiarity breeds progeny: sociality increases reproductive success in adult male ring-tailed coatis (*Nasua nasua*). *Molecular Ecology* 20: 409-419.
54. Brown EL, Roellig DM, Gompper ME, Monello RJ, Wenning KM, et al. (2010) Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* Among Eleven Potential Reservoir Species from Six States Across the Southern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10: 757-763.
55. Gaunt M, Miles M (2000) The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565.
56. Machado EM, Fernandes AJ, Murta SM, Vitor RW, Camilo DJ, et al. (2001) A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J Trop Med Hyg* 65: 958-965..
57. Desbiez ALJ, Borges PAL (2010) Density, habitat selection and observations of South American Coati *Nasua nasua* in the central region of the Brazilian Pantanal wetland. *Small Carnivore Conservation* 42: 14-18.
58. Rademaker V, Herrera HM, Raffel TR, D'Andrea PS, Freitas TP, et al. (2009) What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop* 111: 102-107.
59. Albuquerque RD, Barretto MP (1970) On wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLIV. Natural infection of the field fox, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (Lung, 1842) by *T. cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12: 375-382.
60. Courtenay O, Macdonald DW, Gillingham S, Almeida G, Dias R (2006) First observations on South America's largely insectivorous canid: the hoary fox (*Pseudalopex vetulus*). *Journal of Zoology* 268: 45-54.
61. Mendes PC, Lima SC, Paula MBC, Souza AA, Rodrigues EAS, et al. (2008) Chagas disease and the space distribution of captured triatomines in Uberlândia, Minas Gerais - Brazil. *Hygeia* 3: 176-204.
62. Roque AL, Xavier SC, da Rocha MG, Duarte AC, D'Andrea PS, et al. (2008) *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg* 79: 742-749.
63. Gittleman JL, Harvey PH (1982) Carnivore Home-Range Size, Metabolic Needs and Ecology. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 10: 57-63.

64. Davis DS, Russell LH, Adams LG, Yaeger RG, Robinson RM (1980) An experimental infection of *Trypanosoma cruzi* in striped skunks (*Mephitis mephitis*). J Wildl Dis 16: 403-406.
65. Martinelli MM, Volpi TA (2010) Diet of racoon *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) in a mangrove and restinga area in Espírito Santo state, Brazil. Natureza on-line 8: 150-151.
66. Queirolo D, Motta-Junior JC (2007) Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. Acta Theriologica 52: 391-402.
67. Jacomo ATDA, Silveira L, Diniz JAF (2004) Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. Journal of Zoology 262: 99-106.
68. Martins R, Quadros J, Mazzolli M (2008) Food habits and anthropic interference on the territorial marking activity of *Puma concolor* and *Leopardus pardalis* (Carnivora: Felidae) and other carnivores in the Juréia-Itatins Ecological Station, São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Zoologia 25: 427-435.
69. Vynne C, Keim JL, Machado RB, Marinho J, Silveira L, et al. (2011) Resource selection and its implications for wide-ranging mammals of the brazilian Cerrado. Plos One 6: e28939.
70. Albuquerque RD, Barretto MP (1968) Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*." XXX: natural infection of the bush dog, "*Cerdocyon thous azarae*" (Wied, 1824) by "*T. cruzi*". Rev Bras Biol 28: 457-468.
71. Neghme A, Schenone H (1962) Enfermedad de Chagas en Chile: veinte años de investigación. Ann Congr Int Doença de Chagas 3: 1069-1105.
72. Whiting C (1946) Contribución al estudio de las reservas de parasitos de la enfermedad de Chagas en Chile. Primeiros hallazgos en Chile de mamíferos silvestres infestados por *Trypanosoma cruzi*. Rev Chil Hig Med Prev 8: 69-100.
73. Mazza S (1940) Otros mamíferos infectados naturalmente por *Schizotrypanum cruzi*, o cruzi-similes en provincias de Jujuy y Salta. M.E.P.R.A. 45: 119-134.
74. Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, et al. (2008) Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. International Journal for Parasitology 38: 1533-1543.

75. Ceballos LA, Cardinal MV, Vazquez-Prokopec GM, Lauricella MA, Orozco MM, et al. (2006) Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop* 98: 286-296.
76. Wisnivesky-Colli C, Schweigmann NJ, Alberti A, Pietrokovsky SM, Conti O, et al. (1992) Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 38-41.
77. Pietrokovsky SM, Schweigmann NJ, Riarte A, Alberti A, Conti O, et al. (1991) The skunk *Conepatus chinga* as new host of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *J Parasitol* 77: 643-645.
78. Barretto MP, Ribeiro RD (1972) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LI. Natural infection of the mustelid, *Eira barbara barbara* (Lin., 1758) by *T. cruzi*. *Rev Bras Biol* 32: 413-418.
79. Deane LM (1964) Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 16: 27-48.
80. Deane LM (1961) Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. I – Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 3: 15-28.
81. Rodrigues BA, Mello GB (1942) Contribuição ao estudo da tripanosomíase americana. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 37: 77-94.
82. Ferriolli FF, Barretto MP (1969) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXV. Natural infection of the ferret *Galictis cuja furax* (Thomas, 1907) by *T. cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 11: 264-273.
83. Barretto MP, Albuquerque RD (1971) Studies on reservoirs and wild vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLVII. Natural infection of the mustelid, *Galictis vittata braziliensis* (Thunberg, 1820) by *T. cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 13: 346-351.
84. Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM (2009) The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol* 165: 19-24.
85. Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC (1979) Chagas's Disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Para, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 193-204.
86. Miles MA, Povoá MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, et al. (1981) Chagas's disease in the Amazon Basin: I. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 667-674.

87. Ferriolli FF, Barretto MP (1968) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXIX. Natural infection of *Nasua nasua solitaria* Schinz 1821 by *T. cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 10: 354-363.
88. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, et al. (1994) *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50: 557-565.
89. Barretto MP, Ferriolli FF (1970) Wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXIX: Natural infection of *Procyon cancrivorus nigripes* Mivart, 1885, by *T. cruzi*. Rev Bras Biol 30: 431-438.
90. Wilson DE, Reeder DM (editors) (2005) Mammal species of the world. A Taxonomic and geographic reference. Johns Hopkins University Press. 2142 p.

Figures and tables

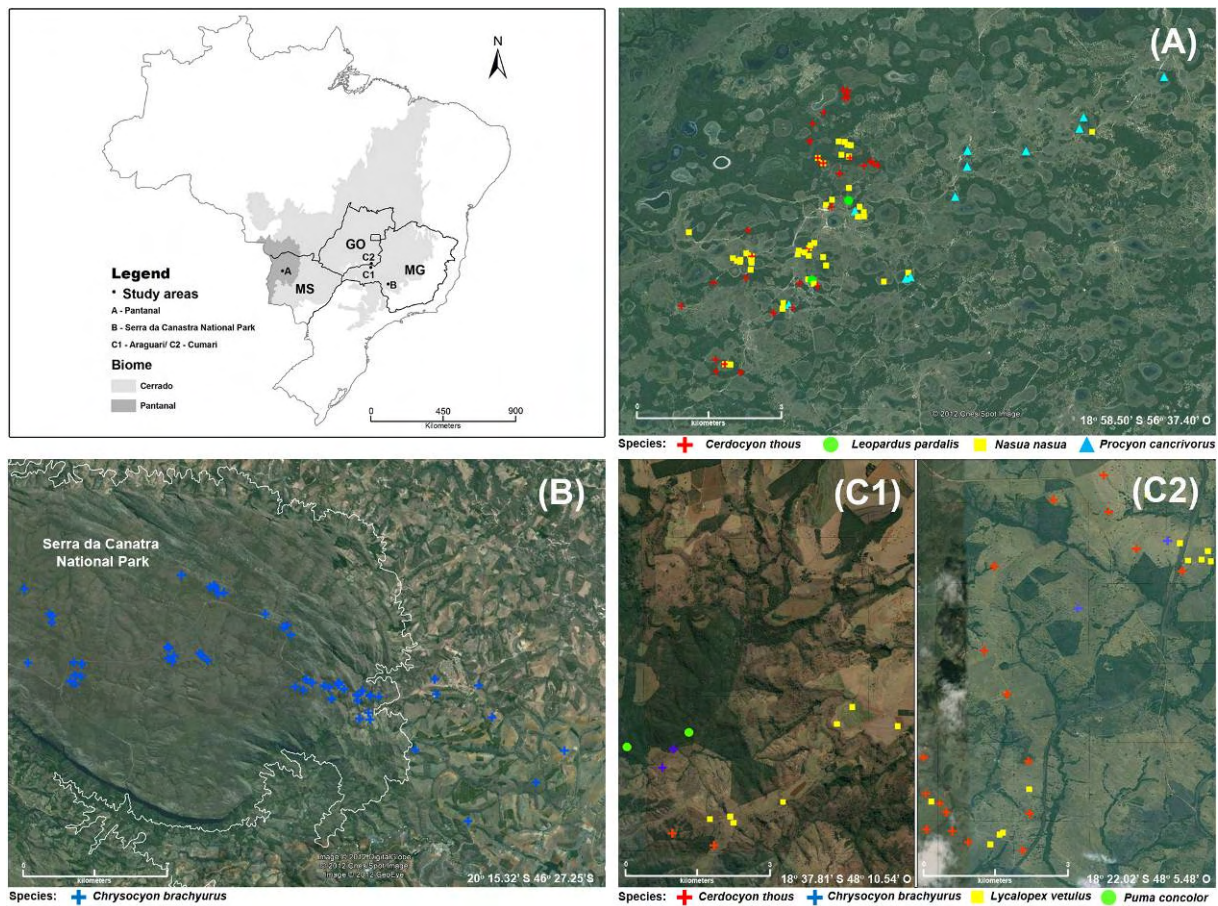


Figure 1. Spatial distribution of free-ranging carnivore species examined for *Trypanosoma cruzi* infection in Brazil. (A) Pantanal - Mato Grosso do Sul State (MS), (B) Serra da Canastra National Park (SCNP) and its surroundings - Minas Gerais State (MG), (C1) Araguari – Minas Gerais State (MG) and (C2) Cumari – Goiás State (GO). Geometric symbols represent carnivore species, according to the figure legend. In the upper left figure the black contour shows the study sites within respective States in Brazil.

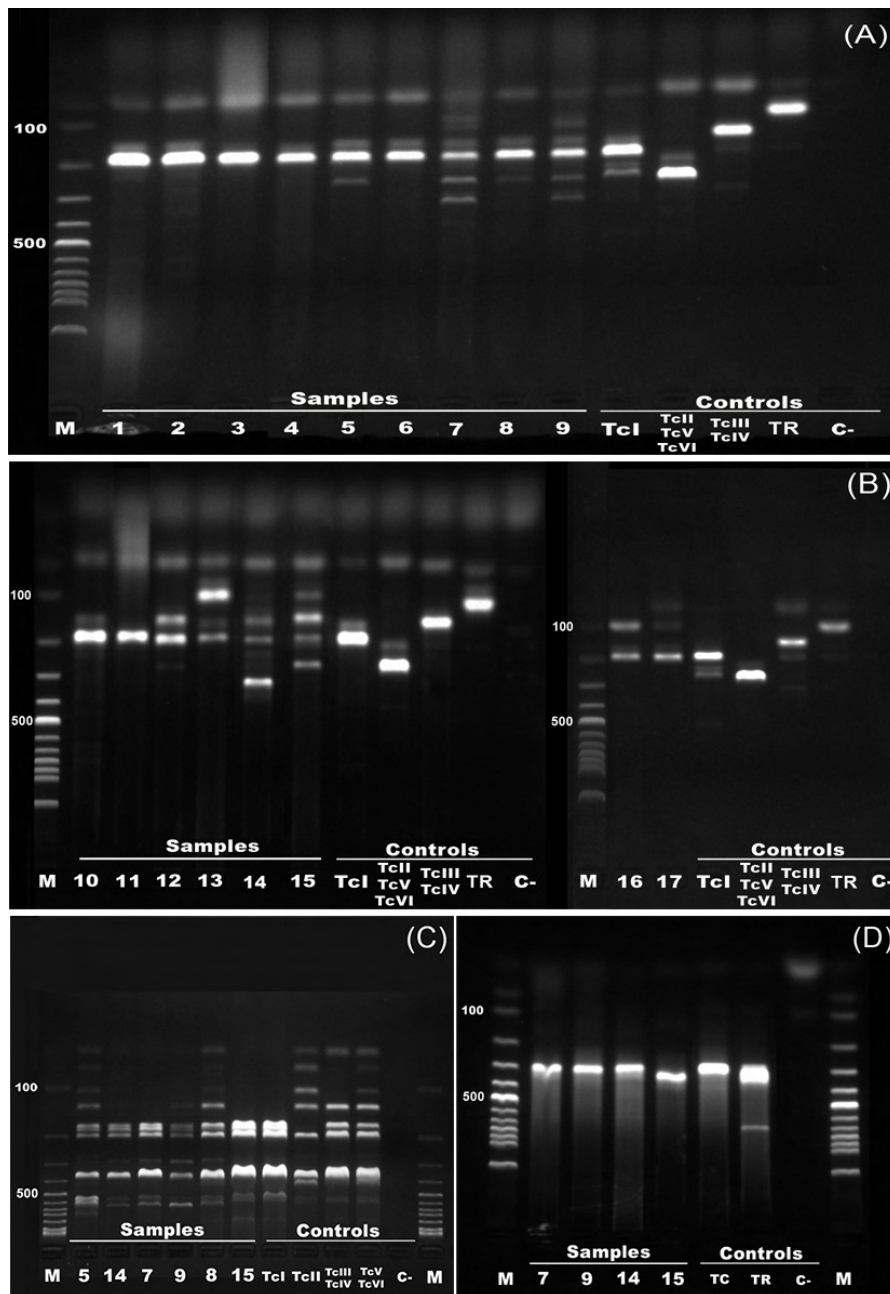


Figure 2. *Trypanosoma cruzi* genotyping of wild carnivore isolates from the Pantanal wetland, Mato Grosso do Sul State, Brazil. Representative agarose electrophoresis gels stained with ethidium bromide of the (A and B) Miniexon multiplex-PCR products, (C) 1f8 gene/Alw21I PCR-RFLP products and (D) kDNA PCR products. Lanes: M. Molecular weight markers (100bp DNA ladder), 1- *Procyon cancrivorous* isolate; 2-17 – *Nasua nasua* isolates. Control samples: TcI, TcII, TcIII/TcIV, TcV/TcVI, TR - *T. rangeli*, TC – *T. cruzi* and C- Negative control.

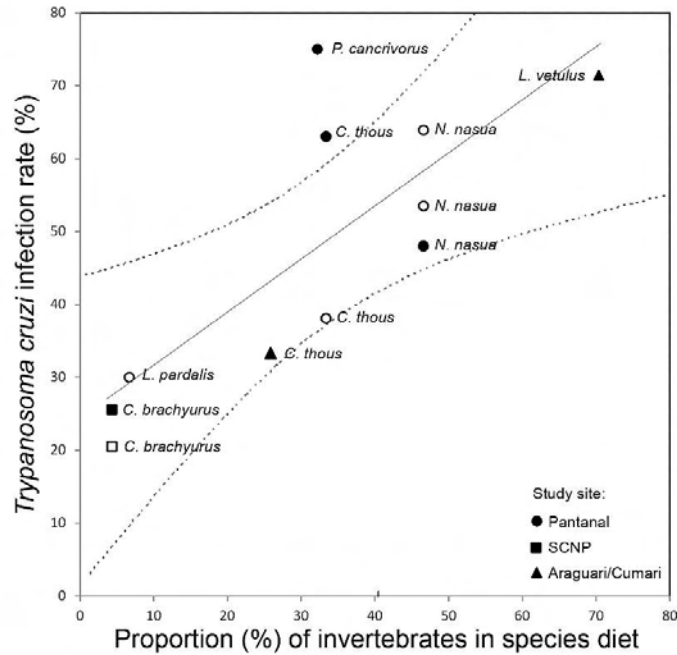


Figure 3. *Trypanosoma cruzi* infection in Neotropical wild carnivores and the proportion of invertebrates in species' diet. Infection rate (total examined/total positive*100) was determined by IFAT - Indirect Immunofluorescent Antibody Test. Studies sites were Pantanal – Mato Grosso do Sul State, Araguari - Minas Gerais State/Cumari – Goiás State and Serra da Canastra National Park (SCNP) – Minas Gerais State, Brazil. The data set included samples collected on this study (filled symbols) and from the same studies sites previously published by our group. Species' diets were retrieved from the literature (Table S1). The fitted linear regression (F(1,9): 14.9; $r^2 = 0.62$, $p = 0.004$) is represented by the solid line ($y = 0.73x + 24$). Dashed lines indicate the confidence intervals at 95%.

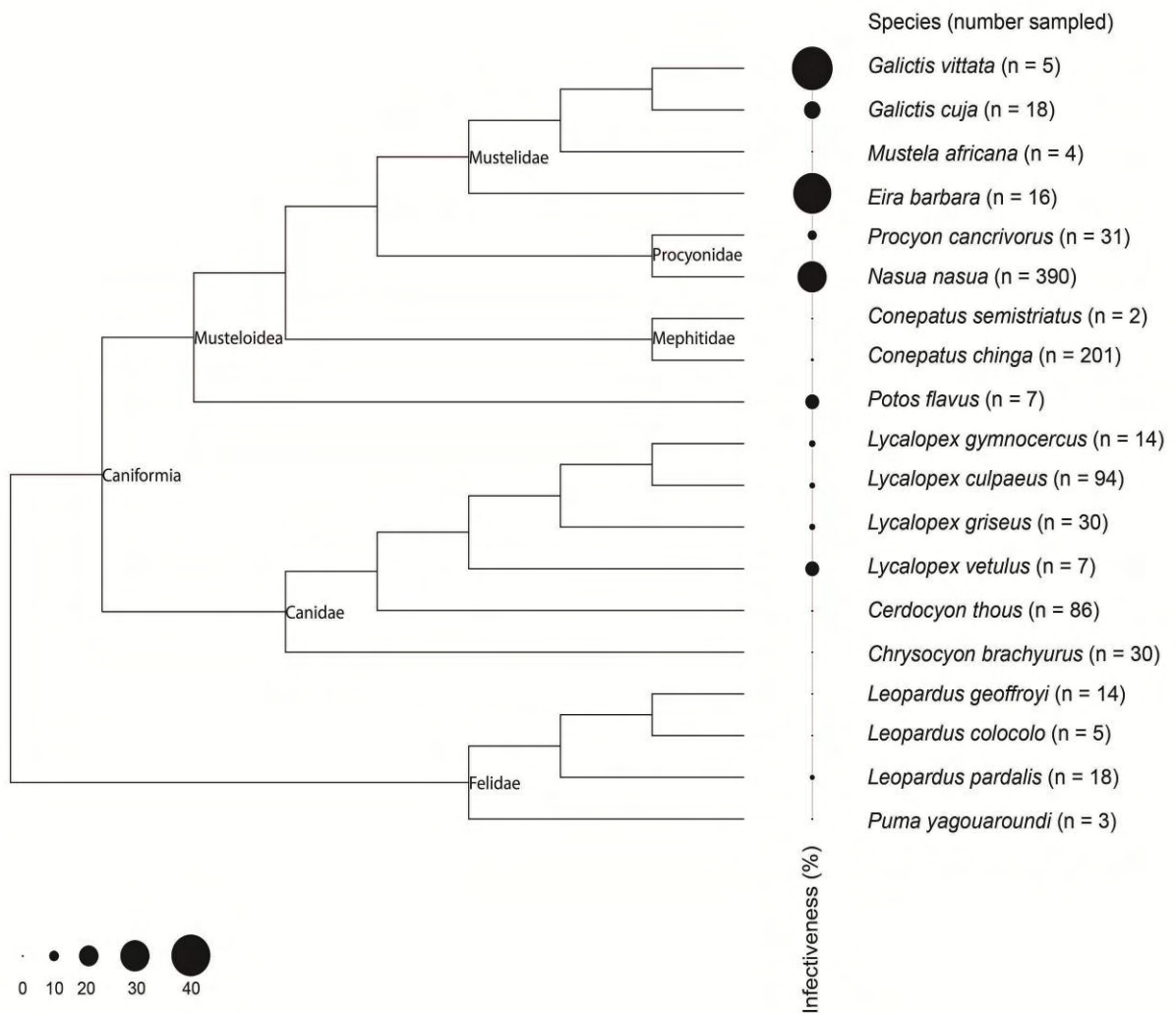


Figure 4. *Trypanosoma cruzi* infectiveness rates in Neotropical carnivore species at the tips of their phylogeny. The size of circles denotes the infectiveness rates (%), which were determined as the total positive/total examined*100 in hemoculture or xenodiagnosis tests. Phylogenetic topology of Agnarsson et al. [36].

Table 1. *Trypanosoma cruzi* infection assessment of wild carnivores from three study sites in Brazil and ecological data.

Family	Species (common name)	Sex F/M	<i>T. cruzi</i> infection				Ecological data						
			<u>Serology (IFAT)</u>		<u>Hemoculture</u>		Diet	PM (%)	PI (%)	Activity	Strata	Habitat type	Ecological data references ^c
P/T (%) ^a	F/M ^b	P/T ^a (%)	F/M ^b										
STUDY SITE: PANTANAL													
Canidae	<i>Cerdocyon thous</i> (crab-eating fox)	14/16	19/30 (63)	9/10	0/30 (0)	-	C/F/I	32.8	33.4	C_N	T	Scrub/ Savanna	[52]
Felidae	<i>Leopardus pardalis</i> (Ocelot)	2/0	2/2 (100)	2/0	0/2 (0)	-	C	93.5	6.7	N	T	Forest	[52]
Procyonidae	<i>Nasua nasua</i> (ring-tailed coati)	26/40	21/44 (48)	10/11	19/66 (29)	6/13	C/F/I	14.3	46.6	D	T/S	Scrub/ Forest	[52]
Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i> (crab-eating raccoon)	6/7	9/12 (75)	4/5	2/13 (15)	1/1	C/F/I	3.8	41.7	N_C	T	Grassland /Forest	[65]
STUDY SITE: SERRA DA CANASTRA NATIONAL PARK													
Canidae	<i>Chrysocyon brachyurus</i> (maned wolf)	24/19	11/43 (26)	7/4	-	-	C/F	24.4	4.3	C_N	T	Grassland	[66], [67]
STUDY SITE: ARAGUARI/CUMARI													
Canidae	<i>Cerdocyon thous</i>	13/14	9/27 (33)	5/4	-	-	C/F/I	17.5	25.9	C_N	T	Scrub/ Savanna	[67], [28]
Canidae	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	2/2	0/4 (0)	0/0	-	-	C/F	24.4	4.3	C_N	T	Grassland	[66], [67]
Canidae	<i>Lycalopex vetulus</i> (hoary fox)	10/11	15/21 (71)	8/7	-	-	C/F/I	5.5	70.4	N	T	Grassland	[67], [28]
Felidae	<i>Puma concolor</i> (puma)	0/2	2/2 (100)	0/2	-	-	C	80	-	N	T	Scrub/ Savanna	[68], [69]

Footnotes:

IFAT - Indirect Immunofluorescent Antibody Test

^a Positive/Total number of examined (% positive)

^b Positive female/male

Species diet (C - carnivorous; F-frugivorous; I-insectivorous; PM proportion of mammals; PI proportion of invertebrates)

Activity (C crepuscular, N nocturnal, D diurnal), strata occurrence (T, terrestrial; S scansorial)

^c The ecological data was retrieved from the literature.

Table 2. Neotropical wild carnivores infected by *Trypanosoma cruzi* from this study (in bold) and literature records.

Species ^a	Serological P/T (%) ^b	Parasitological P/T (%) ^b	Lineage (DTU) ^c	State/Country [references]
FAMILY CANIDAE				
<i>Cerdocyon thous</i>	9/27 (33)	-	-	Goiás-Minas Gerais/BR
<i>Cerdocyon thous</i>	18/30 (60)	0/30 (0)	-	Mato Grosso do Sul/BR
<i>Cerdocyon thous</i>	16/42 (38)	0/42 (0)	-	Mato Grosso do Sul/BR [14]
<i>Cerdocyon thous</i>	4/8 (50)	0/3 (0)	-	Minas Gerais/BR [15]
<i>Cerdocyon thous</i>	-	1/5 (20)	-	São Paulo/BR [70]
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	11/43 (26)	-	-	Minas Gerais/BR
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	8/39 (21)	0/30 (0)	-	Minas Gerais/BR [15]
<i>Lycalopex culpaeus</i>	-	4/77 (5)	-	CL [71]
<i>Lycalopex culpaeus</i>	-	1/15 (7)	-	Freirina/CL [72]
<i>Lycalopex culpaeus</i>	-	1/2 (50)	-	Jujuy/AR [73]
<i>Lycalopex griseus</i>	-	2/29 (7)	-	Freirina/CL [72]
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	-	1/1	-	Salta/AR [73]
<i>Lycalopex vetulus</i>	15/21 (71)	-	-	Goiás-Minas Gerais/BR
<i>Lycalopex vetulus</i>	-	1/1	-	São Paulo/ BR [59]
FAMILY FELIDAE				
<i>Leopardus pardalis</i>	2/2 (100)	0/2 (0)	-	Mato Grosso do Sul/BR
<i>Leopardus pardalis</i>	3/10 (30)	0/3 (0)	-	Mato Grosso do Sul/BR [14]
<i>Leopardus pardalis</i>	1/1	1/1	TcI	Minas Gerais/BR [15]
<i>Puma concolor</i>	2/2 (100)	-	-	Goiás-Minas Gerais/BR
FAMILY MEPHITIDAE				
<i>Conepatus chinga</i>	-	1/15 (6.6)	TcIII ^{c1}	Santiago del Estero/AR [74]
<i>Conepatus chinga</i>	-	1/91 (1.1)	TcIII ^{c1}	Santiago del Estero/AR [75]
<i>Conepatus chinga</i>	-	2/36 (5.5)	-	Santiago del Estero/AR [76]
<i>Conepatus chinga</i>	-	2/49 (4.1)	-	Santiago del Estero/AR [77]
FAMILY MUSTELIDAE				
<i>Eira barbara</i>	-	1/5 (20)	-	São Paulo/BR [78]
<i>Eira barbara</i>	-	1/2 (50)	-	Mato Grosso/BR [79]
<i>Eira barbara</i>	-	2/4 (50)	-	Pará/BR [80]
<i>Eira barbara</i>	-	1/4 (25)	-	Pará/BR [81]
<i>Eira barbara</i>	-	1/1	-	Jujuy/AR [73]
<i>Galictis cuja</i>	-	1/1	-	Santiago del Estero/AR [76]
<i>Galictis cuja</i>	-	2/14 (14)	-	São Paulo/BR [82]
<i>Galictis vittata</i>	-	1/1	-	São Paulo/BR [83]
<i>Galictis vittata</i>	-	1/1	TcII/TcV/TcVI ^{c2} and TcIII/IV ^{c3}	Rio de Janeiro/BR [84]

Species ^a	Serological P/T (%) ^b	Parasitological P/T (%) ^b	Lineage (DTU) ^c	State/Country [references]
FAMILY PROCYONIDAE				
<i>Nasua nasua</i>	21/44 (48)	19/66 (29)	TcI, TcII, TcIII/TcIV	Mato Grosso do Sul/BR
<i>Nasua nasua</i>	75/140 (54)	53/140 (38)	TcI and TcII/TcV/TcVI ^{c2}	Mato Grosso do Sul/BR [45]
<i>Nasua nasua</i>	101/158 (64)	33/158 (21)	TcI and TcII/TcV/TcVI ^{c2} and TcIII/TcIV ^{c3}	Mato Grosso do Sul/BR [44]
<i>Nasua nasua</i>	-	7/18 (39)	TcIII/TcIV ^{c3}	Pará/ BR [85] [86]
<i>Nasua nasua</i>	-	1/5 (20)	-	São Paulo/BR [87]
<i>Potus flavus</i>	-	1/2 (50)	TcI	Bajo Colima/CO [34,88]
<i>Procyon cancrivorus</i>	9/12 (75)	2/13 (15)	TcI	Mato Grosso do Sul/BR
<i>Procyon cancrivorus</i>	-	1/4 (25)	-	São Paulo/BR [89]

Footnotes:

(-) Not available

Serological test: IFAT - Indirect Immunofluorescent Antibody Test

Parasitological tests: Hemoculture, xenodiagnosis or fresh blood examination

^a We adopted Wilson & Reeder [90] for taxonomic reference; thus, host species names reported in this table not always correspond to the original paper.

