

## MANUTENÇÃO DE TATUS EM CATIVEIRO E RESULTADOS DE INOCULAÇÃO DO MYCOBACTERIUM LEPRAE

Diltor V. A. OPROMOLLA\*  
Olavo Speranza de ARRUDA\*\*  
Raul Negrão FLEURY\*\*\*

RESUMO — Os autores relatam sua experiência na manutenção de tatus em cativeiro e apresentam os resultados da inoculação do *M. leprae*.

Inicialmente fazem considerações sobre a proveniência dos animais, como é processada sua captura e as tentativas que realizaram até conseguirem as instalações atuais para albergá-los.

Relatam ainda as experiências feitas para a padronização de uma ração que fosse adequada e o resultado a que chegaram, que consiste de uma ração para frangos misturada a pão, ovos, carne e leite. Além disso, discorrem sobre o registro e o exame dos animais, que se constitui principalmente em um exame físico do animal na entrada, verificação do peso e temperatura retal e a realização de exame de fezes, hemograma e homossedimentação, e sobre como os animais são imobilizados para a colheita do sangue e para as inoculações.

Finalmente, apresentam os seus resultados da inoculação do *M. leprae* em 3 animais da espécie *Euphractus sexcinctus* e em 26 animais da espécie *Dasypus novemcinctus* com referência especial a um *D. novemcinctus* (n.º 19) que apresentou infecção sistêmica após 15 meses de inoculação por via subcutânea e intravenosa. Bacilos foram encontrados em grande quantidade em vários órgãos como pele, linfonodos, fígado, supra-renais e baço. Não foram encontrados bacilos no miocárdio, pâncreas, tireóide e testículos. Ao que parece, este constitui o primeiro animal da espécie *D. novemcinctus* que apresentou infecção experimental sistêmica com o *M. leprae* na América do Sul.

Um outro tatu (n.º 11), inoculado com suspensão de  $1,2 \times 10^6$  bacilos por via intracardíaca, já apresenta nódulos com bacilos na parede abdominal após 10 meses de inoculação.

Concluem considerando que os resultados já conseguidos darão em breve condições para fornecerem material para as instituições existentes no País ou outras que se interessarem no estudo do *M. leprae* e para o preparo de antígeno de Missuda tão carente nos programas de controle de hanseníase.

**Palavras chave:** Tatu. *Mycobacterium leprae*. Inoculação.

(\*) Diretor do Serviço Médico do Hospital Lauro de Souza Lima e Professor Colaborador da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP.

(\*\*) Biologista do Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, SP.

(\*\*\*) Patologista do Hospital Lauro de Souza Lima e Professor Assistente da Fac. de Odontologia de Bauru, USP.

## 1 INTRODUÇÃO

A demonstração feita por STORRS (1971), KIRCHHEIMER (1976), KIRCHHEIMER & STORRS (1971) e KIRCHHEIMER *et al.* (1972) de que o tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* é susceptível à hanseníase, veio trazer grande incremento às pesquisas referentes ao *Mycobacterium leprae*. Bacilos em quantidade suficiente para estudo eram muito difíceis de se conseguir, porque a única fonte era o ser humano. A multiplicação do bacilo na pata do camundongo dá origem a quantidades irrisórias de germes, e as inoculações em animais timectomizados e irradiados, apesar de fornecerem bacilos em quantidades razoáveis, constituem técnica de difícil execução, só realizadas em laboratórios altamente especializados.

A hanseníase no tatu é generalizada, comprometendo até órgãos que permanecem indenes no tipo virchowiano humano (BINFORD *et al.*, 1976). A quantidade de germes obtidos dos animais infectados é enorme e tem se prestado ao preparo do antígeno de Mitsuda (MEYERS *et al.*, 1975), para estudos sobre componentes antigênicos do *M. leprae*, na busca de um antígeno específico para a detecção da hanseníase-infecção e para a procura de uma vacina.

Além disso, o seu tempo de sobrevida longo, ao redor de 12 a 15 anos, e o fato de gerar 4 gêmeos univitelinos, torna possível a utilização desse animal em estudos sobre a patologia da hanseníase e pesquisas terapêuticas. O fato de ser susceptível a outras moléstias e parecer possuir um sistema imunológico rudimentar, na opinião de alguns autores, também se prestaria ao estudo da imunidade humoral e celular da hanseníase e de outras moléstias (WHO, 1978).