^b Positive/Total number of examined (% positive)

Countries: AR – Argentine, BR – Brazil, CL – Chile, CO – Colombia

^c Current nomenclatural consensus as Discrete Typing Units (DTU) following Zingales et al. [7]. Original classification and equivalence to currently grouping scheme. ^{c1}TcIIc = TcIII; ^{c2} TcII (Miniexon gene) = TcII/TcV/TcVI, ^{c3} Z3 = TcIII/TcIV.

Supporting Information

Table S1. *Trypanosoma cruzi* infection rates in Brazil and species diet.

Species	<i>T. cruzi</i> infection P/N (%) ¹	Species diet ²		Study site	References	
		PM (%)	PI (%)		<i>T. cruzi</i> infection	Diet
<i>Cerdocyon thous</i>	9/27 (33)	17.5	25.9	Araguari	this study	Lemos et al 2011
<i>Cerdocyon thous</i>	19/30 (60)	6.4	33.4	Pantanal	this study	Bianchi 2009
<i>Cerdocyon thous</i>	16/42 (38)	6.4	33.4	Pantanal	Herrera et al 2011	Bianchi 2009
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	8/39 (21)	24.4	4.3	Canastra	Rocha et al 2012	Queirolo 2007
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	11/43 (26)	24.4	4.3	Canastra	this study	Queirolo 2007
<i>Leopardus pardalis</i>	3/10 (30)	46.4	6.7	Pantanal	Herrera et al 2011	Bianchi 2009
<i>Lycalopex vetulus</i>	15/21 (71)	5.5	70.4	Araguari	this study	Lemos et al 2011
<i>Nasua nasua</i>	21/44 (48)	1.5	46.6	Pantanal	this study	Bianchi 2009
<i>Nasua nasua</i>	101/158 (64)	1.5	46.6	Pantanal	Herrera et al. 2008	Bianchi 2009
<i>Nasua nasua</i>	75/140 (54)	1.5	46.6	Pantanal	Alves et al 2011	Bianchi 2009
<i>Procyon cancrivorus</i>	9/12 (75)	3.3	32.2	Pantanal	this study	Gatti 2006

Footnotes:

¹ *T. cruzi* infection based on Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT): Positive/Total number of examined (% positive)

² Species diet: PM – proportion of mammals; PI – proportion of invertebrates

References - Table S1

- Alves FM, Olifiers N, Bianchi RC, Duarte AC, Cotias PM, D'Andrea PS, Gompper ME, Mourao GM, Herrera HM, Jansen AM (2011) Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 835-841.
- Bianchi, R. C. (2009) Ecologia de mesocarnívoros em uma área no Pantanal Central, Mato Grosso do Sul. [Phd thesis]. Corumbá: Federal University of Mato Grosso do Sul. 193 p. Available: <http://www.cpap.embrapa.br/teses/online/TSE44.pdf>.
- Gatti A, Bianchi R, Rosa CRX, Mendes SL (2006) Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 22: 227–30.
- Herrera HM, Rocha FL, Lisboa CV, Rademaker V, Mourao GM, Jansen AM (2011) Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 380-387.
- Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourao GM, Jansen AM (2008) The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 1133-1139.
- Lemos FG, Facure KG, Azevedo FC (2011) A first approach to the comparative ecology of the hoary fox and the crab-eating fox in a fragmented human altered landscape in the Cerrado Biome at Central Brazil. In: Rosalino LM, Gheler-Costa C, editors. *Middle-sized carnivores in agricultural landscapes*. New York: Nova Sciences Publishers. pp. 143-160.
- Queirolo D, Motta-Junior JC (2007) Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. *Acta Theriologica* 52: 391-402.
- Rocha FL, Roque AL, Arrais RC, Santos JP, Lima VD, Xavier SC, Cordeir-Estrela P, D'Andrea PS, Jansen AM (2012) *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology*. Doi: 10.1017/S0031182012001539.

Table S2. *Trypanosoma cruzi* infectiveness rates (%) of Neotropical wild carnivores from this study and literature records. Infectiveness rate (INF) for each species based on parasitological tests (hemoculture, xenodiagnosis or fresh blood examination) was calculated by total positive/total examined*100.

Species ^a	N	POS	NEG	(%)	Site	Country	Reference
Family CANIDAE							
<i>Cerdocyon thous</i>	30	0	30	0	Pantanal	Brazil	this study
<i>Cerdocyon thous</i>	3	0	3	0	Canastra	Brazil	Rocha et al. 2012
<i>Cerdocyon thous</i>	42	0	42	0	Pantanal	Brazil	Herrera et al. 2011
<i>Cerdocyon thous</i>	1	0	1	0	Corrientes	Argentina	Bar et al. 1999
<i>Cerdocyon thous</i>	5	0	5	0	Pará	Brazil	Lainson et al. 1979
<i>Cerdocyon thous</i>	5	1	4	20	São Paulo	Brazil	Albuquerque & Barretto 1968
INF <i>Cerdocyon thous</i>	86	1		1.2			
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	30	0	30	0	Canastra	Brazil	Rocha et al. 2012
INF <i>Chrysocyon brachyurus</i>	30	0		0			
<i>Lycalopex culpaeus</i>	77	4	77	5	-	Chile	Neghme & Schenone 1962
<i>Lycalopex culpaeus</i>	15	1	14	7	Freirinha	Chile	Whiting 1946
<i>Lycalopex culpaeus</i>	2	1	1	50	Jujuy	Argentina	Mazza 1940
INF <i>Lycalopex culpaeus</i>	94	6		6.4			
<i>Lycalopex griseus</i>	1	0	1	0	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
<i>Lycalopex griseus</i>	29	2	27	7	Freirinha	Chile	Whiting 1946
INF <i>Lycalopex griseus</i>	30	2		6.7			
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1	0	1	0	Santiago del Estero	Argentina	Cardinal et al. 2008
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	5	0	5	0	Santiago del Estero	Argentina	Ceballos et al. 2006
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	3	0	3	0	Corrientes	Argentina	Bar et al. 1999
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1	0	1	0	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	3	0	3	0	Jujuy	Argentina	Schweigmann et al. 1992
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	1	1	0	100	Salta	Argentina	Mazza 1940
INF <i>Lycalopex gymnocercus</i>	14	1		7.1			

Species ^a	N	POS	NEG	(%)	Site	Country	Reference
Family CANIDAE							
<i>Lycalopex vetulus</i>	6	0	6	0	Canastra	Brazil	Rocha et al. 2012
<i>Lycalopex vetulus</i>	1	1	0	100	Franca	Brazil	Albuquerque & Barretto 1970
INF <i>Lycalopex vetulus</i>	7	1		14.3			
Family FELIDAE							
<i>Leopardus colocolo</i>	5	0	5	0	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
INF <i>Leopardus colocolo</i>	5	0		0			
<i>Leopardus geoffroyi</i>	2	0	2	0	Chaco Province	Argentina	Alvarado-Otegui et al. 2012
<i>Leopardus geoffroyi</i>	1	0	1	0	Chaco Province	Argentina	Diosque et al. 2004
<i>Leopardus geoffroyi</i>	4	0	4	0	Jujuy	Argentina	Schweigmann et al. 1992
<i>Leopardus geoffroyi</i>	7	0	7	0	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
INF <i>Leopardus geoffroyi</i>	14	0		0			
<i>Leopardus pardalis</i>	2	0	2	0	Pantanal	Brazil	this study
<i>Leopardus pardalis</i>	1	1	0	100	Canastra	Brazil	Rocha et al. 2012
<i>Leopardus pardalis</i>	10	0	3	0	Pantanal	Brazil	Herrera et al. 2011
<i>Leopardus pardalis</i>	5	0	5	0	Pará	Brazil	Deane 1961
INF <i>Leopardus pardalis</i>	18	1		5.6			
<i>Puma yagouaroundi</i>	3	0	3	0	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
INF <i>Puma yagouaroundi</i>	3	0		0			
Family MEPHITIDAE							
<i>Conepatus chinga</i>	15	1	14	7	Santiago del Estero	Argentina	Cardinal et al. 2008
<i>Conepatus chinga</i>	91	1	91	1	Santiago del Estero	Argentina	Ceballos, et al. 2006
<i>Conepatus chinga</i>	1	0	1	0		Paraguay	Yeo et al. 2005
<i>Conepatus chinga</i>	6	0	6	0	Chaco Province	Argentina	Diosque et al. 2004
<i>Conepatus chinga</i>	36	2	34	6	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
<i>Conepatus chinga</i>	49	2	47	4	Santiago del Estero	Argentina	Pietrokovsky et al. 1991
<i>Conepatus chinga</i>	3	0	3	0	Til-til	Chile	Whiting 1946
INF <i>Conepatus chinga</i>	201	6		3.0			

Species ^a	N	POS	NEG	(%)	Site	Country	Reference
Family MEPHITIDAE							
<i>Conepatus semistriatus</i>	2	0	2	0	Canastra	Brazil	Rocha et al. 2012
INF <i>Conepatus semistriatus</i>	2	0		0			
Family MUSTELIDAE							
<i>Eira barbara</i>	5	1	4	20	São Paulo	Brazil	Barretto & Ribeiro 1972
<i>Eira barbara</i>	2	1	1	50	Mato Grosso	Brazil	Deane 1964
<i>Eira barbara</i>	4	2	2	50	Pará	Brazil	Deane 1961
<i>Eira barbara</i>	4	1	4	25	Pará	Brazil	Rodrigues & Melo 1942
<i>Eira barbara</i>	1	1	0	100	Jujuy	Argentina	Mazza 1940
INF <i>Eira barbara</i>	16	6		37.5			
<i>Galictis cuja</i>	1	0	1	0	Corrientes	Argentina	Bar et al. 1999
<i>Galictis cuja</i>	2	0	2	0	Jujuy	Argentina	Schweigmann et al. 1992
<i>Galictis cuja</i>	1	1	0	100	Santiago del Estero	Argentina	Wisnivesky-Colli et al 1992
<i>Galictis cuja</i>	14	2	12	14	São Paulo	Brazil	Ferriolli & Barretto 1969
INF <i>Galictis cuja</i>	18	3		16.7			
<i>Galictis vittata</i>	1	1	0	100	Sumidouro/RJ	Brazil	Lisboa et al. 2009
<i>Galictis vittata</i>	1	1	0	100	São Paulo	Brazil	Barretto & Albuquerque 1971
<i>Galictis vittata</i>	3	0	3	0	Pará	Brazil	Deane 1961
INF <i>Galictis vittata</i>	5	2		40			
<i>Mustela Africana</i>	4	0	4	0	Pará	Brazil	Deane 1961
INF <i>Mustela Africana</i>	4	0		0			
Family PROCYONIDAE							
<i>Nasua nasua</i>	66	19	49	29	Pantanal	Brazil	this study
<i>Nasua nasua</i>	140	53	87	38	Pantanal	Brazil	Alves et al. 2011
<i>Nasua nasua</i>	158	33	125	21	Pantanal	Brazil	Herrera et al. 2008
<i>Nasua nasua</i>	18	7	11	39	Pará	Brazil	Lainson et al. 1979
<i>Nasua nasua</i>	5	1	0	20	São Paulo	Brazil	Ferriolli & Barretto 1968
<i>Nasua nasua</i>	2	0	2	0	Pará	Brazil	Deane 1961

Species ^a	N	POS	NEG	(%)	Site	Country	Reference
Family PROCYONIDAE							
<i>Nasua nasua</i>	2	0	2	0	Pará	Brazil	Rodrigues & Melo 1942
INF <i>Nasua nasua</i>	391	113		28.9			
<i>Potos flavus</i>	2	1	0	50	Bajo Colima	Colombia	Travi et al. 1994
<i>Potos flavus</i>	2	0	2	0		Guiana Francesa	Deurere et al. 2001
<i>Potos flavus</i>	1	0	1	0	Pará	Brazil	Lainson et al. 1979
<i>Potos flavus</i>	2	0	2	0	Pará	Brazil	Rodrigues & Melo 1942
INF <i>Potos flavus</i>	7	1		14.3			
<i>Procyon cancrivorus</i>	13	2	11	15	Pantanal	Brazil	this study
<i>Procyon cancrivorus</i>	2	0	2	0	Chaco Province	Argentina	Alvarado-Otegui et al. 2012
<i>Procyon cancrivorus</i>	4	1	3	25	São Paulo	Brazil	Barretto & Ferriolli 1970
<i>Procyon cancrivorus</i>	12	0	12	0	Pará	Brazil	Deane 1961
INF <i>Procyon cancrivorus</i>	31	3		9.7			

Footnote:

^a We adopted Wilson & Reeder (2005) for taxonomic reference; thus, host species names reported in this table not always correspond to the original paper.

References Table S2

- Albuquerque RD, Barretto MP (1968) Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*." XXX: natural infection of the bush dog, "*Cerdocyon thous azarae*" (Wied, 1824) by "*T. cruzi*". Rev Bras Biol 28: 457-468.
- Albuquerque RD, Barretto MP (1970) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLIV. Natural infection of the field fox, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (Lung, 1842) by *T. cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 12: 375-382.
- Alvarado-Otegui JA, Ceballos LA, Orozco MM, Enriquez GF, Cardinal MV, Cura C, Schijman AG, Kitron U, Gurtler RE (2012) The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. Acta Trop 124: 79-86.
- Alves FM, Olifiers N, Bianchi RC, Duarte AC, Cotias PM, D'Andrea PS, Gompper ME, Mourao GM, Herrera HM, Jansen AM (2011) Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging Coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. Vector Borne Zoonotic Dis 11: 835-841.
- Bar ME, Alvarez BM, Oscherov EB, Damborsky MP, Jorg ME (1999) Contribución al conocimiento de los reservorios del *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) en la Provincia de Corrientes, Argentina. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32(3): 271-276.
- Barretto MP, Albuquerque RD (1971) Studies on reservoirs and wild vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLVII. Natural infection of the mustelid, *Galictis vittata braziliensis* (Thunberg, 1820) by *T. cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 13: 346-351.
- Barretto MP, Ferriolli FF (1970) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXIX: Natural infection of *Procyon cancrivorus nigripes* Mivart, 1885, by *T. cruzi*. Rev Bras Biol 30: 431-438.
- Barretto MP, Ribeiro RD (1972) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LI. Natural infection of the mustelid, *Eira barbara barbara* (Lin., 1758) by *T. cruzi*. Rev Bras Biol 32: 413-418.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gurtler RE, Schijman AG (2008) Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Int J Parasitol 38: 1533-1543.

- Ceballos LA, Cardinal MV, Vazquez-Prokopec GM, Lauricella MA, Orozco MM, Cortinas R, Schijman AG, Levin MJ, Kitron U, Gurtler RE (2006) Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Trop* 98: 286-296.
- Deane LM (1961) Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. I – Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 3: 15-28.
- Deane LM (1964) Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 16: 27-48.
- Dereure J, Barnabé C, Vié JC, Madélenat F, Raccurt C. (2001) Trypanosomatidae from wild mammals in the neotropical rainforest of French Guiana. *Annals of tropical medicine and parasitology* 95(2):157–66.
- Diosque P, Padilla AM, Cimino RO, Cardozo RM, Negrette OS, Marco JD, et al. (2004) Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *Amer J Trop Med Hyg* 71(5): 590-593.
- Ferriolli FF, Barretto MP (1968) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXIX. Natural infection of *Nasua nasua* solitaria Schinz 1821 by *T. cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 10: 354-363.
- Ferriolli FF, Barretto MP (1969) Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXV. Natural infection of the ferret *Galictis cuja furax* (Thomas, 1907) by *T. cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 11: 264-273.
- Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourao GM, Jansen AM (2008) The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 1133-1139.
- Herrera HM, Rocha FL, Lisboa CV, Rademaker V, Mourao GM, Jansen AM (2011) Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 380-387.
- Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC (1979) Chagas's Disease in the Amazon Basin: 1. *Trypanosoma cruzi* infections in sylvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Para, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 193-204.

- Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM (2009) The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol* 165: 19-24.
- Mazza S (1940) Otros mamíferos infectados naturalmente por *Schizotrypanum cruzi*, o *cruzi* similares en provincias de Jujuy y Salta. *Misión de estudios de Patología Regional Argentina - M.E.P.R.A.* 119-34.
- Neghme A, Schenone H (1962) Enfermedad de Chagas en Chile: veinte años de investigación. *Ann Congr Int Doença de Chagas* 3: 1069-1105.
- Pietrokovsky SM, Schweigmann NJ, Riarte A, Alberti A, Conti O, Montoya S, Wisnivesky-Colli C (1991) The skunk *Conepatus chinga* as new host of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *J Parasitol* 77: 643-645.
- Rocha FL, Roque AL, Arrais RC, Santos JP, Lima VD, Xavier SC, Cordeir-Estrela P, D'Andrea PS, Jansen AM (2012) *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII transmission among wild carnivores, small mammals and dogs in a conservation unit and surrounding areas, Brazil. *Parasitology*. Doi: 10.1017/S0031182012001539.
- Rodrigues BA, Melo GB. (1942) Contribuição ao estudo da Tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 37(1):77-93.
- Schweigmann NJ, Alberti A, Pietrokovsky SM, Conti O, Montoya S, Wisnivesky-Colli C (1992) A new host of *Trypanosoma cruzi* from Jujuy, Argentina: *Octodontomys gliroides* (Gervais & D'orbigny, 1844) (Rodentia, Octodontidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87(2): 217-20.
- Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, Velez ID (1994) *Didelphis Marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Amer J Trop Med Hyg* 50: 557-565.
- Whiting C (1946) Contribución al estudio de las reservas de parasitos de la enfermedad de Chagas en Chile. *Primeiros hallazgos en Chile de mamiferos silvestres infestados por Trypanosoma cruzi.* *Rev Chil Hig Med Prev* 8: 69-100.
- Wilson DE, Reeder DM(editors) (2005) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference.* Johns Hopkins University Press. 2142 p.

Wisnivesky-Colli C, Schweigmann NJ, Alberti A, Pietrokovsky SM, Conti O, Montoya S, Riarte A, Rivas C (1992) Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 38-41.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GA, Lopez E, Gonzalez N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA (2005) Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 35: 225-233.

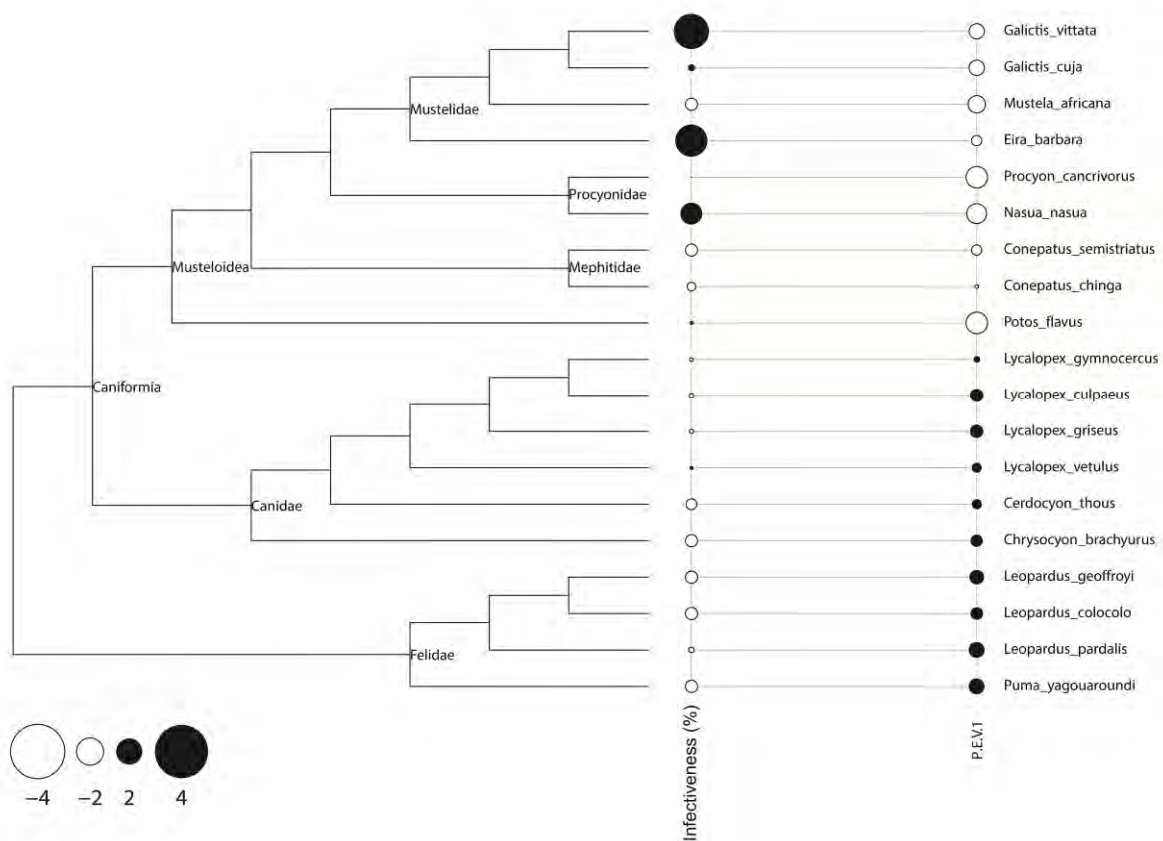


Figure S3. *Trypanosoma cruzi* infectiveness rates (%) of each species at the tips of the phylogeny and values on the phylogenetic eigenvector 1 (P.E.V. 1) from Agnarsson et al. (2010). Infectiveness rates were determined as the total positive/total examined*100 in hemoculture or xenodiagnosis tests. Values are scales and normalized around 0 to have a comparable scale.

Discussão geral

A presente tese foca no papel dos carnívoros silvestres (ordem Carnivora) nos ciclos de transmissão de *Trypanosoma cruzi*, um parasito capaz de infectar centenas de espécies de mamíferos e dezenas de espécies de triatomíneos, e de ser transmitido diretamente através da via oral. Essa via é provavelmente o mecanismo mais eficiente de transmissão de *T. cruzi* na natureza. Carnívoros silvestres apresentam uma alta diversidade ecológica e ocupam praticamente todos os tipos de habitat e estratos florestais. Apesar de possuírem adaptações especiais para predação, as espécies dessa ordem são diversas inclusive na sua ecologia alimentar, que pode variar desde espécies com dieta majoritariamente insetívora, frugívora, onívora ou exclusivamente carnívora. Levando em consideração a eficiência da via oral na infecção por *T. cruzi*, carnívoros apresentam grande potencial de estarem expostos a este parasito, visto que predam espécies de diversos taxa e transitam por grandes áreas em distintos estratos florestais, favorecendo o contato com os diferentes componentes das redes de transmissão de *T. cruzi*. Ainda, nossa hipótese inicial é que eles poderiam ocupar uma posição única como bioacumuladores dos distintos genótipos deste parasito. Nos artigos que compõem essa tese, consideramos o perfil da infecção, as características ecológicas dos hospedeiros, bem como as suas interações com outras espécies na rede trófica para compor o cenário no qual os carnívoros silvestres se inserem nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*.

O primeiro objetivo desse estudo foi avaliar a transmissão de *T. cruzi* e distribuição de seus genótipos em espécies de hospedeiros que ocupam diferentes níveis da rede trófica e quais os fatores que modulam seus ciclos de transmissão num sistema ecológico natural, no caso o Pantanal. O Pantanal é uma planície alagável reconhecida pela sua fauna abundante e diversa que ainda é considerado em estado relativamente intocado, dada à baixa densidade populacional humana e práticas de criação extensiva de gado que tem menor impacto nesse ecossistema, sendo assim, um local onde seria possível examinar elementos de diferentes níveis da rede trófica. Para tanto, avaliamos a infecção por *T. cruzi* em seis ordens de mamíferos silvestres (Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Cingulata, Didelphimorphia e Rodentia), além de cães domésticos e porcos ferais ao longo de sete anos de estudo na sub-região da Nhecolândia, Pantanal sul-matogrossense. Estudos longitudinais em animais de vida livre são raros, principalmente aqueles que incluem uma ampla diversidade de espécies, pois requerem técnicas, equipamentos, mão-de-obra e logística distintos para amostragem de cada grupo, especialmente estudos de carnívoros, que demandam técnicas especializadas de captura e geralmente tem um alto custo financeiro. Nesse primeiro artigo,

incluímos também *Trypanosoma evansi*, outro tripanosomatídeo multi-hospedeiro, por ser muito prevalente na área de estudo e ocorrer em coinfeção com *T. cruzi*.

Na rede trófica do Pantanal, cada espécie de mamífero desempenhou um papel distinto nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* e *T. evansi*. Um carnívoro, o quati (*Nasua nasua*), foi o principal reservatório tanto de *T. cruzi* quanto de *T. evansi*, por sua alta densidade (Desbiez *et al.* 2010) e alto potencial de infectividade aos vetores. Entre as demais espécies de carnívoros examinados, o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) demonstraram estar envolvidos na manutenção de *T. cruzi* e secundariamente na dispersão de *T. evansi*, em contraste com os cães domésticos (*Canis familiaris*), que tiveram participação somente na dispersão de *T. evansi*. Morcegos foram considerados marginalmente importantes na dispersão de *T. cruzi* e mantenedores de *T. evansi*, bem como os tatus. Um papel inverso aos morcegos foi observado nos porcos, importantes na dispersão de *T. evansi* e mantenedores de *T. cruzi*. Entre os pequenos mamíferos, os roedores tiveram pouca participação nos ciclos de *T. cruzi* e *T. evansi*, enquanto os marsupiais apresentaram alta prevalência de hemocultivos positivos de *T. cruzi*, contudo, dada sua baixa abundância relativa, foram considerados nesse estudo como marginalmente importantes na dispersão deste parasito e mantenedores de *T. evansi*. Interessante ressaltar que encontramos um ciclo de transmissão de *T. cruzi* estável e robusto no Pantanal, mesmo na ausência de *Didelphis spp.*, geralmente considerado como o principal reservatório do parasito. Isso reforça a característica dinâmica, temporal e espacial dos ciclos de transmissão de *T. cruzi*, que devem ser examinados como um sistema ecológico único.

Nossos resultados apontam que as prevalências de *T. cruzi* e *T. evansi* nas diferentes ordens estudadas refletiram a ecologia dos hospedeiros: os roedores *Oecomys marmorae* e *Cerradomys scotti*, por exemplo, espécies típicas de habitats fechados, apresentaram maior prevalência de infecção por *T. cruzi*, enquanto roedores capturados em áreas abertas, como o *Thrichomys pachyurus*, apresentaram maior prevalência de infecção por *T. evansi* (Herrera *et al.* 2007, Herrera *et al.* 2011). Por outro lado, o quati (*Nasua nasua*), um carnívoro que frequenta tanto habitats abertos quanto florestados (Rocha 2006, Desbiez & Borges 2010), apresentou alta prevalência de infecção por ambos *T. cruzi* e *T. evansi*. Isso provavelmente se deve à ecologia dos vetores: o tabanídeo mais abundante da área, *Tabanus importunus*, vetor de *T. evansi*, é mais frequente em habitats abertos (Barros 2001), enquanto alguns dos gêneros de triatomíneos vetores de *T. cruzi* registrados na área (*Triatoma* e *Rhodnius*) são encontrados preferencialmente em áreas de mata (Gaunt & Miles 2000). Assim, *T. cruzi* e *T. evansi* parecem serem transmitidos em ambientes distintos, de forma que cada tipo de habitat representa uma unidade epidemiológica, com diferentes

composições de hospedeiros e vetores envolvidos em ciclos de transmissão que podem ser independentes ou sobrepostos.

Nesta rede trófica, detectamos três genótipos de *T. cruzi* em diferentes espécies de hospedeiros. Neste primeiro trabalho utilizamos o gene do Miniexon para caracterização molecular dos genótipos de *T. cruzi*, o qual distingue *T. cruzi* em três grupos: TcI, TcII (atualmente TcII/TcV/TcVI) e Z3 (atualmente TcIII/TcIV) (Fernandes *et al.* 1999, Aliaga *et al.* 2011). TcI foi o genótipo mais prevalente e disperso num espectro mais amplo de espécies de hospedeiros, que inclui pequenos mamíferos, porcos e quatis. De fato, esse genótipo é considerado o mais prevalente na natureza (Zingales *et al.* 2012). TcII foi o segundo genótipo mais prevalente, porém encontrado infectando apenas quatis e duas espécies de morcegos. Z3, menos prevalente, demonstrou ser capaz de se infectar um amplo espectro de hospedeiros, tendo sido encontrado infectando quatis, morcegos e tatus.

Infecções mistas foram encontradas em espécies mais generalistas. Duas espécies de morcego, *Artibeus jamaicensis* e *Phyllostomus hastatus*, estavam infectados por TcII/Z3. O primeiro, *Artibeus jamaicensis* é uma das espécies de morcegos mais amplamente distribuídas do gênero, sendo muito eclético nos habitats que pode ocupar (Ortega & Arellano 2001). Já o *Phyllostomus hastatus* é onívoro e se alimenta de insetos e pequenos vertebrados (Santos *et al.* 2003), o que pode favorecer sua exposição a distintos ciclos de transmissão e, conseqüentemente, diferentes genótipos de *T. cruzi*. O quati foi a única espécie na qual detectamos infecções simples e mistas dos três genótipos de *T. cruzi*, sugerindo seu potencial como bioacumulador. Esse procionídeo, além de utilizar diversos tipos de habitat e, nestes, os estratos terrestres e arbóreos, tem uma dieta onívora que inclui insetos e pequenos mamíferos, favorecendo o contato com fontes de infecção dos diferentes genótipos de *T. cruzi*.

Desta forma, as características ecológicas de uma espécie, como dieta, uso de habitat e interação com outras espécies parecem ser um fator chave na dispersão dos genótipos de *T. cruzi* na natureza, visto que podem favorecer (ou não) o contato com as fontes de infecção de cada uma. Logo, o encontro de pequenos mamíferos infectados unicamente por TcI e que foram capturados simultaneamente nos mesmos fragmentos florestais que quatis com infecções mistas de TcI com TcII ou Z3, poderia ser explicado pelo fato de que pequenos mamíferos não migram muito e poderiam não entrar em contato com as fontes de infecção desses outros dois genótipos. Por outro lado, espécies de hospedeiros podem apresentar seleção por determinado genótipo de *T. cruzi* ou a infecção por esta pode causar maior taxa de mortalidade em algumas espécies (Pinho *et al.* 2000,

Lisboa *et al.* 2007, Roellig *et al.* 2010). Assim, é possível que um determinado genótipo de *T. cruzi* esteja infectando um espectro maior de espécies de hospedeiros no Pantanal, mas que os hospedeiros mamíferos amostrados nesse estudo sejam os sobreviventes, aqueles que conseguiram controlar a infecção.

O sistema reservatório de *T. cruzi* e de seus genótipos no Pantanal incluiu espécies de hospedeiros que ocupam todos os habitats e estratos florestais, de morcegos a tatus. Assim, um mamífero infectado através da predação de um triatomíneo infectado em uma toca no chão pode posteriormente ser uma fonte de infecção para outra espécie de triatomíneo em um abrigo numa árvore ou mesmo infectar outro mamífero ao ser predado. A diversidade de hospedeiros e de diferentes formas de transmissão são provavelmente os principais fatores para a bem-sucedida manutenção e dispersão deste parasito no ciclo silvestre, formando uma rede de transmissão na qual mamíferos especialistas e generalistas estão ligados, através de uma robusta rede trófica.

O conhecimento sobre o papel dos carnívoros nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* ainda é escasso e a competência de um hospedeiro como reservatório são características dinâmicas que devem ser avaliadas em intervalos determinados de tempo e espaço. Assim, para ampliar o estudo do papel dos carnívoros nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*, estendemos nossos estudos para o Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC), uma unidade de conservação no Bioma Cerrado. A escolha da área se deu também pela possibilidade de se contrastar os ciclos de transmissão em uma área preservada com as áreas alteradas do entorno do parque. Nesse segundo artigo já tínhamos as ferramentas moleculares necessárias para discriminar os genótipos de *T. cruzi* em Unidades Discretas de Tipagem (DTU's) (Zingales *et al.* 2009).

No cenário da Serra da Canastra, encontramos um ciclo de transmissão de *T. cruzi* bem estabelecido e distribuído em todas as regiões do entorno, incluindo o ambiente silvestre e o peridoméstico. Observamos que cães domésticos, pequenos mamíferos e carnívoros silvestres estavam envolvidos na transmissão de *T. cruzi*. Um achado que não deixa de ser surpreendente foi à alta prevalência de hemocultivos positivos nos cães domésticos, contrastando com nosso estudo no Pantanal (1º artigo - Herrera *et al.* 2011) e com outros estudos no Brasil (Herrera *et al.* 2005, Roque *et al.* 2008, Xavier *et al.* 2012) onde poucos ou nenhum dos cães examinados apresentou hemocultura positiva. Provavelmente, os poucos encontros de cães com parasitemias detectáveis resulta de uma particularidade da interação de *T. cruzi* com cães. Em infecções experimentais, a infecção por *T. cruzi* nestes animais geralmente se caracteriza por período de parasitemia patente de cerca de 35 dias na fase aguda, seguida de uma fase crônica com baixa recuperação de

hemoculturas positivas, mesmo em reinfecções (Machado *et al.* 2001). Isso significa que a presença de cães com hemoculturas positivas na Serra da Canastra provavelmente refletem uma fase inicial da infecção. Essa hipótese é corroborada pela presença de anticorpos da classe IgM em alguns desses cães, indicativo de infecção recente nesse cenário.

Além da presença de cães aparentemente recém-infectados, nós observamos que alguns cães soroconverteram durante o período do estudo, o que demonstra que eles estavam sendo continuamente expostos à infecção por *T. cruzi*, sinalizando áreas de transmissão ativa. Na região da Canastra os cães são criados soltos e frequentemente circulam nos fragmentos de mata ao redor das casas. A infecção nesses animais sugere que a transmissão está ocorrendo nas áreas de interface entre o ambiente doméstico e silvestre. Encontramos também cães de 3 a 6 meses infectados que ainda não saíam do entorno da casa, indicando que a infecção também ocorria no peridomicílio. A infecção em animais domésticos no peridomicílio é a última barreira que antecede a exposição do homem (Roque & Jansen 2008).

Animais sentinelas são aqueles que indicam a presença de um ciclo de transmissão na área e podem potencialmente serem utilizados para responder questões epidemiológicas (McCluskey *et al.* 2002, Halliday *et al.* 2007). A utilização de animais domésticos como sentinelas de áreas de risco de transmissão de *T. cruzi* já foi proposta em diversos países da América Latina, inclusive no Brasil (Estrada-Franco *et al.* 2006, Gurtler *et al.* 2007, Roque & Jansen 2008, Pineda *et al.* 2011, Xavier *et al.* 2012). Na Serra da Canastra, os cães demonstraram serem bons sentinelas para as áreas de transmissão. Neste cenário, em que a transmissão de *T. cruzi* já pode ser detectada inclusive no peridomicílio, a utilização de cães como animais sentinelas pode facilitar a detecção precoce e prevenção de casos humanos, de fundamental importância para o sucesso do controle desta parasitose.

Nossos resultados demonstraram que cães foram capazes de reportar não apenas as áreas de transmissão, mas também os genótipos circulantes na área. Cães estavam infectados com TcI e TcII, enquanto todos os isolados dos animais silvestres foram TcI. Essa foi a primeira descrição de isolamento e caracterização molecular de TcII em cão doméstico no Brasil. Mais do que ampliar o espectro de espécies de hospedeiros mamíferos que TcII pode infectar, esse achado traz para discussão as estratégias de dispersão de TcII, uma vez que a grande distância entre cães infectados e o fato de que as populações de vetores no peridomicílio são residuais mostra que esse genótipo não pode estar sendo mantido apenas pelos cães. Uma das possibilidades é que TcII esteja circulando em espécies não amostradas nesse trabalho, como tatus e morcegos. Ao contrário de TcI,

considerado o mais ubíquo dos genótipos de *T. cruzi*, TcII aparece geralmente em focos pontuais, exceto em micos-leão dourado (*Leonthopitecus rosalia*) provenientes da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, os quais mantêm infecções estáveis por TcII (Lisboa *et al.* 2006). Possivelmente, TcII também é disperso, mas a infecção resulta em infecções mais brandas nos animais que são capazes de manter esse genótipo e, desta forma, que seja mais difícil de ser detectado por métodos parasitológicos. Em estudo de infecção experimental no marsupial *Monodelphis domestica*, uma das espécies amostradas neste estudo, a infecção por TcI resultou em parasitemia detectável (PCR ou hemocultura) por 84 dias, enquanto na infecção por TcII a parasitemia durou 28 dias (Roellig *et al.* 2010).

Nosso grupo recentemente implementou a caracterização molecular dos genótipos de *T. cruzi* em amostras de soro de mamíferos silvestres e encontrou infecções mistas de TcI e TcII em amostras de gambás (*Didelphis albiventris*) que tinham sido previamente caracterizadas apenas como TcI no isolamento por hemocultivo (V. Lima, *dados não publicados*). Isso demonstra que, assim como observado com o genótipo TcII nos região da Canastra, ainda temos uma visão incompleta dos padrões de distribuição dos genótipos de *T. cruzi* na natureza, tão importante para se compreender a importância epidemiológica de cada genótipo. Uma ampla abordagem metodológica, que seja isenta de ideias pré-concebidas, incluindo os diversos elementos que compõem esse sistema complexo que é o ciclo de transmissão de *T. cruzi*, são a chave para a identificação dos riscos de surto da doença de Chagas.

Outro dado que destacamos deste trabalho foi o primeiro relato de isolamento e caracterização molecular de *T. cruzi* em jaguatirica. No nosso estudo no Pantanal, nenhuma das dez jaguatiricas capturadas apresentou hemocultura positiva. Isso reforça que os ciclos de transmissão e o papel de cada espécie podem ser diferentes em cada área, de modo que cada localidade deve ser analisada como um sistema ecológico único. A jaguatirica é um animal essencialmente carnívoro, de modo que a ingestão de presas infectadas provavelmente é uma de suas principais vias de infecção. No Pantanal, a prevalência de pequenos mamíferos com hemocultivos positivos foi de 5%, enquanto na região da Serra da Canastra foi o dobro (9,6%). O encontro da única jaguatirica capturada com parasitemia patente na Canastra, onde pequenos mamíferos tinham uma maior prevalência de hemocultivos, sugere que as interações tróficas entre predadores-presa podem ser um importante mecanismo de manutenção de *T. cruzi* na natureza.

Dos demais carnívoros examinados na região da Canastra, duas espécies de canídeos estavam infectadas por *T. cruzi*, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato. Ambos apresentaram alta prevalência sorológica e nenhum hemocultivo positivo. Nossa hipótese é de que o padrão de infecção por *T. cruzi* em canídeos silvestres é similar ao encontrado em cães domésticos e, portanto, com uma curta janela de transmissibilidade. Esses dois canídeos são onívoros generalistas e oportunistas e, na região da Canastra, são frequentemente encontrados circulando nas fazendas do entorno. Mesmo numa breve janela de transmissibilidade, provavelmente representada por um curto período pós-infecção, essas espécies podem atuar como dispersores de *T. cruzi* na interface entre o ambiente silvestre e o doméstico, especialmente o lobo-guará, que possui áreas de vida de cerca de 80km² (Jacomó *et al.* 2009).

Os canídeos silvestres encontrados infectados, assim como os pequenos mamíferos, podem sinalizar a presença de parasitos na área, incluindo *T. cruzi*, atuando como repórteres da dinâmica dos ciclos de transmissão na natureza e sentinelas da saúde ambiental (Aguirre 2009). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) tem recomendando fortemente a inclusão do monitoramento da fauna silvestre nos programas de vigilância sanitária e países desenvolvidos como Estados Unidos e Europa já adotaram programas especiais nesse sentido (OIE 2010). Embora a maioria dos surtos de doenças emergentes tenha sido originada de parasitos de animais selvagens (Jones *et al.* 2008), apenas recentemente foi reconhecida a importância do monitoramento dos ciclos de transmissão na fauna silvestre (Rhyan & Spraker 2010). Portanto, é surpreendente o fato de que muitos países, inclusive o Brasil, ainda não tenham desenvolvido políticas de vigilância específicas da fauna silvestre para a maioria das zoonoses emergentes e re-emergentes. No caso de *T. cruzi*, primariamente uma enzootia, o monitoramento nos animais selvagens pode trazer informações sobre fatores de risco como, por exemplo, mudanças/aumento da prevalência da infecção nos hospedeiros silvestres e zonas de risco na interface animais domésticos e silvestres. Vale ressaltar que o lobo-guará foi capaz de sinalizar áreas de transmissão de *T. cruzi* dentro e fora do PNSC e, com o estudo da infecção nessa espécie, foi possível inferir a magnitude da transmissão em cada área, neste caso, muito mais expressiva fora da unidade de conservação.

Ainda, nas duas áreas em que amostramos simultaneamente cães domésticos e pequenos mamíferos, a prevalência de hemocultivos positivos em cães domésticos foi maior na área onde havia maior prevalência de pequenos mamíferos infectados. De fato, em diversas áreas de transmissão de *T. cruzi* no Brasil, já foi observada uma correlação entre a infecção de animais silvestres e animais domésticos, incluindo áreas de surto de Doença de Chagas por via oral (Xavier *et al.* 2012), reforçando a importância do monitoramento dos ciclos de transmissão na fauna

silvestre, bem como nos animais domésticos. O perfil ecoepidemiológico que encontramos na Serra da Canastra sugere a necessidade de vigilância contínua para se prevenir a re-emergência da doença de Chagas nesta que já foi a mais intensa área de transmissão de *T. cruzi*.

Nos dois primeiros trabalhos desse estudo nós demonstramos que *T. cruzi* circulava pela rede trófica e que os carnívoros participavam nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* no Pantanal e na Serra da Canastra, mas com diferenças notáveis em cada espécie no perfil da infecção e área de estudo. A proposta do terceiro artigo foi avaliar o papel dos carnívoros nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* em um cenário mais amplo, continuando os estudos de longo-prazo no Pantanal e na Canastra e estendendo nossa amostragem para uma terceira área de estudo, na região de Araguari/Cumari. Adicionalmente, incluímos dados disponíveis na literatura sobre infecção por *T. cruzi* em carnívoros da América do Sul, para fazer uma análise geral sobre os padrões de infecção e as possíveis correlações entre as distintas espécies de carnívoros, especialmente considerando sua dieta e filogenia.

A hipótese inicial deste estudo era que quanto mais alta a posição de uma espécie na cadeia trófica, maiores seriam suas taxas de infecção por *T. cruzi*; isto porque ela poderia se expor aos diversos ciclos de transmissão do parasito ao consumir diferentes hospedeiros infectados. A posição na cadeia trófica tende a ter uma relação com o tamanho do corpo da espécie (Arim *et al.* 2010), que por sua vez está correlacionado com a longevidade de uma espécie (Bejan 2012). Assim, se o habitat do parasito é o hospedeiro, espécies maiores fornecem habitats mais “duradouros” (Poulin *et al.* 2011). Uma vez infectado por *T. cruzi*, com raras exceções, um animal não se livra da infecção e, desta forma, carnívoros de topo de cadeia alimentar teriam mais oportunidades de se infectar ao longo de sua vida longa e isso se refletiria nas suas taxas de infecção.

No Pantanal, ao longo dos dez anos de estudo na região, o quati demonstrou definitivamente ser o principal reservatório de *T. cruzi* e de ter potencial para atuar como bioacumulador e dispersor dos seus diferentes genótipos. Recentemente, nosso grupo identificou que outra característica ecológica do quati facilita a infecção por *T. cruzi*: seu comportamento exótico entre os carnívoros de construir ninhos arbóreos, como os de aves, que usa para descanso e reprodução (Olifiers *et al.* 2009). Foi investigando a ecologia dos ninhos de quatis que verificamos que 30% destes (n = 23) estavam infestados por triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius* (Lima 2003). A análise da fonte alimentar dos triatomíneos encontrados pelo teste da preceptina (metodologia descrita em Lorosa *et al.* 1998) demonstrou que estes se alimentaram de quatis, aves, roedores e marsupiais, incluindo alimentações mistas. Dos sete ninhos de quatis infestados por triatomíneos, em cinco

(71%) deles os triatomíneos foram positivos para infecção por *T. cruzi*. Nestes, a caracterização molecular indicou a presença de TcI, TcIII/TcIV e infecções mistas destes genótipos (Alves 2003). Estes resultados, aliados ao fato de que os quatis apresentaram alto potencial de infectividade aos vetores (expressa por alta prevalência de hemocultivos positivos), apontam que quatis podem atuar como um ponto de convergência e dispersão dos genótipos de *T. cruzi*, mantidos em ciclos de transmissão distintos nos mamíferos e vetores de diferentes estratos florestais e habitats.

Interessante ressaltar que a presença de ninfas de triatomíneos que se alimentaram de aves, roedores e marsupiais é uma evidência do uso dos ninhos de quati por essas espécies, visto que ninfas não migram. O uso por outras espécies dos ninhos de quatis ainda não tinha sido observado. Por um lado, o estudo da ecologia dos ninhos nos trouxe informações fundamentais para compreensão das fontes de infecção para os quatis. Por outro, conseguimos informações ecológicas sobre o uso dos ninhos de difícil obtenção por observação direta, o que demonstra claramente a importância de uma abordagem multidisciplinar em ecologia e parasitologia.

Outro achado surpreendente nos quatis foi o encontro de quatro isolados de *T. cruzi* com padrões não usuais na caracterização molecular pelo gene do Miniexon, nos quais não foi possível definir o genótipo, e onde apenas confirmamos serem *T. cruzi* através da PCR-kDNA. Mais do que limitações metodológicas, esses resultados reforçam que a diversidade de *T. cruzi* parece ser bem maior do que é atualmente reconhecido neste taxon, suposição apoiada pela recente descrição do TcBat (Marcili *et al.* 2009).

O mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), examinado no Pantanal pela primeira vez, apresentou alta prevalência sorológica e de hemocultivos positivos. Essa espécie é muito pouco estudada no Brasil, por ser dificilmente capturado em armadilhas. O método de captura eficiente para essa espécie é a procura ativa durante a noite e captura com puçá, o que requer muito tempo e esforço de campo (Cheida *et al.* 2012). O encontro de hemocultivos positivos no mão-pelada indica que, aparentemente, procionídeos de um modo geral tem potencial para infectar vetores, visto que o congênere *Procyon lotor*, bem como o quati no Pantanal, é considerado um dos principais reservatórios de *T. cruzi* em muitos estados Norte Americanos (Brown *et al.* 2010, Charles *et al.* 2012).

Observamos o mesmo cenário nas jagatiricas e cachorros-do-mato no segundo período de monitoramento no Pantanal. Ambos estavam expostos ao *T. cruzi*, como refletido por elevada soroprevalência, mas apresentaram baixo potencial infectivo para os vetores, visto que tiveram hemoculturas negativas. O cachorro-do-mato, embora seja uma espécie onívora e que explora vários tipos de habitat, tem uma capacidade muito menor de explorar micro-habitats adequados para triatomíneos do que o quati, que tem uma grande habilidade de explorar com as mãos e focinho (Desbiez & Borges 2010). Ainda, essa espécie é restrita ao ambiente terrestre. Na jagatirica, a infecção por *T. cruzi* provavelmente é dependente da infecção nas populações de presas.

Na Serra da Canastra, os oito anos de acompanhamento atestaram que *T. cruzi* é enzoótico na população de lobos-guará e que a transmissão é ativa e bem estabelecida na área. Na região de Araguari/Cumari, terceira área de estudo, os dois pumas (*Puma concolor*) examinados estavam infectados por *T. cruzi* e, até onde sabemos, esse foi o primeiro relato de infecção por *T. cruzi* nessa espécie. Mesmo espécies da mesma família e de porte similar podem ter diferentes níveis de exposição ao *T. cruzi* numa mesma área. Esse foi o caso da raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e do cachorro-do-mato, uma vez que a primeira apresentou taxas de infecção duas vezes mais altas. Cabe mencionar que esse também foi o primeiro estudo da infecção por *T. cruzi* numa população de raposas-do-campo. Ainda, outro canídeo examinado, o lobo-guará, não estava exposto ao *T. cruzi* em Araguari, como demonstrado por testes sorológicos negativos. Entre os canídeos, a raposa-do-campo parece ser a mais exposta ao contato com triatomíneos devido a suas características ecológicas. A raposa-do-campo é o único canídeo neotropical com dieta predominantemente insetívora e a única dentre os três canídeos examinados que usa tocas de tatu para abrigo e reprodução (Courtenay *et al.* 2006, Lemos *et al.* 2011), um reconhecido ecótopo para algumas espécies de triatomíneos (Gaunt & Miles 2000).

A infecção por via oral tem sido constantemente sugerida como um dos principais mecanismos de dispersão entre mamíferos e, recentemente, inclusive no homem (Roque *et al.* 2008, Shikanai-Yasuda & Carvalho 2012). Essa via deve especialmente importante nos carnívoros, visto que muitas espécies dessa ordem se alimentam de insetos e mamíferos (Gittleman & Harvey 1982), tendo assim mais chances de se infectar por *T. cruzi* através de diferentes fontes de infecção. A via contaminativa também deve ocorrer em alguns casos, como destacamos nos ninhos de quatis e, provavelmente, nas espécies de carnívoros que usam tocas regularmente, por exemplo, a raposa-do-campo e o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), ou em espécies essencialmente arborícolas, como o jupará (*Potos flavus*) que se abriga em ocos de árvores (Kays & Gittleman 2001, Courtenay *et al.* 2006, Lima *et al.* 2012). Porém, essa via deve ser menos efetiva em boa parte das espécies dessa

ordem, visto que muitas são ativas à noite e não usam tocas (Nowak 2005). Além disso, as fezes contaminadas por metacíclicos ainda teriam que ultrapassar a densa camada de pelos dos carnívoros antes de penetrar nos tecidos dos animais.

Para testar se a infecção por *T. cruzi* estava associada à dieta, nós compilamos os dados dos carnívoros que geramos nos três artigos que compõem essa tese e associamos com dados de dieta de cada espécie disponíveis na literatura levando em consideração cada área de estudo, uma vez que a dieta pode variar com a disponibilidade de itens local. O resultado dessa análise evidenciou que a infecção por *T. cruzi* estava associada à dieta, de modo que quanto maior a proporção de invertebrados na dieta, maiores as taxas de infecção por *T. cruzi*. A infecção por ingestão de triatomíneos infectados é altamente eficiente, como demonstrado experimentalmente em dois carnívoros norte-americanos, o cangambá (*Mephitis mephitis*) e o guaxinim (*Procyon lotor*) (Davis *et al.* 1980, Roellig *et al.* 2009a). A infecção por ingestão de presas infectadas também já foi demonstrada experimentalmente (Thomas *et al.* 2007) e, possivelmente, pode ser a principal via de infecção em carnívoros com dieta essencialmente carnívora.

Vimos que a composição da dieta é um dos fatores determinantes nas taxas de infecção por *T. cruzi* em carnívoros. Contudo, de fundamental importância para se determinar o papel de uma espécie nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*, é a avaliação do potencial de infectividade, que é diretamente relacionado à presença de tripomastigotas na corrente sanguínea de uma determinada espécie e, assim, disponíveis para serem transmitidas aos vetores. De acordo com as particularidades da interação parasito-hospedeiro, uma determinada espécie pode manter parasitemias maiores e mais longas que outras; o que provavelmente reflete seu potencial de infectar vetores e, portanto, de atuar como reservatório (Roellig *et al.* 2010).

Longdon e colaboradores (2011) propõem que um dos fatores que pode afetar a adaptação de um parasito a uma nova espécie de hospedeiro é a distância filogenética entre as espécies em questão. Isso porque hospedeiros mais estreitamente relacionados filogeneticamente tendem a constituir “habitats” mais semelhantes ao parasito. Desta forma, seria esperado que espécies filogeneticamente mais próximas tivessem perfis de infecção por *T. cruzi* semelhantes. Para testar essa hipótese, nós compilamos nossos resultados com dados da infecção por *T. cruzi* em carnívoros neotropicais disponíveis na literatura e avaliamos o potencial de infectividade aos vetores (expresso pela prevalência de testes parasitológicos positivos) em relação à filogenia das espécies. Nesse conjunto de dados, nós avaliamos um total de 1093 indivíduos, pertencentes a 21 espécies. Destas, 15 espécies foram encontradas naturalmente infectadas por *T. cruzi*. Os testes de associação

filogenética demonstraram que globalmente não houve associação entre o padrão de infecção por *T. cruzi* em carnívoros e a proximidade filogenética, apenas no primeiro vetor filogenético, que contrasta a superfamília Musteloidea com as famílias Canidae e Felidae. As espécies da superfamília Musteloidea, que inclui os procionídeos, mustelídeos e mephitídeos, apresentaram consistentemente testes parasitológicos positivos em diferentes estudos, demonstrando um alto potencial de infectar vetores. Uma característica comum dos membros dessa superfamília nos quais encontramos maior potencial de infectividade é que todos são carnívoros de médio e pequeno porte, conhecidos como mesocarnívoros, e possuem dieta onívora.

O conjunto dos nossos trabalhos demonstrou que os carnívoros neotropicais estão envolvidos nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*, embora cada espécie tenha um potencial diferente para manter e dispersar as populações e genótipos deste parasito, de acordo com as características ecológicas das espécies, como dieta e uso de habitat, bem como a composição da rede trófica e as particularidades regionais das diferentes áreas de estudo. Nossa hipótese inicial era que quanto mais alta a posição na rede trófica de uma espécie, maiores seriam as taxas de infecção por *T. cruzi*. Contudo, foram as espécies de médio porte, e não os carnívoros de topo de cadeia alimentar, que demonstraram maior potencial de infecção aos vetores. Mesocarnívoros que se alimentam de insetos e mamíferos, incluindo o quati, um hospedeiro que pode atuar como bioacumulador dos diferentes genótipos de *T. cruzi*, ocupam o topo da cadeia de transmissão de *T. cruzi*.