Atualmente existem três centros que conseguiram êxito na inoculação do *M. leprae* em tatus: o de Carville com KIRCHHEIMER (1976), o do Golf South Research Institute com STORRS (1971) e STORRS & GREER (1974) ambos em Louisiana, USA, e o Centro Panamericano para Pesquisas em Lepra e Doenças Tropicais, em Caracas, com CONVIT (1978). Os centros norte-americanos têm utilizado o *D. novemcinctus*, que é a única espécie de tatu existente nos Estados Unidos da América do Norte, e o Centro venezuelano utiliza o *Dasypus sabanicola*. Além dessas instituições, muitas outras de vários países da América do Sul, como Suriname, Colombia, Brasil, Paraguai e Argentina, estão tentando a manutenção dos animais de vários gêneros e espécies em cativeiro e a reprodução da moléstia, sem êxito completo até o momento.

## 2 FONTES DE ANIMAIS

O Brasil possui cerca de 17 espécies de tatus e neste Hospital está-se trabalhando com três delas. Uma é o *Euphractus sexcinctus*, que provém da Amazônia. São animais dóceis, cabeça triangular, corpo achatado, orelhas pequenas, coloração marrom amarelada, cauda coreácea curta e pêlos alongados nas faces laterais do tórax; dessa espécie dispõe-se de dois animais. A outra espécie, que constitui a maioria (26 animais) é o *D. novemcinctus* que provém da região de Bauru, da área em torno do Hospital Lauro de Souza Lima. São animais selvagens e de adaptação mais difícil, cabeça alongada, orelhas compridas em posição vertical ao lado da cabeça, corpo cilíndrico, cauda coreácea longa, tonalidade cinza chumbo e com pêlos pouco desenvolvidos. A terceira espécie, ainda não classificada, conhecida vulgarmente como tatu "rabo mole", constitui-se de

animais de grande adaptabilidade, de cabeça triangular, orelhas pequenas e carapaça menos dura do que a das outras espécies. Apresenta desenhos quadriculados de tonalidade marrom, e chama a atenção por duas características, a saber: unhas longas e fortes nas patas dianteiras a emissão de um rosnar característico. O Hospital dispõe de 3 animais dessa espécie.

### 2.1 Captura

Os tatus do gênero *Euphractus* foram enviados de Belém, PA, por via aérea, não se sabendo dos pormenores de sua captura. Os demais, que provêm da área de Bauru, são capturados com armadilhas de madeira. Estas armadilhas apresentam duas tampas nas extremidades, que permanecem elevadas, e caem assim que o animal está dentro dela para conseguir o alimento (isca), fechando-a. Estas armadilhas recebem o nome de "jiquis". Os caçadores não usam cães na captura e os jiquis são colocados nos locais por onde os tatus costumam passar (carreiros).

Dessa forma os animais são conseguidos, em geral, sem grandes traumatismos, com exceção de algumas eventualidades em que ficam muito agitados.

### 2.2 Biotério — Instalações

Têm-se feito várias experiências em instalações para os animais. A primeira delas foi a construção de uma grande "piscina" de terra revestida de tijolos, utilizada para os primeiros animais recebidos. (*Euphractus sexticinctus*). Essa tentativa não deu certo porque os animais escavavam as suas tocas de tal forma, que não se tinha condições de observá-los nem de controlar a sua alimentação, tanto que vários morreram dentro delas sem que nada se pudesse fazer. A outra experiência realizada foi a de colocar os tatus em uma

área cercada com telas, sem divisão e cimentada, onde permaneciam todos juntos. Essa maneira também não se revelou eficaz porque havia grande disputa pelo alimento e lutas entre eles, com ferimentos às vezes fatais. Uma terceira tentativa foi a de colocá-los em caixas de madeira, de aproximadamente 1,0 x 1,0 m, cobertas com tela que albergavam 1 ou 2 animais.

### 2.3 Registro e exame dos animais

Todo animal ao dar entrada no biotério é registrado em ficha que contém : espécie, local de captura, tamanho, sexo, e os resultados dos seus exames físicos e laboratoriais. O exame físico consiste em verificar se o animal apresenta algum ferimento, alguma alteração da pele, carapaça etc., na palpação à procura de nódulos cutâneos ou enfartamento ganglionar, e a verificação de peso e da temperatura retal.