Com a fragmentação de habitats e demais processos de devastação ambiental, cada vez mais frequentes no Brasil, as espécies de topo de cadeia alimentar são as mais afetadas, pois requerem áreas grandes e preservadas (Dobson *et al.* 2006). Mudanças na abundância de predadores de topo podem desencadear um fenômeno chamado “mesopredator release” que resulta no aumento (de até quatro vezes mais) nas populações de mesocarnívoros e outros mesopredadores como os gambás (Crooks & Soule 1999, Prugh *et al.* 2009, Ritchie & Johnson 2009). Um dos prováveis efeitos do aumento nas populações de mesopredadores é a diminuição da fauna de pequenos mamíferos, podendo ocorrer até extinção local de algumas espécies (Miller *et al.* 2012). Se as espécies favorecidas forem competentes reservatórios de *T. cruzi*, como demonstramos no caso dos mesocarnívoros, uma das consequências desse fenômeno será o aumento na prevalência de *T. cruzi* na área. Ainda, as espécies mais tolerantes à fragmentação frequentemente são mamíferos generalistas que se adaptam mais facilmente a ambientes antropizados (Devictor *et al.* 2008). A presença de espécies generalistas e com alta competência como reservatório aumenta a probabilidade de expansão dos ciclos de transmissão de *T. cruzi*.

Em linhas gerais, o papel de cada hospedeiro vai se modificar de acordo com os processos ecológicos que modulam os ciclos enzoóticos locais. Compreender que os ciclos de transmissão resultam de uma complexa teia de interações entre parasitos, hospedeiros e o meio ambiente significa uma mudança de paradigma para o conceito de “One Health” (uma saúde) (Bogich *et al.* 2012, Zinsstag *et al.* 2012). Portanto, estudos integrados de ecologia, parasitologia e saúde humana e animal são a chave para a proposição de medidas de controle efetivas, sustentáveis e que reconheçam as particularidades regionais, sejam elas voltadas para saúde pública, saúde animal ou conservação das espécies silvestres.

Conclusões

- O Pantanal apresenta um ciclo de transmissão de *T. cruzi* estável e robusto que inclui espécies de hospedeiros que ocupam todos os habitats e estratos florestais, de morcegos a tatus. Nessa região, o ciclo de transmissão de *T. cruzi* é mantido por uma rede de transmissão na qual mamíferos especialistas e generalistas que estão conectados através de uma robusta rede trófica.
- O quati (*Nasua nasua*) é o principal reservatório de *T. cruzi* no Pantanal e demonstrou potencial para atuar como bioacumulador e dispersor de todos os genótipos detectados na região, TcI, TcII e TcIII/TcIV.
- Na Serra da Canastra, cães domésticos demonstraram serem bons sentinelas para as áreas de transmissão de *T. cruzi* e dos distintos genótipos circulantes na área, TcI e TcII.
- As sete espécies de carnívoros examinadas neste estudo estavam infectadas por *T. cruzi*, mas apenas duas espécies de procionídeos, o quati e o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) no Pantanal (MS), e um felino, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), da Serra da Canastra (MG) demonstraram um alto potencial de infectividade aos vetores.
- A composição da dieta é um fator determinante nas taxas de infecção por *T. cruzi* nos carnívoros: quanto maior a proporção de invertebrados na dieta, maiores as taxas de infecção por *T. cruzi*.
- Quinze dentre as vinte e uma espécies de carnívoros silvestres foram encontradas naturalmente infectadas por *T. cruzi* na América do Sul, mas cada espécie apresenta um potencial diferente para manter e dispersar as populações e genótipos deste parasito, de acordo com suas características ecológicas e as particularidades regionais das diferentes áreas de estudo.
- O padrão de infecção por *T. cruzi* em carnívoros não tem associação com a proximidade filogenética.
- Espécies da superfamília Musteloidea, que inclui os procionídeos, mustelídeos e mephitídeos, são os carnívoros com maior potencial de infectar vetores.
- Mesocarnívoros, que se alimentam de insetos e mamíferos, ocupam o topo da cadeia de transmissão de *T. cruzi* e, portanto, podem ter um impacto importante nas redes de transmissão deste parasito.

Referências

- Agnarsson I., Kuntner M., May-Collado L.J. (2010). Dogs, cats, and kin: a molecular species-level phylogeny of Carnivora. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 54: 726-745.
- Aguirre A.A. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasit. Vectors*, 2 Suppl 1: S7.
- Albuquerque R.D. & Barretto M.P. (1968). Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*." XXX: natural infection of the bush dog, "*Cerdocyon thous azarae*" (Wied, 1824) by "*T. cruzi*". *Rev. Bras. Biol.*, 28: 457-468.
- Albuquerque R.D. & Barretto M.P. (1970). On wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLIV. Natural infection of the field fox, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (Lung, 1842) by *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 12: 375-382.
- Aliaga C., Breniere S.F., Barnabe C. (2011). Further interest of miniexon multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi* DTU groups. *Infect. Genet. Evol.*, 11: 1155-1158.
- Alvarado-Otegui J.A., Ceballos L.A., Orozco M.M., Enriquez G.F., Cardinal M.V., Cura C., Schijman A.G., Kitron U., Gurtler R.E. (2012). The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta Trop.*, 124: 79-86.
- Alves F.M. (2013). A complexidade, multifatorialidade e não linearidade da rede de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) em quatis (Carnivora: Procyonidae: *Nasua nasua*) de vida livre do Pantanal/MS, um estudo longitudinal. *Dissertação de mestrado*. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 73p.
- Alves F.M., Olifiers N., Bianchi R.C., Duarte A.C., Cotias P.M., D'Andrea P.S., Gompper M.E., Mourao G.M., Herrera H.M., Jansen A.M. (2011). Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging Coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.*, 11: 835-841.
- Araujo C.A., Waniek P.J., Xavier S.C., Jansen A.M. (2011). Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Exp. Parasitol.*, 127: 308-312.
- Arim M., Abades S.R., Laufer G., Loureiro M., Marquet P.A. (2010). Food web structure and body size: trophic position and resource acquisition. *Oikos*, 119: 147-153.

- Ashford R.W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.*, 14: 523-532.
- Ashford R.W. (1997). What it takes to be a reservoir host. *Belgian Journal of Zoology*, 127: 85-90.
- Barretto M.P. & Albuquerque R.D. (1971). Studies on reservoirs and wild vectors of *Trypanosoma cruzi*. XLVII. Natural infection of the mustelid, *Galictis vittata braziliensis* (Thunberg, 1820) by *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 13: 346-351.
- Barretto M.P. & Ferriolli F.F. (1970). Wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXIX: Natural infection of *Procyon cancrivorus nigripes* Mivart, 1885, by *T. cruzi*. *Rev. Bras. Biol.*, 30: 431-438.
- Barretto M.P. & Ribeiro R. D. (1979). Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. *Rev. Ins. Adolfo Lutz*, 39(1): 25-36. 1979.
- Barretto M.P. & Ribeiro R.D. (1972). Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LI. Natural infection of the mustelid, *Eira barbara barbara* (Lin., 1758) by *T. cruzi*. *Rev. Bras. Biol.*, 32: 413-418.
- Barretto M.P. (1964). Reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the Americas. *Rev. Bras. Malariol. Doencas. Trop.*, 16: 527-552.
- Barros A.M. (2001). Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 917-923.
- Bejan A. (2012). Why the bigger live longer and travel farther: animals, vehicles, rivers and the winds. *Sci. Rep.*, 2: 594.
- Bogich T.L., Chunara R., Scales D., Chan E., Pinheiro L.C., Chmura A.A., Carroll D., Daszak P., Brownstein J.S. (2012). Preventing pandemics via international development: a systems approach. *PLoS Med.*, 9: e1001354.
- Briones M.R., Souto R.P., Stolf B.S., Zingales B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 104: 219-232.

- Brisson D., Brinkley C., Humphrey P.T., Kemps B.D., Ostfeld R.S. (2011). It takes a community to raise the prevalence of a zoonotic pathogen. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2011: 741406.
- Brown E.L., Roellig D.M., Gompper M.E., Monello R.J., Wenning K.M., Gabriel M.W., Yabsley M.J. (2010). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among eleven potential reservoir species from six states across the southern United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10: 757-763.
- Brown M.J.F., Schmid-Hempel R., Schmid-Hempel P. (2003). Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology*, 72: 994-1002.
- Cardinal M.V., Lauricella M.A., Ceballos L.A., Lanati L., Marcet P.L., Levin M.J., Kitron U., Gurtler R.E., Schijman A.G. (2008). Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol.*, 38: 1533-1543.
- Carrasco H.J., Segovia M., Llewellyn M.S., Morocoima A., Urdaneta-Morales S., Martinez C., Martinez C.E., Garcia C., Rodriguez M., Espinosa R., de Noya B.A., Diaz-Bello Z., Herrera L., Fitzpatrick S., Yeo M., Miles M.A., Feliciangeli M.D. (2012). Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6: e1707.
- Ceballos L.A., Cardinal M.V., Vazquez-Prokopec G.M., Lauricella M.A., Orozco M.M., Cortinas R., Schijman A.G., Levin M.J., Kitron U., Gurtler R.E. (2006). Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta Tropica*, 98: 286-296.
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1(2): 159-218. 1909.
- Charles R.A., Kjos S., Ellis A.E., Barnes J.C., Yabsley M.J. (2012). Southern plains woodrats (*Neotoma micropus*) from Southern Texas are important reservoirs of two genotypes of *Trypanosoma cruzi* and host of a putative novel *Trypanosoma* species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Doi: 10.1089/vbz.2011.0817.

- Cheida C.C., Rodrigues F.H.G. & Mourão G.M. (2012). Ecologia espaço-temporal de guaxinins *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae) no Pantanal central. Anais do 6º Congresso Brasileiro de Mastozoologia. Corumbá, MS.
- Chen H.W., Liu W.C., Davis A.J., Jordan F., Hwang M.J., Shao K.T. (2008). Network position of hosts in food webs and their parasite diversity. *Oikos*, 117: 1847-1855.
- Choisy M., Brown S.P., Lafferty K.D., Thomas F. (2003). Evolution of trophic transmission in parasites: why add intermediate hosts? *Am. Nat.*, 162: 172-181.
- Courtenay O., Macdonald D.W., Gillingham S., Almeida G., Dias R. (2006). First observations on South America's largely insectivorous canid: the hoary fox (*Pseudalopex vetulus*). *Journal of Zoology*, 268: 45-54.
- Crooks K.R. & Soule M.E. (1999). Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. *Nature*, 400: 563-566.
- Davis D.S., Russell L.H., Adams L.G., Yaeger R.G., Robinson R.M. (1980). An experimental infection of *Trypanosoma cruzi* in striped skunks (*Mephitis mephitis*). *J. Wildl. Dis.*, 16: 403-406.
- De Meeus T. & Renaud F. (2002). Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends Parasitol.*, 18: 247-251.
- Deane L.M. (1961). Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica. I – Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 3: 15-28.
- Deane L.M. (1964). Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Bras. Malariol. Doencas. Trop.*, 16: 27-48.
- Deane M.P., Lenzi H.L., Jansen A.M. (1984). *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 513-515.
- Desbiez A.L.J. & Borges P.A.L. (2010). Density, habitat selection and observations of South American Coati *Nasua nasua* in the central region of the Brazilian Pantanal wetland. *Small Carnivore Conservation*, 42: 14-18.

- Desbiez A.L.J., Bodmer R.E., Tomas W.M. (2010). Mammalian Densities in a Neotropical Wetland Subject to Extreme Climatic Events. *Biotropica*, 42: 372-378.
- Devictor V., Julliard R., Frédéric J. (2008). Distribution of specialist and generalist species along spatial gradients of habitat disturbance and fragmentation. *Oikos*, 117: 507-514.
- Di Noia J.M., Buscaglia C.A., De Marchi C.R., Almeida I.C., Frascch A.C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.*, 195: 401-413.
- Dobson A., Lodge D., Alder J., Cumming G.S., Keymer J., McGlade J., Mooney H., Rusak J.A., Sala O., Wolters V., Wall D., Winfree R., Xenopoulos M.A. (2006). Habitat loss, trophic collapse, and the decline of ecosystem services. *Ecology*, 87: 1915-1924.
- Eisenberg J.F. & Redford K.H. (1999). *Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil)*. Vol. 3. Chicago and London: The University of Chicago Press. 609p.
- Estrada-Franco J.G., Bhatia V., Diaz-Albiter H., Ochoa-Garcia L., Barbabosa A., Vazquez-Chagoyan J.C., Martinez-Perez M.A., Guzman-Bracho C., Garg N. (2006). Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.*, 12: 624-630.
- Fernandes O., Mangia R.H., Lisboa C.V., Pinho A.P., Morel C.M., Zingales B., Campbell D.A., Jansen A.M. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*, 118 (Pt 2): 161-166.
- Ferreira L.C. & Deane L. (1938). Nôvo depositário silvestre do *Shizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909): a irara, *Tayra barbara* L. *Brasil-méd.*, 52: 1159-1161.
- Ferriolli F.F. & Barretto M.P. (1968). Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXIX. Natural infection of *Nasua nasua solitaria* Schinz 1821 by *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 10: 354-363.
- Ferriolli F.F. & Barretto M.P. (1969). Studies on wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. XXXV. Natural infection of the ferret *Galictis cuja furax* (Thomas, 1907) by *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 11: 264-273.

- Freitas J.M., Augusto-Pinto L., Pimenta J.R., Bastos-Rodrigues L., Goncalves V.F., Teixeira S.M., Chiari E., Junqueira A.C., Fernandes O., Macedo A.M., Machado C.R., Pena S.D. (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.*, 2: e24.
- Gaunt M. & Miles M. (2000). The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 557-565.
- Gittleman J.L. & Harvey P.H. (1982). Carnivore home-range size, metabolic needs and ecology. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 10: 57-63.
- Gittleman J.L., Funk S.M., Macdonald D., Wayne R.K. (2001). Why “carnivore conservation”? Pp. 1-7. In: Gittleman J.L., Funk S.M., Macdonald D., Wayne R.K. (Eds.). *Carnivore conservation*. Inglaterra: Cambridge University Press. 675p.
- Guhl F. & Ramirez J.D. (2011). *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop.*, 119: 1-4.
- Guhl F., Jaramillo C., Vallejo G.A., Cardenas A.-A., Aufderheide A. (2000). Chagas disease and human migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 553-555.
- Gurtler R.E., Cecere M.C., Lauricella M.A., Cardinal M.V., Kitron U., Cohen J.E. (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134: 69-82.
- Haine E.R., Brondani E., Hume K.D., Perrot-Minnot M.J., Gaillard M., Rigaud T. (2004). Coexistence of three microsporidia parasites in populations of the freshwater amphipod *Gammarus roeseli*: evidence for vertical transmission and positive effect on reproduction. *Int. J. Parasitol.*, 34: 1137-1146.
- Halliday J.E.B., Meredith A.L., Knobel D.L., Shaw D.J., Bronsvoort B.M.D.C., Cleaveland S. (2007). A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *Journal of the Royal Society Interface*, 4: 973-984.
- Hamilton P.B., Adams E.R., Njiokou F., Gibson W.C., Cuny G., Herder S. (2009). Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect. Genet. Evol.*, 9: 81-86.

- Hamilton P.B., Teixeira M.M., Stevens J.R. (2012). The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol.*, 28: 136-141.
- Hatcher M.J., Dick J.T., Dunn A.M. (2006). How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecol. Lett.*, 9: 1253-1271.
- Hatcher M.J., Dick J.T.A., Dunn A.M. (2012). Diverse effects of parasites in ecosystems: linking interdependent processes. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10: 186-194.
- Haydon D.T., Cleaveland S., Taylor L.H., Laurenson M.K. (2002). Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 1468-1473.
- Hernandez A.D. & Sukhdeo M.V.K. (2008). Parasites alter the topology of a stream food web across seasons. *Oecologia*, 156: 613-624.
- Herrera H.M., Lisboa C.V., Pinho A.P., Olifiers N., Bianchi R.C., Rocha F.L., Mourao G.M., Jansen A.M. (2008). The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102: 1133-1139.
- Herrera H.M., Rademaker V., Abreu U.G., D'Andrea P.S., Jansen A.M. (2007). Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop.*, 102: 55-62.
- Herrera H.M., Rocha F.L., Lisboa C.V., Rademaker V., Mourao G.M., Jansen A.M. (2011). Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 105: 380-387.
- Herrera L., D'Andrea P.S., Xavier S.C., Mangia R.H., Fernandes O., Jansen A.M. (2005). *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 99: 379-388.
- Horwitz P. & Wilcox B.A. (2005). Parasites, ecosystems and sustainability: an ecological and complex systems perspective. *Int. J. Parasitol.*, 35: 725-732.

- Hotez P.J., Bottazzi M.E., Franco-Paredes C., Ault S.K., Periago M.R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2: e300.
- Hudson P.J., Dobson A.P., Lafferty K.D. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends Ecol. Evol.*, 21: 381-385.
- Jacomo A.T.D., Kashivakura C.K., Ferro C., Furtado M.M., Astete S.P., Torres N.M., Sollmann R., Silveira L. (2009). Home Range and Spatial Organization of Maned Wolves in the Brazilian Grasslands. *Journal of Mammalogy*, 90: 150-157.
- Jansen, A. M. & Roque, A. L. R. (2010). Domestic and wild mammalian reservoir. Pp. 249-276. In: Telleria J. & Tibayrenc M. (Eds.) *American trypanosomiasis Chagas Disease - one hundred years of research*. Elsevier: London. 276p.
- Johnson P.T., Dobson A., Lafferty K.D., Marcogliese D.J., Memmott J., Orlofske S.A., Poulin R., Thieltges D.W. (2010). When parasites become prey: ecological and epidemiological significance of eating parasites. *Trends Ecol. Evol.*, 25: 362-371.
- Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451: 990-994.
- Kays R.W. & Gittleman J.L. (2001). The social organization of the kinkajou *Potos flavus* (Procyonidae). *Journal of Zoology*, 253: 491-504.
- Keesing F., Holt R.D., Ostfeld R.S. (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.*, 9: 485-498.
- Lafferty K.D., Dobson A.P., Kuris A.M. (2006). Parasites dominate food web links. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 11211-11216.
- Lemos, F. G., Facure, K. G., Azevedo, F. C. (2011). A first approach to the comparative ecology of the hoary fox and the crab-eating fox in a fragmented human altered landscape in the Cerrado Biome at Central Brazil. Pp. 143-160. In: Rosalino L. M. & Gheler-Costa C. (Eds.) *Middle-sized carnivores in agricultural landscapes*. Nova Sciences Publishers: New York. 160p.
- Letnic M., Ritchie E.G., Dickman C.R. (2012). Top predators as biodiversity regulators: the dingo *Canis lupus dingo* as a case study. *Biological Reviews*, 87: 390-413.

- Lewis M.D., Llewellyn M.S., Yeo M., Acosta N., Gaunt M.W., Miles M.A. (2011). Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 5: e1363.
- Lima E.D., DeMatteo K.E., Jorge R.S.P., Jorge M.L.S.P., Dalponte J.C., Lima H.S., Klorfine S.A. (2012). First telemetry study of bush dogs: home range, activity and habitat selection. *Wildlife Research*, 39: 512-519.
- Lima J.S. (2003). Ninhos arbóreos de quatis (Carnivora: *Nasua nasua*) em uma área do Pantanal brasileiro: inferências ecológica e zoonótica. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS. 47p.
- Lisboa C.V., Mangia R.H., Luz S.L., Kluczkovski A., Jr., Ferreira L.F., Ribeiro C.T., Fernandes O., Jansen A.M. (2006). Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*, 133: 603-611.
- Lisboa C.V., Pinho A.P., Monteiro R.V., Jansen A.M. (2007). *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp. Parasitol.*, 116: 150-155.
- Lisboa C.V., Xavier S.C., Herrera H.M., Jansen A.M. (2009). The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet. Parasitol.*, 165: 19-24.
- Longdon B., Hadfield J.D., Webster C.L., Obbard D.J., Jiggins F.M. (2011). Host phylogeny determines viral persistence and replication in novel hosts. *PLoS Pathog.*, 7: e1002260.
- Loreau M., Roy J., Tilman D. (2005). Linking ecosystem and parasite ecology. Pp. 13-42. In: Thomas F., Renaud F., Guégan J. (Eds.). *Parasitism and Ecosystems*. Great Britain: Oxford University Press. 221p.
- Lorosa E.S., Andrade R.E., Santos S.M., Pereira C.A. (1998). Estudo da infecção natural e da fonte alimentar do *Triatoma sordida*, (Stal, 1859), (Hemiptera - Reduviidae) na região norte de Minas Gerais, Brasil, através da reação de precipitina. *Entomol Vect*, 5: 13-22.
- Macedo A.M., Machado C.R., Oliveira R.P., Pena S.D. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99: 1-12.

- Machado C.A. & Ayala F.J. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 98: 7396-7401.
- Machado E.M., Fernandes A.J., Murta S.M., Vitor R.W., Camilo D.J., Jr., Pinheiro S.W., Lopes E.R., Adad S.J., Romanha A.J., Pinto Dias J.C. (2001). A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65: 958-965.
- Marcili A., Lima L., Cavazzana M., Junqueira A.C., Veludo H.H., Maia Da S.F., Campaner M., Paiva F., Nunes V.L., Teixeira M.M. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136: 641-655.
- Mazza S. Otros mamíferos infectados naturalmente por *Schizotrypanum cruzi*, o cruzi-similes en provincias de Jujuy y Salta. *M. E. P. R. A.*, 45: 119-134. 1940.
- McCluskey B.J., Mumford E.L., Salman M.D., Traub-Dargatz J.J. (2002). Use of sentinel herds to study the epidemiology of vesicular stomatitis in the state of colorado. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 969: 205-209.
- Miller B.J., Harlow H.J., Harlow T.S., Biggins D., Ripple W.J. (2012). Trophic cascades linking wolves (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*), and small mammals. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 90: 70-78.
- Monteiro W.M., Magalhaes L.K., de Sa A.R., Gomes M.L., Toledo M.J., Borges L., Pires I., Guerra J.A., Silveira H., Barbosa M. (2012). *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *Plos One*, 7: e41284.
- Monteiro W.M., Magalhaes L.K., Santana F.S., Borborema M., Silveira H., Barbosa M.D.V. (2010). *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Tropical Medicine & International Health*, 15: 1049-1051.
- Mortara R.A., Andreoli W.K., Fernandes M.C., da Silva C.V., Fernandes A.B., L'Abbate C., da S.S. (2008). Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell. Biochem.*, 47: 101-109.

- Noireau F., Diosque P., Jansen A.M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.*, 40: 26.
- Nowak R.M. (1999). Order Carnivora. Pp.632-836. *In*: Nowak R.M. Walker's mammals of the world. Baltimore: The John Hopkins University Press. 836p.
- Nowak R.M. (2005). Walker's carnivores of the world. Baltimore: The John Hopkins University Press.
- OIE. World Organisation for Animal Health. (2010). Training manual on wildlife diseases and surveillance. Workshop for OIE national focal points for wildlife. Internet: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife.pdf. Acesso em: 01/10/2012.
- Olifiers N., Bianchi R.D., Mourao G.D., Gompper M.E. (2009). Construction of arboreal nests by brown-nosed coatis, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in the Brazilian Pantanal. *Zoologia*, 26: 571-574.
- Ortega J. & Castro-Arellano I. (2001). *Artibeus jamaicensis*. *Mammalian Species*, 662: 1-9.
- PAHO – Pan-American Health Organization. (2009). Doença de Chagas – Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. 92p. Internet: http://bvs.panalimentos.org/local/File/Guia_Doenca_Chagas_2009.pdf. Acesso em: 20/11/2012.
- Piccinali R.V., Canale D.M., Sandoval A.E., Cardinal M.V., Jensen O., Kitron U., Gurtler R.E. (2010). *Triatoma infestans* bugs in Southern Patagonia, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, 16: 887-889.
- Pineda V., Saldana A., Monfante I., Santamaria A., Gottdenker N.L., Yabsley M.J., Rapoport G., Calzada J.E. (2011). Prevalence of *Trypanosome infections* in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet. Parasitol.*, 178: 360-363.
- Pinho A.P., Cupolillo E., Mangia R.H., Fernandes O., Jansen A.M. (2000). *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94: 509-514.

- Polis G.A. & Hurd S.D. (1996). Linking marine and terrestrial food webs: allochthonous input from the ocean supports high secondary productivity on small islands and coastal land communities. *American Naturalist*, 147: 396-423.
- Poulin R., Fredensborg B.L., Hansen E., Leung T.L.F. (2005). The true cost of host manipulation by parasites. *Behavioural Processes*, 68: 241-244.
- Poulin R., Guilhaumon F., Randhawa H.S., Luque J.L., Mouillot D. (2011). Identifying hotspots of parasite diversity from species-area relationships: host phylogeny versus host ecology. *Oikos*, 120: 740-747.
- Prugh L.R., Stoner C.J., Epps C.W., Bean W.T., Ripple W.J., Laliberte A.S., Brashares J.S. (2009). The Rise of the Mesopredator. *Bioscience*, 59: 779-791.
- Ramirez J.D., Duque M.C., Montilla M., Cucunuba Z.M., Guhl F. (2012). Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infect. Genet. Evol.*, 12: 1743-1750.
- Rassi Jr. A., Rassi A., Marin-Neto J.A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375: 1388-1402.
- Rhyan J.C. & Spraker T.R. (2010). Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Vet. Pathol.*, 47: 34-39.
- Ritchie E.G. & Johnson C.N. (2009). Predator interactions, mesopredator release and biodiversity conservation. *Ecol. Lett.*, 12: 982-998.
- Rocha F.L. (2006). Áreas de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na fazenda Nhumirim e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Corumbá. 92p.
- Roellig D.M., Brown E.L., Barnabe C., Tibayrenc M., Steurer F.J., Yabsley M.J. (2008). Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 1123-1125.
- Roellig D.M., Ellis A.E., Yabsley M.J. (2009a). Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* with opposing evidence for the theory of carnivory. *J. Parasitol.*, 95: 360-364.
- Roellig D.M., Ellis A.E., Yabsley M.J. (2009b). Genetically different isolates of *Trypanosoma cruzi* elicit different infection dynamics in raccoons (*Procyon lotor*) and Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Int. J. Parasitol.*, 39: 1603-1610.

- Roellig D.M., McMillan K., Ellis A.E., Vandenberg J.L., Champagne D.E., Yabsley M.J. (2010). Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 137: 959-966.
- Roemer G.W., Gompper M.E., Van Valkenburgh B. (2009). The ecological role of the mammalian mesocarnivore. *Bioscience*, 59: 165-173.
- Roque A.L., D'Andrea P.S., de Andrade G.B., Jansen A.M. (2005). *Trypanosoma cruzi*: distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). *Exp. Parasitol.*, 111: 37-46.
- Roque A.L., Xavier S.C., da Rocha M.G., Duarte A.C., D'Andrea P.S., Jansen A.M. (2008). *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79: 742-749.
- Roque A.L.R. & Jansen A. M. (2008). Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 41(suplem.III): 191-193.
- Rosypal A.C., Tidwell R.R., Lindsay D.S. (2007). Prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in wild canids from South Carolina. *Journal of Parasitology*, 93: 955-957.
- Rosypal A.C., Tripp S., Lewis S., Francis J., Stoskopf M.K., Larsen R.S., Lindsay D.S. (2010). Survey of Antibodies to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.* in Gray and Red Fox Populations From North Carolina and Virginia. *Journal of Parasitology*, 96: 1230-1231.
- Rozas M., Botto-Mahan C., Coronado X., Ortiz S., Cattán P.E., Solari A. (2007). Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 647-653.
- Ryan J.A. & Kohler S.L. (2010). Virulence is context-dependent in a vertically transmitted aquatic host-microparasite system. *Int. J. Parasitol.*, 40: 1665-1673.
- Santos M., Aguirre L.F., Vázquez L.B., Ortega J. (2003). *Phyllostomus hastatus*. *Mammalian Species*, 722: 1-6.

- Schmunis G.A. & Yadon Z.E. (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.*, 115: 14-21.
- Schofield C. (2000). *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 535-544.
- Shikanai-Yasuda M.A. & Carvalho N.B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.*, 54: 845-852.
- Smyth J.D. (1994). Parasitism: what is a parasite? Pp. 1-9. In: Smyth J.D. *Introduction to Animal Parasitology*. 3ª edição. Cambridge: Cambridge University Press. 572p.
- Stevens J.R., Noyes H.A., Dover G.A., Gibson W.C. (1999). The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*, 118 (Pt 1): 107-116.
- Sukhdeo M.V. (2010). Food webs for parasitologists: a review. *J. Parasitol.*, 96: 273-284.
- Sukhdeo M.V. (2012). Where are the parasites in food webs? *Parasit. Vectors*, 5: 239.
- Teixeira D.E., Benchimol M., Crepaldi P.H., de S.W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6: e1749.
- Thomas F., Poulin R., Brodeur J. (2010). Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos*, 119: 1217-1223.
- Thomas F., Poulin R., Guegan J.F., Michalakis Y., Renaud F. (2000). Are there pros as well as cons to being parasitized? *Parasitology Today*, 16: 533-536.
- Thomas M.E., Rasweiler Iv J.J., D'Alessandro A. (2007). Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102: 559-565.
- Thompson R.M., Mouritsen K.N., Poulin R. (2005). Importance of parasites and their life cycle characteristics in determining the structure of a large marine food web. *Journal of Animal Ecology*, 74: 77-85.

- Westenberger S.J., Barnabe C., Campbell D.A., Sturm N.R. (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 171: 527-543.
- Winemiller K.O. & Polis G.A. (1996). Food webs: What can they tell us about the world? Pp. 1-22. *In: Winemiller K.O. & Polis G.A. (eds.) Food webs: Integration of patterns and dynamics*. New York: Chapman & Hall. 472p.
- Wozencraft W.C. (2005). Order Carnivora. Pp. 532-628. *In: Wilson D.E. & Reeder D.M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3ª edição. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 2142p.
- Xavier S.C., Roque A.L., Lima V.S., Monteiro K.J., Otaviano J.C., Ferreira da Silva L.F., Jansen A.M. (2012). Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 6: e1647.
- Yoshida N., Tyler K.M., Llewellyn M.S. (2011). Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.*, 27: 459-466.
- Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104: 1051-1054.
- Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc M., Macedo A.M., Teixeira M.M., Schijman A.G., Llewellyn M.S., Lages-Silva E., Machado C.R., Andrade S.G., Sturm N.R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.*, 12: 240-253.
- Zinsstag J., Mackenzie J.S., Jeggo M., Heymann D.L., Patz J.A., Daszak P. (2012). Mainstreaming One Health. *Ecohealth*, 9: 107-110.

OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS EM CARNÍVOROS SELVAGENS BRASILEIROS E SUAS IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO E SAÚDE PÚBLICA

Rodrigo Silva Pinto Jorge^{1,2}, Fabiana Lopes Rocha^{2,3}, Joares Adenilson May Júnior⁴ & Ronaldo Gonçalves Morato⁵

¹ Reserva Extrativista Mãe Grande de Curuçá – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Av. Julio Cesar, 7060 – Val de Cans, Belém-PA, Brasil. CEP 66617-420.

² Instituto Brasileiro de Medicina da Conservação – Rua Silveira Lobo, 32, Caixa Postal 48, Bairro Casa Forte, Recife-PE, CEP: 52061-030.

³ Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária. Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos e Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios. Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365 Manguinhos Pavilhão Rocha Lima 5º andar. Rio de Janeiro-RJ, Brasil. CEP: 21040-900.

⁴ Programa de Pós-graduação do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP) - Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo-SP, Brasil. CEP: 05508-270.

⁵ Centro Nacional de Manejo e Conservação de Mamíferos Carnívoros – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CENAP/ICMBio). Estrada Hisaichi Takebayashi, 8600, Atibaia-SP, CEP: 12952-011.

E-mails: rspjorge@gmail.com, rochabria2@yahoo.com.br, joaresmay@ig.com.br, ronaldo.morato@icmbio.gov.br

RESUMO

Diversos surtos epidêmicos causados por agentes patogênicos provocaram severo declínio em populações de carnívoros selvagens nas últimas décadas. Além deste impacto às populações silvestres, há a preocupação da transmissão de alguns destes agentes à população humana e de animais domésticos. De fato, as alterações ambientais têm provocado mudanças na relação patógeno-hospedeiro. Desta forma, o monitoramento da saúde de animais silvestres é importante componente no estabelecimento de programas de controle e erradicação de doenças e na elaboração de políticas de saúde pública e animal e de manejo e conservação de espécies selvagens. Considerando o papel dos mamíferos da ordem Carnívora na cadeia trófica, estes podem ser usados como “sentinelas”, sendo alvos estratégicos em programas de vigilância para detecção de patógenos. Neste artigo serão revisados estudos de caso dos principais patógenos que acometem carnívoros selvagens, com ênfase nas espécies da fauna brasileira. Os métodos laboratoriais utilizados nos estudos de exposição dos carnívoros brasileiros a patógenos serão discutidos e considerações sobre estratégias para minimizar seus impactos sobre a fauna silvestre, bem como os possíveis métodos para controle de patógenos causadores de zoonoses em carnívoros.

Palavras-chave: Ordem Carnívora; medicina da conservação; zoonoses; epidemiologia; manejo de fauna.

ABSTRACT

OCCURRENCE OF PATHOGENS IN BRAZILIAN WILD CARNIVORES AND ITS IMPLICATIONS FOR CONSERVATION AND PUBLIC HEALTH. Several outbreaks caused by pathogens caused declines in wild carnivore populations in the last decades. In addition to the negative impact to wild populations, there is a concern about the transmission of some of these agents to humans and domestic animals. In fact, environmental alterations have resulted in changes in the pathogen-host relation. Therefore, monitoring health of wild animals is considered an important component in programs for control or eradication of diseases and in the public and animal health politics and for the management and conservation of wild species. Considering the role of mammals of the order Carnívora in the trophic chain, they might be used as “sentinels”, working as strategic targets in programs of surveillance of important pathogens for public and animal health. We review in this paper case-studies of the main pathogens that occur in wild carnivores,

emphasizing species of the Brazilian fauna. We also discuss laboratorial methods used in studies of exposure of Brazilian wild carnivores to pathogens, as well as strategies to minimize the impacts in these populations caused by that exposure, and methods for controlling the occurrence of zoonotic pathogens in wild carnivores. **Key-words:** Order Carnivora; conservation medicine; zoonosis; epidemiology; fauna management.

RESUMEN

OCURRENCIA DE PATÓGENOS EN CARNÍVOROS SALVAJES BRASILEÑOS Y SUS IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN Y LA SALUD PÚBLICA. Diversos brotes epidémicos causados por agentes patógenos han provocado una severa reducción de las poblaciones de carnívoros salvajes en las últimas décadas. Además de este impacto sobre las poblaciones silvestres, existe la preocupación de que haya transmisión de algunos de estos agentes a la población humana y de animales domésticos. De hecho, las alteraciones ambientales han provocado cambios en la relación patógeno-hospedero. De esta forma, el monitoreo de la salud de animales silvestres es un componente importante en el establecimiento de programas de control y erradicación de enfermedades y en la elaboración de políticas de salud pública y animal y de manejo y conservación de especies salvajes. Considerando el papel de los mamíferos del orden Carnivora en la cadena trófica, éstos pueden ser usados como “centinelas”, siendo objetivos estratégicos en programas de vigilancia para detección de patógenos. Siendo así, en este artículo serán revisados estudios de caso de los principales patógenos que afectan a carnívoros salvajes, con énfasis en las especies de la fauna brasileña. Los métodos de laboratorio utilizados en los estudios de exposición de los carnívoros brasileños a patógenos serán discutidos así como consideraciones sobre estrategias para minimizar sus impactos sobre la fauna silvestre y los posibles métodos para el control de patógenos causantes de zoonosis en carnívoros.

Palabras clave: Orden Carnivora; medicina de la conservación; zoonosis; epidemiología; manejo de fauna.

INTRODUÇÃO

Em comparação com a perda de habitats, caça e poluição, a ocorrência de doenças pode parecer um problema menor para conservação de espécies selvagens. Entretanto, a ocorrência de patógenos pode afetar a abundância e distribuição de animais e nas últimas décadas o impacto das doenças nas populações de espécies selvagens de vida livre tem chamado a atenção de conservacionistas (p. ex. McCallum & Dobson 1995, Murray *et al.* 1999, Woodroffe 1999, Cleaveland *et al.* 2007). Diversas espécies de carnívoros ameaçadas de extinção sofreram declínio de suas populações por epidemias causadas por doenças infecciosas, como nos surtos de cinomose em furões-de-patas-negras (*Mustela nigripes* Audubon & Bachman 1851) (Thorne & Williams 1988), em leões (*Panthera Leo* Linnaeus 1758) (Roelke-Parker *et al.* 1996), em cachorros selvagens africanos (*Lycaon pictus* Temminck 1820) (Alexander *et al.* 1996) e de raiva em lobos da Etiópia (*Canis simensis* Rüppell 1840) (Sillero-Zubiri *et al.* 1996). Tais epidemias trouxeram a visão de que as doenças podem aumentar significativamente a

mortalidade de animais selvagens de vida livre e levantaram a necessidade de integrar a epidemiologia na conservação e manejo de carnívoros selvagens.

Além do impacto que as doenças podem causar nas populações de animais selvagens, existe uma crescente preocupação com a transmissão de parasitas entre humanos, animais selvagens e domésticos. De fato, 61% de todos os patógenos humanos são classificados como zoonoses (Taylor *et al.* 2001) e cerca de 77% dos patógenos de animais de produção e 91% dos patógenos de carnívoros domésticos infectam múltiplos hospedeiros (Haydon *et al.* 2002). Desta forma, se estas infecções podem espalhar-se amplamente entre populações humanas depois de introduzidas (Ex: Influenza, HIV, Ebola) e podem “saltar” freqüentemente de animais reservatórios (Ex: raiva, brucelose, leptospirose), infecções zoonóticas podem ter um sério impacto sócio-econômico e de saúde coletiva. Os focos em animais silvestres de patógenos que acometem seres humanos e animais domésticos podem ameaçar a eficácia de programas nacionais e internacionais de controle e erradicação de doenças, implementados mediante alto investimento financeiro (Bengis *et al.* 2002).

A maioria das recentes emergências de doenças infecciosas foi causada por mudanças nas interações ecológicas entre patógenos e hospedeiros (Dobson & Carper 1996, Daszak *et al.* 2001). Tais mudanças podem ser naturais ou de origem antropogênica, incluindo expansão das atividades humanas e fronteiras agropecuárias, fragmentação de habitats, poluição, entre outras (Patz *et al.* 2000). Essas mudanças ecológicas permitem o aumento do contato entre espécies de patógenos e novas populações de hospedeiros e a seleção natural pressiona para a dominância de patógenos que se adaptem a essas novas condições ambientais (Daszak *et al.* 2001). Isso pode tornar cada vez mais comum a ocorrência de epidemias em animais selvagens causadas por parasitas provenientes de animais domésticos (Funk *et al.* 2001).

De um lado, populações de carnívoros selvagens podem sofrer com severas epizootias e declínios relacionados a doenças de animais domésticos. Do outro, espécies como raposas e coiotes, que são bem adaptadas a ambientes alterados, podem servir como fontes de infecção para humanos e animais domésticos (Aguirre 2009). Adicionalmente, a transmissão de patógenos entre animais domésticos e selvagens é ainda mais preocupante se estes estão em ambientes fragmentados, com baixa variabilidade genética e/ou expostos a patógenos emergentes (McCallum & Dobson 2002, Patz *et al.* 2004, Travis *et al.* 2006), situação comum para grande parte dos animais selvagens brasileiros. Esta interface entre a saúde de seres humanos, animais selvagens e domésticos, abordada nesta revisão, está inserida no conceito de Medicina da Conservação (Tabor 2002).

Outro aspecto relevante é que carnívoros podem agir como “bioacumuladores” de exposição à patógenos, visto que, por ocuparem o topo da rede trófica, o consumo de hospedeiros infectados resulta em altas taxas de infecção. Desta forma, algumas espécies de carnívoros podem ser utilizadas como sentinelas, sendo alvos estratégicos em programas de vigilância para a detecção de patógenos (Cleaveland *et al.* 2006a, Aguirre 2009). Uma das maiores contribuições de um programa eficiente de monitoramento de doenças em animais selvagens de vida livre é a detecção em estágios iniciais da ocorrência de doenças novas ou emergentes, algumas das quais podem ter sérias implicações zoonóticas e econômicas (Mörner *et al.* 2002).

Muitos outros fatores ecológicos e epidemiológicos podem influenciar a distribuição de infecções em uma população suscetível, mas o desafio para conservacionistas e agentes de saúde coletiva é identificar as condições que levam uma infecção a se espalhar antes que as epidemias aconteçam. Assim, o estudo de doenças em populações selvagens é fundamental para implementação de programas eficazes de controle e erradicação de doenças e na elaboração de políticas de saúde pública e animal e de manejo e conservação de espécies selvagens

Nesse artigo, estudos de caso dos principais patógenos que acometem carnívoros selvagens foram revisados, com ênfase nas espécies da fauna brasileira. Os métodos diagnósticos utilizados nos estudos de ocorrência de patógenos nos carnívoros brasileiros foram discutidos e foram feitas considerações sobre estratégias para minimizar os impactos da exposição da fauna selvagem a estes agentes, bem como os possíveis métodos para controle da circulação em carnívoros de patógenos causadores de zoonoses.

VÍRUS DA CINOMOSE

O vírus da cinomose é causador de doença multi-sistêmica, altamente contagiosa, com evolução aguda ou subaguda, produzindo quadro febril, podendo atingir os sistemas respiratório, gastro-intestinal e nervoso central (Appel & Summers 1995). A cinomose é conhecida na Europa há pelo menos 200 anos (Williams 2001). Sua ocorrência foi descrita em carnívoros selvagens de vida livre aproximadamente na metade do século XX (Helmbolt & Jungherr 1955). Ela ocorre em todas as famílias de carnívoros e está distribuída por todo o mundo.

A transmissão do vírus da cinomose ocorre principalmente através de aerossóis ou contato com secreções orais, respiratórias ou oculares contendo o agente. Animais com infecção subclínica podem eliminar o vírus (Appel 1987) e o período de eliminação pode atingir até 90 dias após a infecção (Greene & Appel 1998). É necessário contato próximo entre os animais afetados e suscetíveis para que a transmissão ocorra, uma vez que o vírus é rapidamente inativado no ambiente pelos raios ultravioletas, calor e ressecamento. Portanto, populações densas de animais suscetíveis são necessárias para que uma epizootia ocorra em uma determinada região. Da mesma forma, o comportamento das espécies

envolvidas também é fundamental na transmissão do vírus. Espécies gregárias e sociais tendem, portanto, a favorecer a transmissão, enquanto os animais solitários e territorialistas apresentam uma chance menor de transmitir ou contrair o vírus. Assim, diversos fatores são determinantes na epidemiologia da cinomose em uma determinada região, como a suscetibilidade dos hospedeiros, a densidade das populações de hospedeiros suscetíveis simpátricos e a existência de aspectos comportamentais que favoreçam o contato intra e interespecíficos e, portanto, a transmissão do agente (Williams 2001).

Os sinais clínicos decorrentes da cinomose dependem da espécie acometida, idade, estado imunológico, variante do vírus envolvida e condições ambientais (Williams 2001). Nos carnívoros selvagens, na maioria das vezes, os sintomas são variações daqueles apresentados pelos cães domésticos. Os sinais clínicos mais característicos nos cães são depressão, secreção mucopurulenta nasal e ocular, dermatites e hiperqueratose dos coxins, tosse e outras manifestações respiratórias, distúrbios gastroentéricos e neurológicos (incoordenação motora, mioclonia, rigidez muscular, ataxia, convulsões, paresia, paralisia, cegueira) (Greene & Appel 1998).

Nos canídeos, os animais jovens parecem ser mais suscetíveis (Krakowka & Koestner 1976). A mortalidade decorrente da infecção também é bastante variável entre as diferentes espécies (Williams 2001). Algumas espécies selvagens apresentam-se especialmente suscetíveis e o número de animais infectados que se recuperam é extremamente baixo, como é o caso de furões-de-patas-negras (*M. nigripes*) (Williams *et al.* 1988) e raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus* Schreber 1775) (Davidson *et al.* 1992). Entre os cães domésticos, estima-se que 25 a 75% dos indivíduos infectados desenvolvem infecção subclínica e eliminam o vírus sem desenvolver a doença (Greene & Appel 1998).

Em áreas enzoóticas, com grandes populações de cães domésticos, a doença clínica é observada principalmente em filhotes de três a seis meses, coincidindo com o período de queda dos anticorpos maternos. Em populações isoladas, o vírus da cinomose, quando é introduzido, costuma ocorrer de forma epidêmica, acometendo cães de todas as idades (Leighton *et al.* 1988).

Diversos surtos de cinomose foram relatados em carnívoros de vida livre na África e América do

Norte, alguns deles causando declínios populacionais significativos em decorrência de aumento da mortalidade. Nos Estados Unidos, um surto de cinomose atingiu aquela que era considerada, à época, a última colônia de furões-de-patas-negras (*M. nigripes*) na natureza, causando a morte de vários indivíduos (Williams *et al.* 1988). Naquela ocasião, a espécie passou a ser considerada extinta na natureza. Davidson *et al.* (1992) determinaram que o vírus foi responsável por 78% da mortalidade das raposas cinzentas (*U. cinereoargenteus*) do sudeste norte-americano. Outra espécie sob risco de extinção bastante ameaçada por este patógeno é o cachorro-selvagem-africano (*L. pictus*). O agente foi implicado como responsável por mortalidade expressiva de indivíduos da espécie em Botswana (Alexander *et al.* 1996) e Tanzânia (Van De Bildt *et al.* 2002), e pelo desaparecimento da espécie na Reserva de Masai Mara, no Quênia (Alexander & Appel 1994). Neste mesmo Parque, 55% dos leões (*P. leo*) testados foram considerados positivos à sorologia (Kock *et al.* 1998). No Serengeti, a cinomose causou a morte de cerca de 1/3 da população de leões (Roelke-Parker *et al.* 1996). Em alguns destes casos, cães domésticos foram identificados como sendo a origem mais provável do agente (Alexander & Appel 1994, Roelke-Parker *et al.* 1996, Cleaveland *et al.* 2000). Diante dos surtos citados, devido ao significativo aumento de mortalidade causado pelo agente em populações de diversas espécies de carnívoros de vida livre, a cinomose é considerada como uma das doenças infecciosas que mais ameaça a conservação destes animais.

Para os mamíferos carnívoros da América do Sul, as publicações relacionadas à ocorrência da cinomose, ou mesmo exposição ao agente, ainda são escassas. Até o final do século XX, os estudos publicados com espécies sul-americanas se restringiam a relatos de casos ou levantamentos da ocorrência da doença em animais mantidos em cativeiro. Segundo Maia & Gouveia (2002), entre 1989 e 1998, 9% da mortalidade de lobos-guarás em cativeiro no Brasil foi atribuída às doenças infecciosas. Dentro deste grupo, a cinomose foi relacionada a 19,4% dos óbitos. Em um zoológico norte-americano, um surto de cinomose causou a morte de diversos felinos selvagens, dentre os quais uma onça-pintada (*Panthera onca* Linnaeus 1758) (Appel *et al.* 1994). Nos últimos 10 anos, no entanto, alguns estudos foram publicados com

levantamentos sorológicos em carnívoros da fauna brasileira de vida livre. Courtenay *et al.* (2001) testaram cães domésticos de uma comunidade rural no Marajó (Pará) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous* Linnaeus 1766) que frequentavam as casas dos vilarejos da região em busca de comida. Os cachorros-do-mato (*C. thous*) foram todos negativos enquanto os cães apresentaram positividade em dois dos 23 amostrados (9%). No Parque Nacional Noel Kempf Mercado, na Bolívia, dois lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815) foram positivos à sorologia dentre quatro capturados (Deem & Emmons 2005). Outro estudo na Bolívia detectou quatro graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus* G. Fischer 1814) positivos sorologicamente para a exposição ao vírus da cinomose dentre nove indivíduos capturados, enquanto os cinco cachorros-do-mato (*C. thous*) amostrados na região foram negativos (Fiorello *et al.* 2007). Em Minas Gerais, Curi (2005) testou sorologicamente três lobos-guarás (*C. brachyurus*), nove cachorros-do-mato e duas raposas-do-campo (*Lycalopex vetulus* Lund 1842) capturados na região da Serra do Cipó. Todos foram considerados negativos. Cães domésticos amostrados na região tiveram 65,7% de positividade (46/70). No norte do Pantanal, Jorge (2008) testou 75 carnívoros para exposição ao vírus. Vinte e um foram positivos, dentre os quais 12 de 43 cachorros-do-mato (*C. thous*), três de oito lobos-guarás (*C. brachyurus*), dois de 13 mãos-peladas (*Procyon cancrivorus* Cuvier, 1798), um de sete pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) e três de quatro jaguatiricas (*Leopardus pardalis* Linnaeus 1758). Dentre os 69 cães domésticos amostrados na região, 56 foram positivos. Nava *et al.* (2009) diagnosticaram seis onças-pintadas (*P. onca*) dentre 10 amostradas e um de sete pumas (*P. concolor*) positivas para a exposição no Parque Estadual de Ivinhema (Mato Grosso do Sul). Dentre os cães domésticos amostrados na região, todos foram considerados positivos (n=11). Neste mesmo estudo, foram amostradas nove onças-pintadas (*P. onca*), dois pumas (*P. concolor*) e duas jaguatiricas (*L. pardalis*) no Parque Estadual do Morro do Diabo, oeste do estado de São Paulo, a cerca de 150 quilômetros do Parque Estadual de Ivinhema. Todos os animais foram negativos. Nesta região, 35 de 101 cães amostrados foram positivos.

Os resultados positivos ao sorodiagnóstico obtidos em carnívoros de vida livre na América do

Sul indicam que, em algumas regiões, estes animais foram expostos ao vírus da cinomose ou a um agente antigenicamente semelhante.

A cinomose é uma doença comum em cães domésticos no Brasil. É possível que em algumas das regiões sul-americanas estudadas o vírus da cinomose tenha sido transmitido inicialmente dos cães domésticos para os carnívoros selvagens, a exemplo do que foi sugerido em estudos realizados na África (Alexander & Appel 1994, Roelke-Parker *et al.* 1996, Cleaveland *et al.* 2000). A grande proporção de animais positivos encontrada entre os cães domésticos na maioria dos levantamentos realizados em nosso continente reforça esta hipótese. O provável contato entre cães domésticos e carnívoros selvagens que utilizam áreas próximas às casas de moradores que residem em zona rural e periurbana é compatível com os resultados de Courtenay *et al.* (2001). Neste estudo, 22 cachorros-do-mato dentre os 24 aparelhados com rádios-colares visitaram vilas localizadas na região amazônica, no estado do Pará, demonstrando o alto potencial de contato entre os carnívoros domésticos e selvagens.

As características ecológicas dos carnívoros selvagens sul-americanos de médio e grande porte abrangidos nos estudos de exposição ao vírus da cinomose são, de forma geral, pouco favoráveis à transmissão do agente. Os carnívoros da nossa fauna são geralmente solitários, territorialistas e ocorrem em baixas densidades populacionais. Estas características são desfavoráveis ao contato direto entre os indivíduos, que seria um fator predisponente para a transmissão deste vírus (Williams 2001). No entanto, se considerarmos a comunidade de carnívoros como um todo e não as densidades das espécies de forma isolada, podemos vislumbrar a possibilidade de uma cadeia de transmissão capaz de manter a circulação do vírus no ambiente silvestre. Vale ressaltar que algumas espécies constituem-se como exceções ao padrão dos carnívoros brasileiros, como é o caso dos cachorros-do-mato (*C. thous*), que geralmente são observados em pares reprodutivos, ou mesmo em pequenos grupos familiares, formados pelo casal e filhotes ou juvenis, e ocorrem em densidades mais altas. Desta forma, a espécie poderia se comportar como um reservatório regional do vírus da cinomose, com episódios eventuais de transmissão para indivíduos de outras espécies, a exemplo do que foi sugerido para a espécie em relação à raiva na

região Nordeste (Carnieli *et al.* 2008). Outras duas exceções são cachorros vinagres (*Speothos venaticus* Lund 1842) e quatis (*Nasua nasua* Linnaeus 1766), que são espécies gregárias.

PARVOVÍRUS

Os vírus pertencentes ao grupo dos parvovírus infectam e podem causar quadro clínico em uma grande parte das espécies de carnívoros selvagens. Este grupo inclui o Parvovírus felino (FPV), o Parvovírus canino (CPV), o vírus da enterite dos visões (MEV), o vírus da doença Aleutiana dos visões e o Parvovírus dos guaxinins (Cleaveland *et al.* 2006b). Apesar das diferentes espécies de parvovírus terem sido batizadas de acordo com os hospedeiros nos quais elas ocorrem mais comumente, esta nomenclatura pode causar confusão no entendimento de sua epidemiologia. O FPV, por exemplo, pode eventualmente infectar canídeos, assim como o CPV pode infectar felídeos (Barker & Parrish 2001).

O parvovírus felino é reconhecido por causar a panleucopenia felina desde a primeira metade do século XX. Estudos realizados nas décadas de 1930 e 1940 revelam que diversas síndromes descritas em gatos domésticos naquela época com denominações variadas eram na realidade causadas por este agente (Parrish 1990). Naquele período, o FPV também foi implicado na mortalidade de felídeos selvagens em cativeiro (Hyslop 1955).

Em 1978 duas novas síndromes começaram a ser observadas com freqüência em cães domésticos. Uma delas era caracterizada como uma miocardite em filhotes abaixo dos quatro meses de idade e a outra como uma gastroenterite em animais de todas as idades. Os primeiros casos parecem ter ocorrido na Europa, mas rapidamente se espalharam pelo mundo todo (Parrish 1990). Robinson *et al.* (1980) identificaram um parvovírus como agente causador de ambas as síndromes. Este passou a ser conhecido como parvovírus canino tipo 2, como forma de diferenciá-lo do Vírus minuto canino (Pollock & Carmichael 1990). No entanto, este nome passou a ser preterido e o vírus passou a ser chamado de parvovírus canino (Barker & Parrish 2001). O vírus também atingiu os canídeos selvagens em um curto espaço de tempo. Já em 1979 foram detectados anticorpos em coiotes (*Canis latrans* Say 1823) nos Estados Unidos

e até 1981 a maioria dos animais desta espécie em Texas, Idaho e Utah eram soropositivos (Thomas *et al.* 1984).