Os exames de laboratório consistem em exames de fezes e de sangue, hemograma e sedimentação.

O sangue é colhido por punção da veia femoral. O hemograma do tatu é bastante semelhante ao do homem. No exame de fezes, apesar do grande número de parasitas que tem sido descrito por vários autores, só foram observados ovos de ancilostomídeos.

Os exames laboratoriais são repetidos quando o tatu apresenta alguma anormalidade cuja causa se tenta detectar. Todos os animais que morrem são necropsiados e fragmentos de todos os órgãos são incluídos em parafina e corados pela hematoxilina-eosina e pelo método de Fite Faraco, para a verificação da "causa mortis" e a procura de micobactérias para pesquisar uma possível infecção natural por *M. leprae* ou outra micobacteriose. Até o momento dos 53 animais em cativeiro, morreram 31 desde o início da experiência, em 1974. A maior parte dos óbitos ocorreu

nos dois primeiros anos. Nenhum dos animais mortos demonstrou sinais de infecção por *M. leprae*.

## 2.4 Alimentação

Uma das grandes dificuldades que têm enfrentado todos aqueles empenhados na criação dos tatus é a sua alimentação. Os pesquisadores americanos e venezuelanos resolveram esse problema utilizando uma ração para gatos à qual suplementos vitamínicos, minerais e protéicos eram adicionados. Não foi possível utilizar esse esquema porque tal ração é muito cara e tornaria muito dispendiosa a manutenção dos animais. Depois de várias tentativas conseguiu-se uma dieta que parece ser ideal e que tem sido bem aceita pelos animais: composta de pão, carne, ovos, leite e uma ração para frangos que contém: farinhas de sangue, de peixe, de carne, de alfafa, de glúten, de milho, farelos de algodão, de gergelim, de amendoim, de trigo, milho moído, carbonato de cálcio, sal, além de suplemento vitamínico, mineral e protéico.

Cada animal ingere cerca de 100 gramas dessa mistura alimentar, diariamente. Quando os animais são capturados, em geral não são alimentados por alguns dias, mas logo a seguir começam a fazê-lo regularmente.

## 3. INOCULAÇÕES

Para inoculação dos tatus com *M. leprae* são feitas suspensões de hanseônomas retirados de pacientes virchowianos, que são triturados em gral e filtrados em gaze. O inóculo é injetado na veia femural, ou subcutaneamente na face interna da coxa ou ainda nessas localizações e em mais 4 sítios da pele do abdomen, inoculação intracardiaca.

Para injeção nos primeiros animais usamos "Ketalar" como anestésico, mas

atualmente os tatus são imobilizados em suporte especialmente idealizado para esse fim e que têm dado resultados melhores e sem nenhum risco para o animal.

As colheitas de sangue também têm sido realizadas dessa maneira. O volume do inóculo, quantidade de bacilos, local de injeção, época da mesma, tempo de inoculação e o número de animais atualmente inoculados neste Hospital estão registrados na tabela 1.

Até agora foram inoculados 29 animais sendo 3 da espécie *E. sexticinctus* e os demais da espécie *D. novemcinctus*. Destes tatus 12 morreram após períodos de inoculação que variaram desde 24 horas (1 animal) até 14 meses, sendo múltiplas as causas de morte tais como septicemias, enterocolite etc. Em nenhum deles foi observada na necropsia a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Dos animais remanescentes o de número 47 (*D. novemcinctus*) apresentou uma lesão nodular eritematosa, abcedada, na região inguinal esquerda, que continha BAAR dois meses após a inoculação. Essa lesão, contudo, regrediu lentamente e não se notou mais aparecimento de novas lesões.

O tatu de número 19 foi inoculado por via endovenosa e subcutânea com uma suspensão de  $1,0 \times 10^8$  bacilos. Após 15 meses de inoculação, apareceu na coxa esquerda um nódulo duro que aumentou lentamente de tamanho, adquirindo forma alongada. Quatro meses após o aparecimento desta primeira lesão, 3 nódulos mais foram notados na parede abdominal. Biópsias realizadas de um dos nódulos e da orelha esquerda demonstraram grande quantidade de bacilos. Este animal foi sacrificado em agosto de 1979 e na ocasião apresentava grandes nódulos no abdomen, alguns dos quais ulcerados. Na necropsia os linfonodos subcutâneos e aqueles localizados