O CPV provavelmente derivou do FPV ou de um vírus intimamente relacionado (Truyen *et al.* 1996). Apesar das seqüências de DNA dos isolados de CPV e FPV terem uma identidade de superior a 98%, eles podem ser distinguidos através de anticorpos monoclonais (Parrish & Carmichael 1983) e pela diferença de pH e temperatura característicos para a ocorrência de hemaglutinação (Carmichael *et al.* 1980, Senda *et al.* 1988). O encontro de seqüências de DNA intermediárias entre as dos dois vírus a partir de tecidos de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes* Linnaeus 1758) na Europa sugere que animais selvagens podem ter tido grande importância no processo de transmissão do FPV aos cães domésticos (Truyen *et al.* 1998).

Os parvovírus são bastante resistentes no ambiente. Quando protegidos da incidência direta dos raios solares, de altas temperaturas e ressecamento, podem permanecer viáveis por meses (Gordon & Angrick 1986). Quando comparados com outros agentes virais, como os vírus da raiva e da cinomose, têm um período de infectividade relativamente longo e uma vez introduzidos em uma região, tendem a persistir. Devido a estas características, os parvovírus tendem a ocorrer de forma endêmica nas regiões de ocorrência (Cleaveland *et al.* 2006b).

A idade dos animais acometidos tem grande importância na patogenia, pois os parvovírus necessitam de células em divisão para sua replicação. Animais jovens têm grandes quantidades de células em divisão e tecidos como o miocárdio e o cérebro são freqüentemente afetados. Nos animais adultos, as células do epitélio intestinal e tecidos linfáticos são geralmente as mais afetadas. Conseqüentemente, os animais desta faixa etária costumam apresentar gastroenterite, linfopenia e leucopenia (Steinel *et al.* 2001).

O possível incremento na mortalidade de filhotes é citado em diversos estudos como o principal problema que pode ser causado pelos parvovírus em populações de carnívoros selvagens. Em uma população de lobos (*Canis lupus* Linnaeus 1758) de Minnesota (EUA) amostrada e monitorada entre 1979 e 1990, percebeu-se que, em anos onde a prevalência para o CPV dos animais amostrados era mais alta, a proporção de

filhotes capturados era menor e, no ano subsequente, observava-se uma diminuição na taxa de aumento da população (Mech & Goyal 1993). Outro estudo com a mesma espécie realizado em Montana (EUA) observou que nas matilhas de lobos onde ocorreu mortalidade de filhotes, os títulos dos indivíduos adultos amostrados eram altos para anticorpos para o CPV e para o vírus da cinomose, enquanto nas matilhas que conseguiram criar seus filhotes, os títulos de anticorpos para estes agentes eram baixos (Johnson *et al.* 1994). Para o cachorro-selvagem-africano (*L. pictus*), Creel *et al.* (1997) observaram que o número de filhotes nas ninhadas era menor nas regiões em que a prevalência para anticorpos para o CPV era mais alta.

Em relação aos carnívoros selvagens da fauna brasileira, existem registros em zoológicos de doença atribuída ao CPV em lobos-guarás (*C. brachyurus*) (Fletcher *et al.* 1979, Mann *et al.* 1980, Maia & Gouveia 2002), em cachorros-do-mato (*C. thous*) (Mann *et al.* 1980) e em cachorros-vinagres (*S. venaticus*) (Janssen *et al.* 1982). Nos últimos anos, alguns estudos foram publicados com levantamentos sorológicos em animais de vida livre no Brasil e na Bolívia. Courtenay *et al.* (2001) testaram para a exposição ao parvovírus cães domésticos de uma comunidade rural no Pará e cachorros-do-mato (*C. thous*) que freqüentavam as casas dos vilarejos da região em busca de comida. Os cachorros-do-mato (*C. thous*) foram todos negativos enquanto os cães apresentaram positividade em três dos 23 amostrados (13%). No Parque Nacional Noel Kempf Mercado, na Bolívia, quatro lobos-guarás (*C. brachyurus*) capturados e sorologicamente testados foram positivos, resultando em 100% de positividade na amostra (Deem & Emmons 2005). Também na Bolívia, quatro cachorros-do-mato (*C. thous*) dentre cinco capturados e cinco entre nove graxains-do-campo (*L. gymnocercus*), foram considerados positivos ao sorodiagnóstico (Fiorello *et al.* 2007). Em Minas Gerais, Curi (2005) testou sorologicamente três lobos-guarás (*C. brachyurus*), nove cachorros-do-mato (*C. thous*) e duas raposas-do-campo (*L. vetulus*), capturados na região da Serra do Cipó. Todos foram considerados positivos. Cães domésticos amostrados na região tiveram 58,6% de positividade (41/70). Filoni *et al.* (2006) realizaram um levantamento da exposição de felídeos selvagens

de vida livre ao FPV. Foram analisadas amostras de soro de 21 animais de diversas regiões do Brasil, entre eles 18 pumas (*P. concolor*), dois gatos-do-mato-pequenos (*Leopardus tigrinus* Schreber 1775) e uma jaguatirica (*L. pardalis*). Dez deles foram positivos à sorologia, sendo oito onças-pardas, um gato-do-mato-pequeno e uma jaguatirica. No norte do Pantanal, Jorge (2008) testou 76 carnívoros para exposição ao CPV. Setenta foram positivos, dentre os quais 42 de 43 cachorros-do-mato (*C. thous*), sete de oito lobos-guarás (*C. brachyurus*), 10 de 13 mãos-peladas (*P. cancrivorus*) sete de sete pumas (*P. concolor*), três de quatro jaguatiricas (*L. pardalis*) e um de um cachorro-vinagre (*S. venaticus*). Cães domésticos da região também foram testados. Dentre os 102 animais amostrados, 98 foram positivos.

À exceção do estudo realizado no Marajó (Courtenay *et al.* 2001), todos os outros levantamentos realizados em carnívoros brasileiros de vida livre diagnosticaram indivíduos positivos para a exposição aos parvovírus, em alguns casos em proporções bastante elevadas. Estes resultados não chegam a ser surpreendentes considerando os resultados positivos em cães domésticos em todas as regiões amostradas, assim como a característica deste grupo de vírus de ter considerável resistência no ambiente (Gordon & Angrick 1986), favorecendo sua persistência nos locais onde é introduzido (Cleaveland *et al.* 2006b). No entanto, eles indicam a necessidade de aprofundamento nos estudos para buscar elucidar se a transmissão deste patógeno está aumentando a mortalidade das populações de carnívoros nas regiões amostradas.

VÍRUS DA RAIVA

A raiva é uma das mais antigas enfermidades infectocontagiosas descritas. Mesopotâmia e Egito conheciam sua presença na antiguidade e a relacionavam com a mordida de cães “loucos” (Megid 2007). Em 500 a.C. Democritus descreveu a doença em animais domésticos (Sikes 1972). O vírus da raiva afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) de todas as espécies de mamíferos, porém são considerados como reservatório apenas as espécies de importância regional para a manutenção do agente (Rupprecht *et al.* 2001). O agente ocasiona um quadro de encefalite aguda e acarreta níveis de mortalidade elevados

(Rupprecht *et al.* 2001, Megid 2007). Representa um sério problema de saúde pública na América Latina, África e Ásia.

O vírus da raiva pertence à família Rhabdoviridae, ao gênero *Lyssavirus*, que apresenta sete genótipos diferentes e dois novos *Lyssavirus* ainda não classificados. É transmitido pela saliva de mamíferos terrestres e quirópteros infectados nos episódios de mordedura (Megid 2007).

O vírus rábico genótipo tipo 1 é um RNA-vírus negativo, que penetra nos miócitos onde pode replicar-se e permanecer por tempo variável (Storts 1990), o que determina os diferentes períodos de incubação. Desloca-se por fusos musculares e tendíneos até os neurônios periféricos, passa por gânglios das raízes dorsais e medula, até atingir o cérebro. Este deslocamento é chamado de disseminação centrípeta (Storts 1990). A replicação viral se inicia nas vesículas citoplasmáticas, ocorre nos ribossomos livres e se completa no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (Megid 2007). Esta replicação origina corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, os *corpúsculos de Negri*, achado microscópico característico da raiva (Storts 1990). Após sua replicação no SNC, o vírus rábico se espalha para diferentes tecidos através de nervos periféricos e atinge as glândulas salivares onde fica disponível para transmissão e a eliminação, que ocorre durante um curto período, concomitante ao aparecimento de sinais clínicos, ou pode se iniciar alguns dias antes do óbito do hospedeiro, que ocorre geralmente em poucos dias (Storts 1990, Rupprecht *et al.* 2001, Carter & Wise 2005, Whelan 2009).

A doença apresenta distribuição mundial, excetuando-se regiões geograficamente isoladas (p.ex. ilhas do Reino Unido, Nova Zelândia e Japão) que não apresentam o genótipo tipo 1 segundo a Organização Mundial da Saúde. O vírus possui um ciclo urbano, mais fácil de controlar, e outro silvestre, que contribui para circulação e reintrodução do vírus (Childs 2002). A compreensão da raiva nos animais silvestres depende do entendimento da relação agente-hospedeiro-ambiente (Wandeler 1993), incluindo a interação vírus-hospedeiro (susceptibilidade, infecção), a história natural dos hospedeiros (Rupprecht *et al.* 2001), as modificações ambientais provocadas pelo homem, ou mesmo a introdução do agente em áreas originalmente livres por transporte de indivíduos portadores.

A introdução da raiva pode trazer graves conseqüências a populações de carnívoros selvagens, principalmente àquelas pequenas e isoladas (Gascoyne *et al.* 1993) como ocorreu com a população de lobos-da-etíopia (*C. simensis*) durante um surto da doença (Laurenson *et al.* 1997, Sillero-Zubiri *et al.* 1996). O agente continuou representando uma ameaça importante para a espécie nos anos subseqüentes (Randall *et al.* 2006). Os lobos cinzentos (*C. lupus*) (Weiler 1995) e os cachorros-selvagens-africanos (Kat *et al.* 1996, Hofmeyer *et al.* 2000) também tiveram declínio populacional decorrente da doença.

Na Europa e América do Norte, o bem sucedido controle da doença nos animais domésticos transferiu para as populações silvestres o papel de principais transmissores da doença nas últimas décadas, principalmente o guaxinim norte-americano (*Procyon lotor* Linnaeus 1758), o cangambá (*Mephitis mephitis* Schreber 1776) (Megid 2007), a raposa-vermelha (*V. vulpes*) (Smith & Baer 1988, Wandeler *et al.* 1988) e a raposa-cinzenta (*U. cinereoargenteus*) (Toma & Andral 1977). Nas regiões árticas e subárticas do Canadá e do Alaska, a raiva é endêmica na raposa-do-ártico (*Vulpes lagopus* Linnaeus 1758), havendo relatos de transmissão para populações de lobos cinzentos (*C. lupus*) (Laurenson *et al.* 1997). Na América Latina, com o controle da doença nos cães, é provável que a raiva silvestre, mantida em uma variedade de hospedeiros mamíferos, também aumente de importância (Bernardi *et al.* 2005).

No Brasil, o ciclo urbano tem o cão como seu principal reservatório, e o ciclo silvestre os morcegos hematófagos. No entanto, estudos nos últimos dez anos têm detectado casos de raiva em morcegos não hematófagos, canídeos silvestres e sagüis (Brasil 2006). Na região Nordeste a raiva apresenta transmissão entre canídeos silvestres e seres humanos, assim como entre animais doméstico-silvestres-domésticos (Carnieli *et al.* 2006, 2008), com o cachorro-do-mato (*C. thous*) como principal reservatório dentre as espécies de canídeos silvestres da região (Carnieli *et al.* 2008). Neste estudo, foi identificado um ciclo independente da raiva nestes animais na região. Aparentemente, o agente foi transmitido originalmente por cães domésticos aos silvestres, mas os resultados demonstram diferenças genéticas entre os isolados do vírus provenientes de cada um dos grupos em questão. Um fato preocupante é que esses animais são comumente criados como

animais de estimação na região (Gomes 2004, Bernardi *et al.* 2005).

No Mato Grosso, Jorge (2008) encontrou anticorpos neutralizantes no soro de um puma (*P. concolor*), um cachorro-do-mato (*C. thous*), um mão-pelada (*P. cancrivorus*), e um cachorro-vinagre (*S. venaticus*). Em levantamento realizado nos biomas Cerrado e Pantanal em cinco localidades, 26 de 211 carnívoros selvagens amostrados foram considerados positivos ao sorodiagnóstico, sendo 13 de 91 lobos guarás capturados (*C. brachyurus*), quatro de 69 cachorros-do-mato (*C. thous*), um de um cachorro-vinagre (*S. venaticus*), três de 13 onças pintadas (*P. onca*), duas de 10 jaguatiricas (*L. pardalis*), 1 de 8 pumas (*P. concolor*), um de cinco gatos palheiros (*Leopardus colocolo* Molina 1782) e um de 13 mãos-peladas (*P. cancrivorus*) (Jorge *et al.* no prelo). Nas demais regiões do país, informações sobre a exposição dos canídeos silvestres são insuficientes ou inexistentes.

Os dados de literatura sobre a exposição de carnívoros selvagens de vida livre ao vírus da raiva em diversas partes do planeta aqui mencionados demonstram que estes animais podem representar reservatórios importantes do agente regionalmente, como também podem ter sua sobrevivência ameaçada por ele. É possível constatar também que, no Brasil, apesar de os esforços do Ministério da Saúde no controle da raiva ainda estarem voltados principalmente à vacinação dos cães domésticos, a preocupação com a circulação do vírus rábico em animais silvestres tem aumentado significativamente. O diagnóstico de um ciclo do vírus da raiva em canídeos silvestres na região Nordeste do país deve ser tratado com bastante atenção. Estudos suplementares sobre a circulação do vírus em animais silvestres no Brasil devem ser incentivados e medidas voltadas ao controle da ocorrência do agente na fauna silvestre devem começar a ser planejadas e testadas, com base nas ações adotadas com sucesso na Europa e América do Norte, como, por exemplo, a vacinação oral.

LEPTOSPIRA SPP.

Grupo de espiroquetas patogênicas causadoras da leptospirose com mais de 170 sorovares organizados em 19 sorogrupos (Roth 1972, Nielsen *et al.* 1989). A leptospirose é uma zoonose cosmopolita (Corrêa e

Passos 2001) que acomete a maioria dos mamíferos (Thiermann 1984). Estes podem se tornar portadores, contribuindo assim para disseminação do agente. Ocorre no meio urbano, rural e silvestre, de forma epidêmica ou endêmica, dependendo das interações de fatores ambientais e dos diferentes grupos animais hospedeiros (Vasconcellos 1987). Os sinais clínicos mais observados são espasmos musculares, incoordenação, icterícia, hemoglobinúria, febre, perda de peso, vômitos, podendo levar à morte (Horsh 1999, Levett 2001).

Mamíferos com alta susceptibilidade para infecção, sem sintomatologia clínica ou com forma branda podem ser considerados reservatórios (Leighton & Kiuken 2001). *A Leptospira* spp. se aloja nos rins (Correa & Passos 2001) e é eliminada pela urina dos portadores por poucas semanas ou vários meses entre os animais domésticos, e por toda vida no caso dos roedores (Webster *et al.* 1995). Os animais se contaminam através da pele íntegra (imersa por longo período na água) e mucosas, assim como pela ingestão por água e alimentos contaminados (Levett 2001, Corrêa 2007).

Levantamentos sorológicos em carnívoros selvagens de cativeiro no Brasil demonstram níveis significativos de exposição em canídeos e felídeos (Guerra-Neto *et al.* 2004, Corrêa *et al.* 2004).

Ao testar através de diagnóstico sorológico diversas espécies de mamíferos capturados no estado do Tocantins, Souza Júnior *et al.* (2002) detectaram quatro dentre 31 quatis (*N. nasua*) e dois dentre 10 cachorros-do-mato (*C. thous*) positivos, mas sem sinais clínicos no momento da captura. Jorge (2008) testou 75 carnívoros selvagens capturados em uma reserva no Pantanal do Mato Grosso e 32 foram considerados positivos para exposição (17 de 43 cachorros-do-mato *C. thous* testados, três de oito lobos-guará *C. brachyurus*, um de um cachorro-vinagre *S. venaticus*, seis de 12 mãos-peladas *P. cancrivorus*, dois de sete pumas *P. concolor* e três de quatro jaguatiricas (*L. pardalis*). Os cachorros-do-mato (*C. thous*) foram a espécie mais intensamente amostrada e, portanto, aquela cuja frequência encontrada deve ser a mais próxima da prevalência real. A proporção de indivíduos da espécie sorologicamente positivos foi bastante considerável (40%). O resultado encontrado em mãos-peladas (*P. cancrivorus*) é importante por se tratar de espécie filogeneticamente próxima ao

guaxinim norte-americano (*P. lotor*), considerado reservatório nos EUA (Mitchell 1999). A detecção de indivíduos positivos em todas as espécies de carnívoros selvagens amostradas no norte do Pantanal (Jorge 2008) indica que a cadeia epidemiológica da leptospirose é bastante complexa na região.

O maior impacto nas populações de mamíferos selvagens tem sido os registros de abortamento e perdas reprodutivas (Roth 1972). No entanto, o real papel dos carnívoros no ciclo da leptospirose e o impacto desta nas populações de vida livre, ainda são desconhecidos.

LEISHMANIA SPP.

As leishmanioses, complexo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, são consideradas reemergentes em algumas regiões e emergentes em outras e constituem um grave problema de saúde coletiva. Atualmente, são endêmicas em 88 países e mais de 350 milhões de pessoas estão em risco, com incidência estimada em dois milhões de novos casos por ano (Desjeux 2004).

Na América Latina, as espécies de *Leishmania* causam duas doenças com diferentes formas clínicas nos seres humanos: a leishmaniose visceral americana (LVA), que é fatal se não tratada, e a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que inclui as formas cutânea, cutâneo-mucosa ou cutâneo-difusa, que podem causar severas lesões mutilantes. A transmissão ocorre pela picada de insetos de fêmeas de diferentes espécies de flebotomíneos (Diptera: Phlebotominae), conhecidos popularmente, como mosquito palha e birigui, entre outros (Brasil 2007).

No Brasil, a LVA predomina na região nordeste, mas vem se expandindo para o restante do país, com média anual de 3.156 casos nos últimos dez anos (Brasil 2003). Sua transmissão vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do país, inclusive na região Sul, considerada livre da doença até 2008 (Souza *et al.* 2009). A LTA é uma zoonose amplamente distribuída no território brasileiro, ocorrendo em todas as regiões do país. Segundo o Ministério da Saúde, a média anual de casos autóctones entre os anos de 1985 e 2005 foi de 28.568, sendo que entre 1988 e 2005 o número de casos por ano oscilou entre 20.000 e 36.000 (Brasil 2007).

Os reservatórios primários de *Leishmania* spp. são mamíferos selvagens de diversas ordens, especialmente roedores e canídeos selvagens (Ashford 2000, Dantas-Torres 2007, Beck *et al.* 2008). Contudo, com o crescente aumento do processo de domiciliação do ciclo zoonótico de transmissão das leishmanioses, cães domésticos têm assumido importante papel como reservatórios da infecção, sendo fundamentais na transmissão para humanos (Moreno & Alvar 2002, Dantas-Torres 2007).

No Velho Mundo, inquéritos sorológicos reportaram a presença de *Leishmania* spp. em diversas espécies de carnívoros selvagens, como em raposas vermelhas (*V. vulpes*) em Portugal (Semião-Santos *et al.* 1996), Itália (Mancianti *et al.* 1994), Espanha (Fisa *et al.* 1999; Portús *et al.* 2002) e Israel Central (Baneth *et al.* 1998) e em chacais (*Canis aureus* Linnaeus 1758) no Iran, Iraque, Israel Central e Cazaquistão (Baneth *et al.* 1998, Mohebalí *et al.* 2005).

Estudos utilizando diagnóstico por reação de polimerase em cadeia (PCR) reportaram prevalências de 4% nas raposas (*V. vulpes*) da Espanha Central (Criado-Fornalio *et al.* 2000) e 40% no sul da Itália (Dipineto *et al.* 2007). No Iran, um lobo (*C. lupus*) foi positivo (Mohebalí *et al.* 2005). Mais recentemente, Sobrino *et al.* (2008) detectaram o DNA do parasita em amostras de sangue ou baço em 16,2% dos carnívoros selvagens da Espanha analisados, incluindo oito dos 39 (20,5%) lobos-cinzentos (*C. lupus*) testados, 23 das 162 (14,1%) raposas (*V. vulpes*), dois dos 7 sete (28,6%) mangustos egípcios (*Herpestes ichneumon* Linnaeus 1758), 1 dos 4 genetas (*Genetta genetta* Linnaeus 1758) e um dos quatro linces-ibéricos (*Lynx pardinus* Temminck 1827). Na Croácia, pesquisadores encontraram um lobo-cinzento (*C. lupus*) morto com lesões características de leishmaniose visceral canina. As análises patológicas e parasitológicas confirmadas por PCR indicaram que as lesões eram associadas a *L. infantum* e os pesquisadores sugeriram que este era o primeiro relato de morte de um lobo-cinzento devido a lesões causadas por *L. infantum* (Beck *et al.* 2008).

No Brasil, estudos pioneiros de Deane e Deane (1954) descreveram os primeiros relatos de infecção natural por *Leishmania* spp. em raposa-do-campo (*L. vetulus*) e seu possível papel como reservatório. Entretanto, Courtenay *et al.* (1996) demonstraram, através de estudos comparativos de morfologia

cranial e dental e distribuição geográfica, que os espécimes encontrados por Deane e Deane no Ceará foram erroneamente identificados e concluíram que o canídeo silvestre envolvido era o cachorro-domato (*C. thous*), questionando o papel das raposas-do-campo (*L. vetulus*) como reservatório naquela ocasião.

Cachorros-do-mato (*C. thous*) têm sido considerados por diversos autores como potenciais fontes de infecção por LVA para humanos por demonstrarem altas prevalências (em alguns casos, acima de 42%) de infecção parasitologicamente confirmadas (Deane & Deane, 1955, Silveira *et al.* 1982, Lainson *et al.* 1990, Courtenay *et al.* 1994) e terem altas taxas de contato com cães infectados e com o principal vetor *Lu. longipalpis* (Courtenay *et al.* 2001).

Outros estudos relatam a exposição à *Leishmania* spp. em carnívoros silvestres de vida livre. Curi *et al.* (2006) reportaram a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* em canídeos silvestres da Serra do Cipó, Minas Gerais. Dos 21 animais analisados, dois lobos-guarás (*C. brachyurus*) e dois cachorros-do-mato (*C. thous*) foram positivos. Mais recentemente, no Estado do Paraná, dois cachorros-do-mato, duas raposas-do-campo, um quati (*N. nasua*) e um mão-pelada (*P. cancrivorous*) foram positivos no inquérito sorológico realizado por Voltarelli *et al.* (2009). No Norte do Pantanal, através de técnicas moleculares, espécimes de lobo-guará, cachorro-do-mato, mão-pelada e jaguatirica (*L. pardalis*) foram diagnosticados como naturalmente expostos a *Leishmania braziliensis* (Jorge 2008).

Em carnívoros silvestres mantidos em cativeiro, Figueiredo *et al.* (2008) diagnosticaram infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em um cachorro-vinagre (*S. venaticus*) capturado na natureza no Mato Grosso e mantido em cativeiro na Fundação Jardim Zoológico do Rio de Janeiro. Outros dois cachorros-vinagres apresentaram sinais clínicos de leishmaniose no Centro de Conservação da Fauna silvestre em Ilha Solteira, SP (Lima *et al.* 2009). Ambos foram positivos no teste de ELISA e apresentaram formas amastigotas do parasita em esfregaços de linfonodo. Amostras de tecido de um deles foram avaliadas por PCR e os pesquisadores detectaram DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de fígado e linfonodo, entretanto os testes foram

negativos nas amostras de baço e pele. Após piora do quadro clínico, ambos os indivíduos vieram a óbito (L. Souza, comunicação pessoal). Luppi *et al.* (2008) reportaram sorologia positiva para cachorro-do-mato (*C. thous*), lobo-guará (*C. brachyurus*), raposa-do-campo (*L. vetulus*) e cachorro-vinagre (*S. venaticus*) do zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais. Destes, um cachorro-vinagre (*S. venaticus*) e uma raposa-do-campo (*L. vetulus*) desenvolveram sinais clínicos. O primeiro veio a óbito e o segundo foi eutanasiado devido à sua péssima condição clínica e prognóstico. Na necropsia, ambos apresentaram lesões características de leishmaniose visceral confirmadas por diagnóstico histopatológico e imunohistoquímico. Dahroug *et al.* (2010) reportaram ainda a infecção por *L. (L.) chagasi* em cinco pumas (*P. concolor*) e uma onça-pintada (*P. onca*).

Os estudos citados demonstram o possível envolvimento dos carnívoros selvagens na epidemiologia das leishmanioses. Contudo, é necessário um aprofundamento maior para esclarecer os papéis desempenhados pelas diferentes espécies de carnívoros silvestres na epidemiologia das leishmanioses nas diversas regiões de sua ocorrência. Ainda, o potencial impacto das diferentes espécies de *Leishmania* sobre as populações de carnívoros selvagens é pouco conhecido.

Outro aspecto importante a ser considerado diz respeito ao crescente aumento do contato entre espécies selvagens e domésticas e ao intercâmbio de espécimes entre zoológicos. Embora a população de canídeos silvestres seja insignificante quando comparada à de cães domésticos, a translocação de animais infectados de um zoológico para outro pode eventualmente levar à disseminação da doença (Figueiredo *et al.* 2008, Luppi *et al.* 2008). Este contato pode ainda resultar em novas áreas endêmicas, visto que novos casos humanos podem se originar a partir da expansão de um foco residual (Ashford 1996).

Em relação às medidas de controle, o programa brasileiro de controle da leishmaniose visceral (Brasil 2003) se baseia no tratamento dos casos humanos, controle do vetor pelo uso de inseticidas e controle de reservatório canino (inquérito sorológico de cães e eutanásia de cães soropositivos). No caso de animais de cativeiro, medidas como uso permanente de coleiras impregnadas com deltametrina e controle químico por borrifação de piretróide a cada três meses

devem ser adotadas em áreas endêmicas (Luppi *et al.* 2008). Em animais silvestres infectados, várias questões devem ser consideradas antes de se optar pela eutanásia, visto que algumas espécies são ameaçadas de extinção como o lobo-guará e o cachorro-vinagre e não existe informação suficiente sobre o potencial de transmissão das diversas espécies de carnívoros brasileiros. Desta forma, entender o papel que os carnívoros silvestres desempenham na manutenção e expansão dos ciclos de transmissão de *Leishmania* spp. é essencial na definição de medidas efetivas de controle dessa parasitose.

ECTOPARASITAS

Pertencentes à classe Arachnida e ordem Acarina (Allan 2001), os carrapatos são um dos mais importantes grupos de ectoparasitas de vertebrados terrestres, voadores e semi-aquáticos em todos os continentes do mundo, inclusive Antártida (Labruna *et al.* 2005). Alimentam-se de sangue e fluidos tissulares, causam perturbação e alterações como anemia, lesões cutâneas e hipersensibilidade (Hargis 1990), embora o principal papel epidemiológico seja como vetor de uma grande variedade de agentes patogênicos (Allan 2001).

Populações de animais na natureza são reguladas por fatores abióticos e bióticos. Dentre estes estão os parasitas (Borgsteede 1996). Hospedeiros e parasitas evoluíram em paralelo ao longo de milhares de anos e diferentes carrapatos dependem da presença de uma ou mais espécies de hospedeiro para desenvolver o ciclo biológico completo (Grenfell & Gulland 1995, Poulin 1997, Labruna *et al.* 2005).

Com a fragmentação do ambiente, as extinções locais de mamíferos selvagens têm ocorrido de maneira cada vez mais frequente (Fahrig & Merriam 1994) e, portanto, muitos carrapatos têm tido dificuldade para desenvolver seu ciclo biológico nos hospedeiros específicos, o que os faz procurar novas espécies para completar o ciclo, criando novas relações hospedeiro-parasita (Poulin 1997). Estas novas relações podem acarretar debilidade ao novo hospedeiro, podendo inclusive levá-lo a óbito (Borgsteede 1996).

Os carrapatos geralmente passam 90% de seu ciclo fora do hospedeiro, o que os torna vulneráveis a modificações ambientais. O estudo das espécies de carrapatos dos carnívoros pode indicar escalas de

alteração ambiental em determinadas áreas (Labruna *et al.* 2005). O estudo evolutivo de parasitas ajuda a compreender seu papel na dinâmica das populações de seus hospedeiros (Grenfell & Gulland 1995), uma vez que eles podem representar uma ameaça às pequenas populações vulneráveis de animais selvagens de vida livre (Cleveland *et al.* 2003) pela transmissão de patógenos.

A extensa área de vida que os carnívoros geralmente possuem (Emmons 1999) e o contato com diversas espécies de presas (Oliveira 1994) aumentam o risco de infestação por diferentes gêneros de carrapatos (Labruna *et al.* 2005). Alterações ambientais, principalmente por influência humana, podem também proporcionar contato com novas espécies (Borgsteede 1996).

Carrapatos alimentam-se em uma grande variedade de vertebrados domésticos e silvestres (Randolph *et al.* 2003), podendo transmitir entre os hospedeiros diversos patógenos, como, por exemplo, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* spp. e *Cytauxzoon felis* (Röken 1993). No entanto, a presença de carrapatos nos hospedeiros nem sempre é correlacionada com a presença de hemoparasitas. *Babesia* spp. e *Ehrlichia* spp. são encontrados em guaxinins norte-americanos (*P. lotor*) (Comer *et al.* 2000), mas não há registros em procionídeos na América do Sul (Gomes-Solecki 2001).

Labruna *et al.* (2005) descrevem as espécies de carrapatos que já foram encontradas parasitando carnívoros, sendo o gênero *Amblyomma* o mais encontrado: *Amblyomma ovale* (14 espécies), *Amblyomma cajenense* (10 espécies), *Amblyomma aureolatum* (10 espécies), *Amblyomma tigrinum* (sete espécies), *Amblyomma parvum* (sete espécies). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi encontrado em sete espécies de carnívoros. Esta espécie de carrapato tem o gado como hospedeiro primário, o que indica a presença dos carnívoros utilizando áreas de pastagem de bovinos.

Os ácaros são da mesma classe e ordem dos carrapatos, mas apresentam seu ciclo biológico na epiderme de mamíferos. Entre 1994 e 1996, em populações de quatis (*Nasua narica* Linnaeus 1766) na região oeste do México, *Notoedres cati* causou epizootia com maior impacto nas populações com menor grau de isolamento e áreas mais fragmentadas

pela influência humana (Valenzuela *et al.* 2000). Em populações de coiotes (*C. latrans*) monitoradas entre 1974 e 1991 no sudeste do estado do Texas, nos Estados Unidos, a sarna sarcóptica (*Sarcoptes scabiei*) foi diagnosticada inicialmente em 1975 e teve um pico em 1980, com 69% dos animais infectados, tendo decrescido até 1991 (Pence & Windberg 1994). O maior impacto foi na redução da ovulação e prenhez das fêmeas. Foi observada alta taxa de infecção nos machos adultos.

No Brasil, estudos sobre a presença e impacto das sarnas nas diferentes espécies de mamíferos são escassos. Jorge *et al.* (2008) capturaram um casal de cachorros-vinagres (*S. venaticus*) em Nova Xavantina (MT). Ambos os animais apresentavam rarefação pilosa. Foram equipados com rádios-colares e monitorados por rádio-telemetria. Após três meses, o macho veio a óbito. A fêmea foi recapturada para realização de raspados de pele. Após o diagnóstico de *S. scabiei*, a fêmea foi tratada através de duas aplicações do antiparasitário selamectina, com 35 dias de intervalo. O tratamento apresentou bons resultados. Relatos de moradores que observaram canídeos silvestres na região apresentando alopecia, além do monitoramento de outro grupo de cachorros-vinagres no qual os animais apresentaram alopecia e vieram a óbito sem, no entanto, ter sido realizado o diagnóstico (E.S. Lima, resultados não publicados), reforçam o potencial impacto da sarna sarcóptica na população desta espécie na região de Nova Xavantina.

CONSIDERAÇÕES SOBRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Os estudos de exposição de carnívoros selvagens de vida livre a patógenos realizados na América do Sul envolveram principalmente levantamentos por sorodiagnóstico. À exceção do estudo de exposição ao vírus da raiva na região Nordeste (Bernardi *et al.* 2005, Carnieli *et al.* 2006, 2008) e do relato de sarna sarcóptica em cachorros-vinagres (Jorge *et al.* 2008), nenhum dos trabalhos realizados em nosso continente possibilitou detectar objetivamente morbidade ou mortalidade em decorrência da exposição a patógenos. Portanto, é necessário o incentivo à realização de estudos que busquem elucidar se de fato esta exposição está ameaçando a viabilidade das populações de carnívoros selvagens da fauna

brasileira ou mesmo interferindo de alguma forma na sua estrutura.

Neste sentido, estudos com animais de cativeiro são importantes, pois possibilitam acompanhar a evolução clínica, mortalidade e o possível impacto de determinados patógenos na saúde dos animais silvestres, o que seria muito difícil de ser realizado em indivíduos ou populações de vida livre. Alguns exemplos importantes são a observação de que o vírus da cinomose pode causar mortalidade em onças pintadas *P. onca* (Appel *et al.* 1994) e o desenvolvimento de sinais clínicos seguido de morte por leishmaniose visceral em canídeos silvestres mantidos em cativeiro (Luppi *et al.* 2008).

Da mesma forma, estudos envolvendo infecção experimental também podem elucidar aspectos da relação entre patógeno e hospedeiro que apenas podem ser explorados através do controle dos diversos fatores que envolvem um processo infeccioso. Herrera *et al.* (2001, 2002), por exemplo, observaram a resposta clínica, humoral e parasitológica de quatis experimentalmente infectados por *Trypanosoma evansi* e concluíram que a persistente parasitemia e a relativa tolerância dos quatis aos sinais clínicos da doença sugerem que esta espécie desenvolve uma doença crônica e tem importante papel na epidemiologia da mesma em áreas endêmicas. Courtenay *et al.* (2002) expuseram cachorros-domato (*C. thous*) capturados no Marajó, Pará (alguns deles diagnosticados posteriormente como expostos à *L. chagasi*), assim como cães domésticos da mesma região, a espécimes do vetor criados em cativeiro. Os autores observaram que os canídeos selvagens não infectaram os vetores, diferentemente dos domésticos. Desta forma, eles inferem que a espécie, a mais estudada dentre os canídeos selvagens com relação à exposição à *L. chagasi* e frequentemente citada como potencial reservatório silvestre do agente, não teria grande importância na transmissão do agente por sua baixa infectividade para o vetor. Tais estudos demonstram como trabalhos com infecção experimental podem esclarecer aspectos do efeito e da patogenia do patógeno no hospedeiro, assim como aspectos epidemiológicos, como o papel de uma determinada espécie silvestre no ciclo de transmissão de um agente patogênico.

As técnicas moleculares vêm tendo papel fundamental e devem ser cada vez mais utilizadas

nos levantamentos futuros e mesmo naqueles já realizados, mas que colheram e armazenaram material para análises posteriores. Elas têm a vantagem de, em alguns casos, possibilitar determinar quais agentes estão de fato sendo transmitidos dos animais domésticos para os selvagens e quais estão circulando e sendo mantidos pelos animais selvagens, podendo, eventualmente ser transmitidos aos domésticos e aos seres humanos. Um exemplo interessante são os estudos de Carnieli *et al.* (2006, 2008), que demonstraram que o vírus da raiva tem circulado entre os canídeos silvestres há algum tempo, e que estes animais vêm mantendo um ciclo do agente independente dos animais domésticos. Outro exemplo é o estudo de Biek *et al.* (2006) que descreveram detalhes da estrutura populacional e recente história demográfica da população de pumas (*P. concolor*) de Rocky Mountains (EUA) através do estudo das linhagens genéticas dos vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) que acometiam esses animais. Segundo os autores, o uso de ferramentas moleculares, especialmente com patógenos de transmissão direta e evolução rápida, pode trazer informações substanciais sobre características espaciais e temporais do contato entre hospedeiros.

Por outro lado, as técnicas de diagnóstico sorológico têm uma grande importância por detectarem anticorpos produzidos para o combate aos patógenos, possibilitando que, mesmo que o agente já não circule no organismo do animal nem esteja sendo eliminado, seja possível encontrar indícios indiretos de sua circulação. Ainda assim, é importante destacar que estas técnicas apresentam o inconveniente de não diagnosticarem animais positivos no início da infecção, quando apesar de estar infectado, o organismo ainda não produziu uma quantidade de anticorpos passível de ser detectada. Adicionalmente, estas técnicas também têm a limitação de sofrer a influência de reações inespecíficas e possíveis reações cruzadas com patógenos antígenicamente relacionados e, como são desenvolvidas para animais domésticos, é necessário cautela para se decidir os pontos de corte utilizados para as espécies silvestres. Um ponto de corte muito baixo pode gerar resultados enganosos, considerando como expostos indivíduos que na realidade não o foram, enquanto um ponto de corte muito alto pode desconsiderar a exposição dos animais a um patógeno que de fato circula entre eles.

Na realidade, o ideal para estudos que procuram pesquisar a exposição de animais selvagens a agentes patogênicos é a realização, sempre que possível, tanto de métodos moleculares, como sorológicos e parasitológicos, aliados ao exame clínico e exames complementares, como hemograma e bioquímica sérica. Vale ressaltar que o diagnóstico de uma espécie ou indivíduo infectado não define sua importância na cadeia de transmissão, especialmente considerando-se que as redes de transmissão de patógenos flutuam no tempo e no espaço. A interpretação dos resultados depende de diversos fatores, como características ecológicas das espécies de hospedeiros na região estudada, local de amostragem dos animais, evolução da infecção nos indivíduos amostrados, suas variações e aspectos relacionados, entre outros, na tentativa de se criar um cenário da transmissão e assim inferir os possíveis riscos e definir as estratégias de controle.

O fato é que apenas estudos multidisciplinares de longo prazo, envolvendo aspectos ecológicos e monitoramento de populações de forma contínua, aliados à pesquisa da ocorrência de patógenos, procurando determinar relações entre estes fatores, poderão determinar de forma efetiva a importância de agentes infecciosos e parasitários para a conservação dos carnívoros selvagens da fauna brasileira, assim como sua importância no ciclo epidemiológico de agentes que afetam o homem e animais domésticos.

ESTRATÉGIAS DE MANEJO E MEDIDAS DE CONTROLE

O controle de patógenos frequentemente presentes em animais domésticos que podem infectar e ameaçar populações de animais selvagens pode ser focado na implementação de medidas voltadas à redução da incidência do agente nos animais domésticos de uma determinada região, daquelas direcionadas diretamente aos animais selvagens, como também pode estar voltada para a limitação do contato entre estes dois grupos (Laurenson *et al.* 2005).

Para reduzir as interações entre animais domésticos e carnívoros selvagens seria necessário limitar fisicamente o contato entre eles. Isto poderia hipoteticamente ser realizado através da implementação de uma zona tampão ao redor de áreas protegidas, onde fosse proibida a presença de animais domésticos. No entanto, certamente haveria

uma enorme resistência dos moradores do entorno destas áreas.

A alternativa aparentemente mais viável para diminuir o potencial impacto de doenças infecciosas na população de carnívoros selvagens de vida livre é o controle dos agentes em animais domésticos, especialmente nos cães. Para isto, é necessário implementar campanhas anuais de vacinação para as doenças de interesse nos animais domésticos das comunidades que residem no entorno de áreas protegidas, de forma continuada. Entretanto, para que um programa de vacinação seja bem sucedido, é importante que algumas medidas complementares sejam realizadas de forma concomitante. A realização de vacinação em massa de cães domésticos em uma determinada região sem a implementação de um programa de controle populacional, por exemplo, pode acarretar em aumento significativo da população, devido à retirada de um fator que provavelmente tem um papel importante no controle demográfico dos cães. Neste cenário, caso a vacinação seja suspensa após algum tempo, a quantidade de animais suscetíveis passará a ser ainda maior do que aquela existente no momento anterior à sua implementação. Desta forma, caso um patógeno seja introduzido nesta nova população hipotética, causará uma epizootia ainda mais intensa do que as ocorridas anteriormente (Woodroffe 1999, Woodroffe *et al.* 2004). Assim, implementar concomitantemente à vacinação técnicas para o controle da população de cães nestas comunidades, como a realização de campanhas de castração e campanhas educativas de posse responsável, é fundamental para o sucesso dessa estratégia.

A vacinação de cães domésticos tem ainda a vantagem de poder abranger tanto agentes infecciosos de interesse para a conservação de animais selvagens como aqueles de importância em Saúde Pública e animais de criação. Desta forma, a vacinação pode envolver uma cooperação entre instituições com interesses diversos, como governo, associações de criadores, conservacionistas, entre outros, possibilitando a divisão de custos e tarefas.

Outra possibilidade de intervenção são as medidas de controle de patógenos implementadas diretamente nas populações de carnívoros selvagens de vida livre. Algumas opções são: a vacinação direta dos carnívoros selvagens, a diminuição da densidade

de populações de espécies consideradas como reservatórios de patógenos que acometem o homem ou animais domésticos através da eutanásia, ou o tratamento de indivíduos infectados.

Em relação à vacinação direta dos carnívoros selvagens, um exemplo importante é a realização de vacinação anti-rábica oral de canídeos silvestres na Europa e América do Norte que vem sendo realizada há vários anos, permitindo um sucesso significativo no controle da doença nestes continentes (Cross *et al.* 2007). Esta iniciativa foi implementada com o intuito de diminuir o número de animais suscetíveis, interrompendo a transmissão do vírus entre os indivíduos das espécies consideradas como reservatórios regionais do agente (principalmente a raposa vermelha, *V. vulpes*), com o objetivo de atingir um problema de Saúde Pública que ocorria nestas regiões. É possível que no Brasil intervenção semelhante seja necessária na região Nordeste do país, uma vez que o *C. thous* já foi identificado como reservatório regional da raiva (Carnieli *et al.* 2008). Por outro lado, este tipo de abordagem, quando realizado com vistas à conservação de carnívoros selvagens, ocorreu apenas em ocasiões isoladas, em situações emergenciais, sem utilizar uma metodologia que permitisse avaliar sua efetividade, como, por exemplo, comparações entre grupos vacinados e controle. Portanto, ainda necessita muita discussão e experimentação para poder provar sua efetividade (Woodroffe 1999, Laurenson *et al.* 2005).

Muitas vacinas utilizam na sua composição agentes vivos atenuados para uma espécie doméstica, como o cão, e por ocasião de sua aplicação em uma espécie selvagem filogeneticamente próxima, podem causar a doença e mesmo o óbito do animal vacinado. Por outro lado, não é certo que a aplicação de uma vacina desenvolvida para outra espécie resulte na imunidade desejada, especialmente caso seja aplicada em dose única, como deve ocorrer com frequência em programas de vacinação parenteral em animais selvagens.

Outro método historicamente utilizado para o controle da circulação de patógenos em animais silvestres com o intuito de diminuir a ocorrência de uma determinada doença de interesse para o ser humano é a eliminação de indivíduos da espécie considerada como reservatório, através da eutanásia. Este visa reduzir a população de indivíduos suscetíveis

da espécie alvo abaixo de um determinado nível, fazendo, desta forma, com que se torne impossível ao patógeno manter-se circulando nestas condições (Cross *et al.* 2007).

No entanto, esta estratégia de manejo apresenta alguns argumentos contrários à sua utilização. Um deles está relacionado à sua viabilidade financeira. Frequentemente, o resultado da redução da incidência de um patógeno obtido ao se eliminar animais silvestres, não justifica os recursos financeiros gastos (Cross *et al.* 2007). Muitas vezes, os mecanismos ecológicos de regulação das populações de algumas espécies de animais silvestres fazem com que, após algum tempo, o número de indivíduos suscetíveis passe a ser equivalente ao momento anterior ao início da utilização desta medida, ou ainda mais elevado. Outro argumento desfavorável é a possibilidade de impacto ecológico sobre espécies consideradas ameaçadas de extinção. Neste caso a utilização deste tipo de abordagem é totalmente inaceitável, e, em muitos países, é também ilegal.

Na Europa e América do Norte, a redução da população de carnívoros selvagens de médio porte foi amplamente utilizada até aproximadamente 1975 com o intuito de controlar a transmissão do vírus da raiva aos seres humanos por estes animais. Entretanto, o método apresentou resultados pouco efetivos e sua relação custo-benefício demonstrou-se amplamente desfavorável. Durante o período de sua utilização ocorreu um espalhamento geográfico das regiões enzoóticas. Apenas reduções transitórias nos níveis de incidência da doença foram observadas (Aubert 1999). Diante destes resultados, a eliminação de carnívoros selvagens passou a ser substituída ao longo da década de 1970 por programas de vacinação oral em larga escala, metodologia que se mostrou amplamente eficaz no controle da doença.

A eutanásia dos texugos (*Meles meles* Linnaeus 1758) no Reino Unido para controle do *Mycobacterium bovis*, agente causador da tuberculose bovina tem sido um componente da política de controle da tuberculose no Reino Unido por três décadas. Entre 1975 e 1997 mais de 20 mil texugos foram eutanasiados (Donnelly *et al.* 2003). Apesar dos esforços, a incidência de tuberculose nos bovinos tem aumentado consistentemente e reemergido como uma das principais preocupações da indústria pecuária europeia. Experimentos de campo em larga

escala demonstraram que essa estratégia pode causar tanto o aumento quando a diminuição da incidência de tuberculose em bovinos, visto que a eutanásia dos texugos reduz a incidência de tuberculose nos bovinos localmente, mas aumenta a incidência nas áreas adjacentes especialmente em locais onde a paisagem permite que os texugos recolonizem novas áreas (Donnelly *et al.* 2003, 2006).

Outra alternativa para o controle da circulação de patógenos em carnívoros selvagens é o tratamento de animais infectados. O tratamento clínico de infecções virais em carnívoros selvagens raramente é possível, mas existem casos de programas que obtiveram sucesso em tratamento de surtos com infecções bacterianas e com macro e ectoparasitas (Woodroffe 1999). Valenzuela *et al.* (2000), por exemplo, combinaram estratégias de tratamento de animais com acaricidas e eutanásia, dependendo da severidade da infecção nos indivíduos, para conter um surto de sarna em quatis-do-focinho-branco (*N. narica*).

Apesar das diversas opções de intervenções expostas, a necessidade de se intervir em populações de animais selvagens de vida livre deve sempre ser avaliada com cautela. Artois (2003) recomenda que os pesquisadores envolvidos nesta área do conhecimento devem comparar a evolução esperada de uma infecção na presença e ausência de uma estratégia de controle e exemplifica casos em que uma intervenção inadequada pode diminuir a dispersão natural da doença, aumentando o período de duração de suas conseqüências (Smith & Harris 1991, Tischendorf *et al.* 1998).

É importante que ocorra uma ampla discussão entre pesquisadores e órgãos do governo como os Ministérios do Meio Ambiente, da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, assim como as autarquias e centros de referência a eles vinculados, sobre as estratégias de manejo e medidas de controle aqui mencionadas para que protocolos seguros sejam elaborados e testados, possibilitando sua utilização com base em resultados obtidos com o rigor científico necessário.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como podemos constatar em estudos realizados recentemente no Brasil e nos países vizinhos,

carnívoros selvagens de vida livre são expostos a patógenos que comumente causam morbidade e mortalidade em animais domésticos e que, historicamente, já causaram mortalidade em carnívoros de vida livre em outros continentes. Isto demonstra a importância de se levar em consideração a circulação de patógenos na elaboração dos planos de manejo das Unidades de Conservação (UCs), como também reforça a necessidade da implementação das zonas de amortecimento (faixa no entorno das UCs que visa diminuir o impacto das atividades antrópicas sobre a biota por ela protegida, Brasil, 2000) para áreas destinadas à proteção da fauna, inclusive com a implementação de medidas voltadas para o controle de patógenos em animais domésticos nestas áreas.

Os carnívoros selvagens são expostos também a agentes que causam agravos no homem e em animais domésticos. Apesar dos resultados de estudos apontarem para a possibilidade destes animais agirem como reservatórios para enfermidades como as leishmanioses, a raiva e a leptospirose, é necessário que se avalie de forma mais aprofundada o real papel deste grupo taxonômico no ciclo epidemiológico destas doenças, realizando estudos que determinem se eles são importantes na transmissão destes agentes.

Ao longo desta revisão, pudemos notar que a quantidade de informações a respeito da exposição dos carnívoros selvagens da fauna brasileira a agentes infecciosos e parasitários tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Estamos nos aproximando de um patamar onde os dados produzidos permitirão embasar a formulação de medidas de manejo efetivas para a conservação dos carnívoros selvagens sul-americanos como também para o controle da circulação de patógenos de importância em Saúde Pública. Evidentemente, os estudos envolvendo levantamentos de exposição a patógenos continuam, e continuarão por muito tempo, tendo grande relevância em nosso continente, pois ainda há muitas espécies de hospedeiros, microrganismos e regiões a serem contemplados. Mas é importante que os pesquisadores que atuam nesta área tenham sempre como objetivo final a aplicação destes conhecimentos para o planejamento do controle da circulação de patógenos de importância para a conservação da biodiversidade e para a Saúde Pública.

Oecol. Aust., 14(3): 686-710, 2010

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A.A. 2009. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*, 2: S7.
- ALEXANDER, K.A. & APPEL, M.J.G. 1994. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. *Journal of Wildlife Diseases*, 30: 481-485.
- ALEXANDER, K.A.; KAT, P.W.; MUNSON, L.A.; KALAKE, A. & APPEL, M.J.G. 1996. Canine distemper-related mortality among wild dogs (*Lycaon pictus*) in Chobe National Park, Botswana. *Journal of Zoo Wildlife Medicine*, 27: 426-27.
- ALLAN, S.A. 2001. Ticks (Class Arachnida: Ordem Acarina). Pp. 72-106. In: W.M. Samuel, M.J. Pybs & A.A. Kocan. (eds.). *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press. 536p.
- APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, 44: 187-191.
- APPEL, M.J.G. 1987. Canine distemper virus. Pp: 133-159. In: M.J.G. Appel (ed.). *Virus infections of carnivores*. Elsevier Science, Amsterdam. 516p.
- APPEL, M.J.G.; YATES, R.A.; FOLEY, G.L.; BERNSTEIN, J.J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L. H.; MILER, L.D.; ARP, L.H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; PEARCE-KELLING, S. & SUMMERS, B.A. 1994. Canine distemper enzootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3): 277-288.
- ARTOIS, M. 2003. Wildlife infectious disease control in Europe. *Journal Mountain Ecology*, 7 (supplement): 89-97.
- ASHFORD, R.W. 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14: 523-532.
- ASHFORD, R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30: 1269-1281.
- AUBERT, M.F. 1999. Costs and benefits of rabies control in wildlife in France. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties*, 18: 533-43.
- BANETH, G.; DANK, G.; KEREN-KORNBLATT, E.; SEKELES, E.; ADINI, I.; EISENBERGER, C.L.; SCHNUR, L.F.; KING, R. & JAFFE, C.L. 1998. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 59: 722-725.

- BARKER, I.K. & PARRISH, C.R. 2001. Parvovirus Infections. Pp. 3-36. In: E.S. Williams & I.K. Barker (eds.). Infectious diseases of wild mammals. (3ª edição). Iowa State University Press, Ames. 302p.
- BECK, A.; BECK, R.; KUSAK, J.; GUDAN, A.; MARTINKOVIC, F.; ARTUKOVIC, B.; HOHSTETER, M.; HUBER, D.; MARINCULIC, A. & GRABAREVIC, Z. 2008. A Case of Visceral Leishmaniasis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 451-456.
- BENGIS, R.G., KOCK, R.A. & FISCHER, J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 21: 53-65.
- BERNARDI, F.; NADIN-DAVIS, S.A.; WANDELER, A.I.; ARMSTRONG, J.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S.; NOGUEIRA, F.R.B. & ITO, F. H. 2005. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *Journal of General Virology*, 86: 3153-3162.
- BIEK, ROMAN, ALEXEI J DRUMMON & MARY POSS. 2006. A virus reveals population structure and recent demographic history of its carnivore host. *Science*, 311 (5760): 538-41.
- BORGSTEEDE, F.H.M. 1996. The Effect of Parasites on Wildlife. *The Veterinary Quarterly*, 18: S138- S140.
- BRASIL. 2000. Poder Executivo. *Lei nº 9.985* de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III, e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 19/07/2000. <http://www6.senado.gov.br/legislacao/ListaNormas.action?numero=009985&tipo_norma=LEI&data=20000718&link=s>. (Acesso em: 19/02/2008).
- BRASIL. 2003. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral* Brasília: Ministério da Saúde. 122p.
- BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. *Doenças transmissíveis: raiva humana*. <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21906>. (Acesso em: 07/12/2009).
- BRASIL. Ministério da Saúde. 2007. *Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana*. 2ª edição. Brasília: Ministério da Saúde. 182p.
- CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C.; POLLOCK, R.V.H. 1980. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *American Journal of Veterinary Research*, 41(5): 784-791.
- CARNIELI, P.; BRANDAO, P.E.; CARRIERI, M.L.; CASTILHO, J.G.; MACEDO, C.I.; MACHADO, L.M.; RANGEL, N.; CARVALHO, R.C.; CARVALHO, V.A.; MONTEBELLO, L.; WADA, M. & KOTAIT I. 2006. Molecular epidemiology of rabies virus strains isolated from wild canids in Northeastern Brazil. *Virus Research*, 120: 113-120.
- CARNIELI, P.; FAHL, W.O.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.O.; MACEDO, C.I.M.; DURYMANOVA, E.; JORGE, R.S.P.; MORATO, R.G.; SPINDOLA, R.O.; MACHADO, L.M.; SA, J.E.U.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. 2008. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Research*, 131: 33-46.
- CARTER G.R. & WISE D.J. 2005. Rhaboviridae. International Veterinary Information Service. <<http://www.ivis.org/advances/carter/Part2Chap19/chapter.asp?LA=1>>. (Acesso em 20/01/2010).
- CHILDS, J. 2002. Epidemiology. Pp. 113-161. In: A. C. Jackson & W.H. Wunner (eds.). *Rabies*. Academic Press, San Diego. 493p.
- CLEAVELAND, S.; APPEL, M.G.J.; CHALMERS, W.S.K.; CHILLINGWORTH, C.; KAARE, M.; DYE, C. 2000. Serological and Demographic evidence for domestic dog as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. *Veterinary Microbiology*, 72: 217-227.
- CLEAVELAND, S.; HESS, G.H.; DOBSON, A.P.; LAURENSEN, M.K.; McCALLUM, H.I.; ROBERTS, M.G. & WOODROFFE, R. 2003. The role of pathogens in Biological Conservation. Pp. 139-150. In: P.J. Hudson, A. Rizzoli, B.T. Grenfell, H. Heesherbeek & A.P. Dobson. *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford University Press. 218p.
- CLEAVELAND, S.; MESLIN, F.X. & BREIMAN, R. 2006a. Dogs can play useful role as sentinel hosts for disease. *Nature*, 440: 605.
- CLEAVELAND, S.; LAURENSEN, K.; FUNK, S.; PACKER, C. 2006b. Impact of viral infections in wild carnivore populations. Pp. 326-349. In: R.G. Morato; F.H.G. Rodrigues; E. Eizirik; P.R. Mangini; F.C.C. Azevedo & J. Marinho-Filho (orgs.). *Manejo e conservação de carnívoros neotropicais*. IBAMA, São Paulo. 396p.
- CLEAVELAND, S.; MLENGEYA, T.; KAARE, M.; HAYDON, D.; LEMBO, T.; LAURENSEN, M.K. & PACKER, C. 2007.

- The conservation relevance of epidemiological research into carnivore viral diseases in the serengeti. *Conservation Biology*, 21: 612-622.
- COMER, J.A.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W. & CHILDS, J.E. 2000. Detection of Antibodies Reactive with *Ehrlichia chaffeensis* in the raccoon. *Journal of Wildlife Diseases*, 36: 705-712.
- CORRÊA, S.H.R. 2007. Leptospirose. Pp. 736-741. In: Z.S. Cubas, J.C.R. Silva & J.L. Catão-Dias (eds. ou orgs.?). *Tratado de Animais Selvagens, Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo. 1354p.
- CORRÊA, S.H.R. & PASSOS, E.C. 2001. Wild Animals and Public Health. Pp. 493-499. In: M.E. FOWLER & Z.S. CUBAS. (eds.) *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press. 536p.
- CORRÊA, S.H.R.; VASCONCELLOS, S.A. & MORAIS, Z. 2004. Epidemiologia da Leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences*, 41: 189-193.
- COURTENAY, O.; MACDONALD, D.W.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. & DYE, C. 1994. Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. *Parasitology*, 109: 273-279.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L.M. & DYE, C. 2002. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*, 125: 407-414.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J. & CHALMERS, W.S.K. 2001. Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. *Veterinary microbiology*, 81: 9-19.
- COURTENAY, O.; SANTANA, E.W.; JOHNSON, P.J.; VASCONCELOS, I.A.B. & VASCONCELOS, A.W. 1996. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 498-502.
- CREEL, S.; CREEL, N.M.; MUNSON, L.; SANDERLIN, D. & APPEL, M.J. 1997. Serosurvey for selected viral diseases and demography of African wild dogs in Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases*, 33: 823-832.
- CRÍADO-FORNALIO, A.; GUTIERREZ-GARCIA, L.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F.; REUS-GARCIA, E.; ROLDAN-SORIANO, M.A. & DIAZ-SANCHEZ, M.A. 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary Parasitology*, 92: 245-251.
- CROSS, M.L.; BUDDLE, B.M. & ALDWELL, F.E. 2007. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. *The Veterinary Journal*, 174: 472-480.
- CURI, N. 2005. *Avaliação do estado de saúde e do risco de transmissão de doenças entre canídeos (Mammalia, Carnívora) silvestres e domésticos na região da Serra do Cipó, Minas Gerais: implicações para a conservação*. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em zoologia de vertebrados. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. 101p.
- CURI, N.H.A.; MIRANDA, I. & TALAMONI, S.A. 2006. Serologic evidence of leishmania infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian national park. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 99-101.
- DAHROUG, M.A.A.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SOUSA, V.R.F.; DUTRA, V.; TURBINO, N.C.M.R.; NAKAZATO, L. & SOUZA, R.L. 2010. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104: 73-74.
- DANTAS-TORRES, F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149: 139-146.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A. & HYATT, A.D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78: 103-116.
- DAVIDSON, W.R.; NETTLES, V.F.; HAYES, L.E.; HOWERTH, E.W. & COUVILLION, C.E. 1992. Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 28-33.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P. 1954. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *Hospital*, 45: 419-421.
- DEANE, L.M. & DEANE, M.P. 1955. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. *Hospital*, 48: 61-76.
- DEEM, S.L. & EMMONS, L.H. 2005. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and

- parasitic disease agents in the Noël Kempff Mercado National Park, Bolivia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36: 192-197.
- DESJEUX, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Disease*, 27: 305-318.
- DIPINETO, L.; MANNA, L.; BAIANO, A.; GALA, M.; FIORETTI, A.; GRAVINO, A.E. & MENNA, L.F. 2007. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 43:518-520.
- DOBSON, A.P. & CARPER, E.R. 1996. Infectious diseases and human population history. *Bioscience*, 46: 115-126.
- DONNELLY, C.A.; WOODROFFE, R.; COX, D.R.; BOURNE, F.J.; CHEESEMAN, C.L.; CLIFTON-HADLEY, R.S.; WEI, G.; GETTINBY, G.; GILKS, P.; JENKINS, H.; JOHNSTON, W.T.; LE FEVRE, A.M.; MCINERNEY, J.P. & MORRISON, W.I. 2006. Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle. *Nature*, 439: 843-846.
- DONNELLY, C.A.; WOODROFFE, R.; COX, D.R.; BOURNE, J.; GEORGE GETTINBY, G.; LE FEVRE, A.M.; MCINERNEY, J.P. & MORRISON, W.I. 2003. Impact of localized badger culling on tuberculosis incidence in British cattle. *Nature*, 426: 834-837.
- EMMONS, L.H. 1999. *Neotropical Rainforest Mammals, a field guide*. 2ª edição. The University of Chicago Press. 146p.
- FAHRIG, L. & MERRIAM, G. 1994. Conservation of Fragmented Populations. *Conservation Biology*, 8: 50-59.
- FIGUEIREDO, F.B.; GREMIÃO, I.D.; PEREIRA, S.A.; FEDULO, L.P.; MENEZES, R.C.; BALTHAZAR, D.A., SCHUBACHA, T.M.P. & MADEIRA, M.F. 2008. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102: 200-201.
- FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; BAY, G.; DURIGON, E.L.; JORGE, R.S.P.; LUTZ, H. & HOFMANN-LEHMANN, R. 2006. First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and Ehrlichia Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. *Journal of Wildlife Diseases*, 42: 470-477.
- FIORELLO, C.V.; NOSS, A.J.; DEEM, S.L.; MAFFEI, L. & DUBOVI, E.J. 2007. Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 551-557.
- FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GÁLLEGO, J. & PÓRTUS, M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology*, 83: 87-97.
- FLETCHER, K.C.; EUGSTER, A.K.; SCHMIDT, R.E. & HUBBARD, G.B. 1979. Parvovirus infection in maned wolves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175: 897-900.
- FUNK S.M.; FIORELLO C.V.; CLEVELAND, S. & GOMPPER, M.E. 2001. The role of disease in carnivore ecology and conservation. Pp. 443-466. In: J.L. Gittleman; S.M. Funk; R.K. Wayne & D. Macdonald (eds). *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 675p.
- GASCOYNE, S.C.; LAURENSEN, M.K.; LELO, S. & BORNER, M. 1993. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Serengeti region, Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases*, 29: 396-402.
- GILMOUR, J.S. & MUNRO, R. 1991. Wildlife disease: management or masterly inactivity? *Journal of Natural History*, 25: 537-541.
- GOMES-SOLECKI M.J.; WORMSER G.P.; PERSING D.H.; BERGER, B.W.; GLASS, J.D.; YANG, X.; DATTWYLER, R.J. 2001. A first-tier rapid assay for the serodiagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection. *Archives of Internal Medicine*, 161: 2015-2020.
- GOMES, A.A.B. 2004. *Epidemiologia da raiva: caracterização de vírus isolados de animais domésticos e silvestres do semi-árido paraibano da região de Patos, Nordeste do Brasil*. Tese de Doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 107p.
- GORDON, J.C. & ANGRICK, E.J. 1986. Canine parvovirus: Environmental effects on infectivity. *American Journal of Veterinary Research*, 47: 1464-1467.
- GREENE, C.E. & APPEL, M.J. 1998. Canine distemper. Pp. 9-22. In: C. E. Greene (ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2ª edição. W.B. Saunders, Philadelphia. 1424p.
- GRENFELL, B.T. & GULLAND, F.M.D. 1995. Introduction: Ecological Impact of parasitism on Wildlife Host Populations. *Parasitology*, 111: S3-S14.
- GUERRA-NETO, G.; GIRIO, R.J.S.; ANDRADE, T.M.; KOPROSKI, L.P.; MORAES, W. & SANTOS, L.C. 2004. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicals pertencentes ao Criadouro de Animais Silvestres da

- Itaipu Binacional e ao Zoológico Municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, Estado do Paraná. *ARS Veterinária*, 20:75-80.
- HARGIS, A.M. 1990. Sistema Tegumentar. Pp. 1-77. *In*: R.G. Thomson. *Patologia Veterinária Especial*. Editora Manole, São Paulo. 753p.
- HAYDON, D.T.; CLEAVELAND, S.; TAYLOR, L.H. & LAURENSEN, M.K. 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infection Diseases*, 8: 1468-1473.
- HELMBOLT, C.F. & JUNGHER, E.L. 1955. Distemper complex in wild carnivores simulating rabies. *American Journal of Veterinary Research*, 16: 463-469.
- HERRERA, H.M.; ALESSI, A.C.; MARQUES, L.C.; SANTANA, A.E.; MENEZES, R.F.; MACHADO, R.Z. 2002. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Tropica*, 81, 203- 210.
- HERRERA, H.M.; AQUINO, L.P.; MENEZES, R.F.; MARQUES, L.C.; MORAES, M.A.; WERTHER, K. & MACHADO, R.Z. 2001. *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. *Veterinary parasitology*, 102: 209-16.
- HOFMEYER, M.; BINGHAM, J.; LANE, E.P.; IDE, A. & NEL, L. 2000. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Madikwe Game Reserve, South Africa. *Veterinary Record*, 146: 50-52.
- HORSH, F. 1999. Leptospirose. Pp. 305-326. *In*: J. Beer (ed.). *Doenças infecciosas em animais domésticos*. Rocca, São Paulo. 398p.
- HYSLOP, N.S.G. 1955. Feline enteritis in the lynx, the cheetah and other wild felidae. *British Veterinary Journal*, 111: 373-377.
- JANSSEN, D.L.; BARTZ, C.R.; BUSH, M.; MARCHWICKI, R.H.; GRATE, S.J. & MONTALI, R.J. 1982. Parvovirus enteritis in vaccinated juvenile bush dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181: 1225-1227.
- JORGE, R.S.P.; PEREIRA, M.S.; MORATO R.G.; SCHEFFER K.C.; CARNIELI JR, P.; FERREIRA, F.; FURTADO, M.M.; KASHIVAKURA, C.K.; SILVEIRA, L.; JACOMO, A.T.A.; LIMA, E.S; PAULA, R.C. & MAY-JUNIOR, J.A. no prelo. Detection of Rabies Virus Antibodies in Brazilian Free-Ranging Wild Carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*.
- JOHNSON, M.R.; BOYD, D.K. & PLETSCHER, D.H. 1994. Serologic investigations of canine parvovirus and canine distemper in relation to wolf (*Canis lupus*) puppy mortalities. *Journal of Wildlife Diseases*, 30:270-273.
- JORGE, R.S.P. 2008. Caracterização do estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da região. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 105p.
- JORGE, R.S.P.; LIMA, E.S. & LUCARTS, L.E.B. 2008. Sarna Sarcóptica ameaçando cachorros-vinagres (*Speothos veneticus*) de vida livre em Nova Xavantina - MT *In*: Anais do XXXIII Congresso Anual da Sociedade de Zoológicos do Brasil. Sorocaba, SP. (CD-ROM).
- JORGE, R.S.P.; PEREIRA, M.S; MORATO R.G.; SCHEFFER K.C.; CARNIELI JR, P.; FERREIRA, F.; FURTADO, M.M.; KASHIVAKURA, C.K.; SILVEIRA, L.; JACOMO, A.T.A.; LIMA, E.S; PAULA, R.C. & MAY-JUNIOR, J.A. *No prelo*. Detection of Rabies Virus Antibodies in Brazilian Free-Ranging Wild Carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*.
- KAT, P.W.; ALEXANDER, K.A.; SMITH, J.S.; RICHARDSON, J.D. & MUNSON, L. 1996. Rabies among African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Masai Mara, Kenya. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8: 420-426.
- KOCK, R.; CHALMERS, W.S.K.; MWANZIA, J.; CHILLINGWORTH, C.; WAMBUA, J.; COLEMAN, P.G. & BAXENDALE, W. 1998. Canine distemper antibodies in lions of the Masai Mara. *Veterinary Record*, 142: 662-665.
- KRAKOWKA, S. & KOESTNER, A. 1976. Age related susceptibility to canine distemper, virus infection in gnotobiotic dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 134: 629-632.
- LABRUNA, M.B.; JORGE, R.S.P.; SANA, D.A.; JACOMO, A.T.A.; KASHIVAKURA, C.K.; FURTADO, M.M.; FERRO, C.; PEREZ, S.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS-JUNIOR, T.S.; MARQUES, S.R.; MORATO, R.G.; NAVA, A.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; GOMES, A.A.B.; CONFORTI, V.A.; AZEVEDO, F.C.C.; PRADA, C.S.; SILVA, J.C.R.; BATISTA, A.F.; MARVULO, M.F.V.; MORATO, R.L.G.; ALHO, C.J.R.; PINTER, A.; FERREIRA, P.M.; FERREIRA, F. & BARROS-BATTEST, D. M. 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on Wild Carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 36:149-163.

- LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J.J.; MACDONALD, D.W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A.A. & SILVEIRA, F.T. 1990. Amazonian visceral leishmaniasis - distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as source of infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(1): 135-137.
- LAURENSEN, M.K.; MLENGEYA, T.; SHIFERAW, F. & CLEAVELAND, S. 2005. Approaches to disease control in domestic canids for the conservation of endangered wild carnivores. Pp. 141-146. In: S.A. Osofsky; S. Cleaveland; W.B. Karesh; M.D. Kock; P.J. Nyhus; L. Starr & A. Yang (eds.). Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface: Implications for Wildlife, Livestock, and Human Health. IUCN Publications Services Unit, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 220p.
- LAURENSEN, K.; SHIFERAW, F. & SILLERO-ZUBIRI, C. 1997. Disease, domestic dogs and the Ethiopian wolf: current situation. . Pp. 32-40. In: C.Sillero-Zubiri & D.Macdonald (eds.).The Ethiopian wolf. Status and conservation action plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group, Gland, Switzerland. 123p.
- LEIGHTON, F. & KUIKEN, T. 2001. Leptospirosis. Pp.498-502. In: E.S. Williams & I.K. Barker (eds). Infectious diseases of wild mammals. Iowa State University Press, Ames. 302p.
- LEIGHTON, T.; FERGUSON, M.; GUNN, A.; HENDERSON, E. & STENHOUSE, G. 1988. Canine distemper in sled dogs. *Canadian Veterinary Journal*, 29: 299.
- LEVETT, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*.14: 296-326.
- LIMA, V.M.F.; FATTORI, K.R.; MICHELIN, A.F.; NOGUEIRA, F.S. & SOUZA, L.O. 2009. Evidence of *Leishmania spp.* antibodies and DNA in bush Dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40: 91-94.
- LUPPI, M.M.; MALTA, M.C.; SILVA, T.M.; SILVA, F.L.; MOTTA, R.O.; MIRANDA, I.; ECCO, R. & SANTOS, R.L. 2008. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 155:146-51.
- MAIA, O.B. & GOUVEIA, A.M.G. 2002. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 25-32.
- MANCIANTI, F.; MIGNONE, W. & GALASTRI, F. 1994. Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 30: 454-456.
- MANN, P.C.; BUSH, M.; APPEL, M.J.G.; BEEHLER, B.A.; MONTALI, R.J. 1980. Canine parvovirus infection in South American canids. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177: 779-783.
- MCCALLUM, H. & DOBSON, A. 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*, 10: 190-194.
- MCCALLUM, H. & DOBSON, A. 2002. Disease, habitat fragmentation and conservation. *Proceedings of the Royal Society of London*, 269: 2041-2049.
- MECH, L.D. & GOYAL, S.M. 1993. Canine parvovirus effect on wolf population change and pup survival. *Journal Wildlife Diseases*, 29: 330-333.
- MEGID, J. 2007. Raiva. Pp. 785-798. In: Z.S. Cubas, J.C.R. Silva & J.L. Catão-Dias (orgs.). Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. Editora Roca Ltda., São Paulo, SP. 1354p.
- MITCHELL, M.A.; HUNGEFORD, L.L. & NIXON, C. 1999. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *Journal of Wildlife Diseases*, 35: 347-355.
- MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; HAMZAVI, Y.; MOBEDI, I.; ARSHI, S.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; NAEINI, K.M.; AVIZEH, R. & FAKHAR, M. 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology*. 129: 243-251.
- MORENO, J. & ALVAR, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology*, 18: 399-404.
- MÖRNER, T.; OBENDORF, D.L. & ARTOIS, M. 2002. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 21: 67-76.
- MURRAY, D.L.; KAPKE, C.A.; EVERMAN, J.J. & FULLER, T.K. 1999. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation*, 2: 241-254.
- NAVA, A.F.; CULLEN, L.JR.; SANA, D.A.; NARDI, M.S.; FILHO, J.D.; LIMA, T.F.; ABREU, K. C. & FERREIRA, F. 2009. First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *Ecohealth*, 5: 513-518.
- NIELSEN, J.N.; ARMSTRONG, C.H. & NIELSEN, N.C. 1989. Relationship among selected *Leptospira interrogans* serogroups as determined by nucleic acid hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 2724-2729.

- OLIVEIRA, T.G. 1994. *Neotropical Cats: Ecology and Conservation*. EDUFMA, São Luís, MA. 220p.
- PARRISH, C.R. & CARMICHAEL, L.E. 1983. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. *Virology*, 129: 401-414.
- PARRISH, C.R. 1990. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Advances in Virus Research*, 38: 403-450.
- PATZ, J.A.; DASZAK, P.; TABOR, G.M.; AGUIRRE, A.A.; PEARL, M.; EPSTEIN, J.; WOLFE, N.D.; KILPATRICK, A.M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D. & BRADLEY, D.J. 2004. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1092-1098.
- PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N. & VITTOR, A.Y. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal of Parasitology*, 30: 1395-1405
- PENCE, D.B. & WINDBERG, L.A. 1994. Impact of a Sarcoptic Mange Epizootic on a Coyote Population. *Journal of Wildlife Management*, 58: 624-633.
- POLLOCK, R.H.V. & CARMICHAEL, L.E. 1990. Canine viral enteritis. Pp. 268-287. *In*: C.E. Greene (ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. W.B. Saunders, Philadelphia. 1424p.
- PORTÚS, M.; GALLEGRO, M.; RIERA, C.; AISA, M.J.; FISA, R. & CASTILLEJO, S. 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 62: 72-76.
- POULIN, R. 1997. Species Richness of Parasite Assemblages: Evolution and Patterns. *Annual Reviews Ecological Systems*, 28: 341-358.
- RANDALL, D.A.; MARINO, J.; HAYDON, D.T.; SILLERO-ZUBIRI, C.; KNOBEL, D.L., TALLENTS, L.A., MACDONALD, D.W. & LAURENSEN, M.K. 2006. An integrated disease management strategy for the control of rabies in Ethiopian wolves. *Biological Conservation*, 131: 151-162.
- RANDOLPH, S.E.; CHEMINI, C.; FURLANELLO, C.; GRNCHI, C.; HAILS, R.S.; HUDSON, P.J.; JONES, L.D.; MEDLEY, G.; NORMAN, R.A.; RIZZOLI, A.P.; SMITH G. & WOOLHOUSE, M.E.J. 2003. The Role of Pathogens in Biological Conservation. Pp. 139-150. *In*: P.J. Hudson, A. Rizzoli, B.T. Grenfell, H. Heesherbeek & A.P. Dobson. (eds.). *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford University Press, Oxford, Great Britain. 218p.
- ROBINSON, W.F.; WILCOX, G.E. & FLOWER, R.L.P. 1980. Canine parvoviral disease: Experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Veterinary Pathology*, 17: 589-599.
- ROELKE-PARKER, M.E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, S.J.; POSPISCHIL, A.; HOFFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H.; MWAMENGELE, G.L.M.; MGASA, M.N.; MACHANGE, G.A.; SUMMERS, B.A. & APPEL M. J.G. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379: 441-445.
- RÖKEN, B.O. 1993. Parasitic Diseases of Carnivores. Pp. 399-404. *In*: M. E. Fowler (ed.) *Zoo & Wild Animal Medicine: Current Therapy 3*. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 617p.
- ROTH, E.E. 1972. Leptospirosis. Pp. 356-368. *In*: J. W. Davis, L. H. Karstad & D. O. Trainer (eds.). *Enfermidades Infecciosas de los mamíferos Salvajes*. Editora Acribia, Barcelona. 513p.
- RUPPRECHT, C.E.; STÖRH, K. & MEREDITH, C. 2001. Rabies. Pp. 3-36. *In*: E.S. Williams, I.K. Barker (eds). *Infectious diseases of wild mammals*. (3ª edição). Iowa State University Press, Ames. 302p.
- SEMIÃO-SANTOS, S.J.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; SANTOS-GOMES, G.M.; FERNANDES, J.P. & VETTER, J.C.M. 1996. Reliability of serological methods for detection of *Leishmaniasis* in Portuguese domestic and wild reservoirs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 747-750.
- SENDA, M.; HIRAYAMA, N.; ITOH, O. & YAMAMOTO, H. 1988. Canine parvovirus: Strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *Journal of General Virology*, 69: 349-354.
- SILLERO-ZUBIRI, C.; MACDONALD, D.W. & KING, A.A. 1996. Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 32: 80-86.
- SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R., SHAW, J.J. & POVOA, M.M. 1982. Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 830-832.
- SMITH, G.C. & HARRIS, S. 1991. Rabies in urban foxes (*Vulpes vulpes*) in Britain: the use of a spatial stochastic

- simulation model to examine the pattern of spread and evaluate the efficacy of different control regimes. *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, 334: 459-479.
- SMITH, J.S. & BAER, G.M. 1988. Epizootiology of rabies: the Americas. Pp. 365-380. In: J.B. Campbell & K.M. Charlton (eds.). Rabies. Kluwer Academic Publishers, Boston. 431p.
- SOBRINO, R.; FERROGLIO, E.; OLEAGA, A.; ROMANO, A.; MILLAN, J.; REVILLA, M.; ARNAL, M.C.; TRISCIUOGLIO A. & GORTÁZAR, C. 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary parasitology*, 155: 198-203.
- SOUZA JUNIOR, M.F.; LOBATO, Z.I.P. & LOBATO, F.C.F. 2006. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: 292-294.
- SOUZA, G.D.; SANTOS, E. & ANDRADE FILHO, J.D. 2009. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 1181-1182.
- STEINEL, A.; PARRISH, C.R.; BLOOM, M.E.; TRUYEN, U. 2001. Parvovirus infections in wild carnivores. *Journal of Wildlife Diseases*, 37: 594-607.
- STORTS, R.W. 1990. Sistema Nervoso Central. Pp. 579-643. In: R.G. Thomson (ed.). Patologia Veterinária Especial. Editora Manole Ltda., São Paulo, SP. 753p.
- TABOR, G.M. 2002. Defining Conservation Medicine. Pp. 8-16. In: A.A. Aguirre, R.S. Ostfeld, G.M. Tabor, C. House & M.C. Pearl (eds). Conservation medicine: ecological health in practice. Oxford University Press, New York. 432p.
- TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M. & WOOLHOUSE, M.E.J. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*, 356: 983-989.
- THIERMANN, A.B. 1984. Leptospirosis: current developments and trends. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 184: 722-725.
- THOMAS, N.J.; FOREYT, W.J.; EVERMANN, J.F.; WINDBERG, L.A. & KNOWTON, F.F. 1984. Seroprevalence of canine parvovirus in wild coyotes from Texas, Utah, and Idaho (1972 to 1983). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185: 1283-1287.
- THORNE, E.T. & WILLIAMS, E.S. 1988. Disease and endangered species: the black-footed ferret as a recent example. *Conservation biology*, 2: 66-74.
- TISCHENDORF, L.; THULKE, H.H.; STAUBACH, C.; MULLER, M.S.; JELTSCH, F.; GORETZKI, J.; SELHORST, T.; MULLER, T.; SCHLÜTER, H. & WISSEL, C. 1998. Chance and risk of controlling rabies in large-scale and long-term immunized fox populations. *Proceedings of the Royal Society London Series B – Biological Sciences*, 265: 839-846.
- TOMA, B. & ANDRAL, L. 1977. Epidemiology of fox rabies. *Advanced Virus Research*, 21: 1-36.
- TRAVIS, D.A.; HUNGERFORD, L.; ENGEL, G.A.M & JONES-ENGEL, L. 2006. Disease risk analysis: a tool for primate conservation planning and decision making. *American Journal of Primatology*, 68: 855-867.
- TRUYEN, U.; EVERMANN, J.F.; VIELER, E. & PARRISH, C.R. 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology*, 215: 186-189.
- TRUYEN, U.; MULLER T.; HEIDRICH, R.; TACKMANN, K. & CARMICHAEL, L.E. 1998. Survey on viral pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in Germany with emphasis on parvoviruses and analysis of a DNA sequence from a red fox parvovirus. *Epidemiology and Infection*, 121: 433-440.
- VALENZUELA, D.; CEBALLOS, G. & GARCIA, A. 2000. Mange Epizootic in White-nosed coatis in Western Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 36: 56-83.
- VAN DE BILDT, M.W.G.; KUIKEN, T.; VISEE, A.M.; LEMA, S.; FITZJOHN, T.R. & OSTERHAUS, A.D.M.E. 2002. Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 211-213.
- VASCONCELLOS, S. A. 1987. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 11: 17-24.
- VOLTARELLI, E.M.; ARRAES, S.M.A.A.; PERLES, T.F.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U. & SILVEIRA, T.G.V. 2009. Serological survey for *Leishmania sp.* infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 15: 732-744.
- WANDELER, A.I. 1993. Wildlife rabies in perspective. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 60: 347-350.

WANDELER, A.I., CAPT, S., GERBER, H., KAPPELER, A. & KIPFER, R. 1988. Rabies epidemiology, natural barriers and fox vaccination. *Parasitologia*, 30: 53-57.

WEBSTER, J.P.; ELLIS, W.A. & MACDONALD, D.W. 1995. Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Epidemiology and Infection*, 114: 195-201.

WEILER, G.J.; GARNER, G.W. & RITTER, D.G. 1995. Occurrence of rabies in a wolf population in northeastern Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 31: 79-82.

WHELAN, S.P.J. 2009. Rhabdoviruses. Pp. 145-162. In: C. Cameron, M. Gotte, K.D. Raney (eds). *Viral Genome Replication*. Springer, New York. 622p.

WILLIAMS, E.S. 2001. Canine distemper. Pp. 50-59. In: E.S. Williams & I.K. Barker (eds). *Infectious diseases of wild mammals*. 3ª edição. Iowa State University Press, Ames. 302p.

WILLIAMS, E.S.; THORNE, E.T.; APPEL M.J.G. & BRLITSKY D.W. 1988. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 24: 385-398.

WOODROFFE, R. 1999. Managing disease threats to wild mammals. *Animal Conservation*, 2: 185-193.

WOODROFFE, R.; CLEAVELAND, S.; COURTENAY, O.; LAURENSEN, M.K. & ARTOIS, A. 2004. Infectious diseases. Pp. 123-142. In: D. W. Macdonald & C. Sillero-Zubiri (eds.). *The biology and conservation of wild canids*. Oxford University Press, London. 468p.

Submetido em 25/03/2010

Aceito em 18/06/2010