TABELA 1 Inoculação em tatu — 1977 a 1979

Experi- mento N.º	Animal N.º	Espécie	Data de inoculação	Data de morte	Sobrevida após inoculação (meses)	Concentra- ção do inóculo (BAC/ml)	Índice mor- fológico do inóculo (%)	Volume injetado (ml)	Vias de inoculação
1	3	Euphractus sexlineatus	13-4-77	—	31	3,5 x 10 <sup>8</sup>	17	1,0	Venosa + Subcutânea
2	4	Euphractus sexlineatus	13-4-77	—	31	3,5 x 10 <sup>8</sup>	17	1,0	Venosa + Subcutânea
3	6	Dasyus novemcinctus	13-4-77	5-1-78	9	3,5 x 10 <sup>8</sup>	17	1,0	Venosa
4	4	Dasyus novemcinctus	13-4-77	1-6-77	2	3,5 x 10 <sup>8</sup>	17	1,0	Venosa + Subcutânea
5	12	Dasyus novemcinctus	24-5-77	13-7-78	14	1,0 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Venosa + Intrapertoneal
6	10	Dasyus novemcinctus	8-9-77	1-9-78	12	1,0 x 10 <sup>8</sup>	10	2,0	Venosa + Subcutânea
7	13	Dasyus novemcinctus	8-9-77	3-5-78	8	1,0 x 10 <sup>8</sup>	10	2,0	Venosa
8	19	Dasyus novemcinctus	8-9-77	2-8-79	23	1,0 x 10 <sup>8</sup>	10	2,0	Venosa + Subcutânea
9	31	Dasyus novemcinctus	12-12-77	26-5-78	5	1,0 x 10 <sup>8</sup>	8,5	2,0	Subcutânea + Intrapertoneal
10	34	Dasyus novemcinctus	16-2-78	13-9-78	7	2,0 x 10 <sup>8</sup>	20	2,0	Venosa
11	38	Dasyus novemcinctus	13-4-78	—	19	3,0 x 10 <sup>8</sup>	22	3,0	Venosa + Subcutânea
12	39	Dasyus novemcinctus	13-4-78	—	19	3,0 x 10 <sup>8</sup>	22	3,0	Subcutânea
13	46	Dasyus novemcinctus	13-4-78	—	19	3,0 x 10 <sup>8</sup>	22	2,0	Venosa + Intradérmica
14	42	Dasyus novemcinctus	14-6-78	—	17	2,0 x 10 <sup>8</sup>	13	8,0	Subcutânea
15	47	Dasyus novemcinctus	14-6-78	—	17	2,0 x 10 <sup>8</sup>	13	2,5	Subcutânea
16	9	Dasyus novemcinctus	3-8-78	—	15	1,2 x 10 <sup>8</sup>	10	4,0	Intracardíaca
17	11	Dasyus novemcinctus	3-8-78	—	15	1,2 x 10 <sup>8</sup>	10	4,0	Intracardíaca + Subcutânea
18	1	Euphractus sexlineatus	29-8-78	14-4-79	8	2,0 x 10 <sup>7</sup>	8	6,0	Subcutânea
19	24	Dasyus novemcinctus	29-8-78	30-8-78	0	2,0 x 10 <sup>7</sup>	8	6,0	Intracardíaca + Subcutânea
20	40	Dasyus novemcinctus	27-1-79	—	8	7,0 x 10 <sup>8</sup>	10	3,5	Venosa + Intradérmica
21	45	Dasyus novemcinctus	27-1-79	—	8	7,0 x 10 <sup>8</sup>	10	6,0	Venosa + Intradérmica
22	44	Dasyus novemcinctus	2-8-79	—	3	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
23	64	Dasyus novemcinctus	2-8-79	1-9-79	1	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
24	65	Dasyus novemcinctus	2-8-79	—	3	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
25	66	Dasyus novemcinctus	2-8-79	4-9-79	1	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
26	67	Dasyus novemcinctus	2-8-79	4-9-79	1	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
27	70	Dasyus novemcinctus	2-8-79	—	3	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
28	71	Dasyus novemcinctus	2-8-79	—	3	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea
29	77	Dasyus novemcinctus	2-8-79	—	3	1,2 x 10 <sup>8</sup>	12	2,0	Subcutânea

(\*) EXPERIMENTOS — 1 a 21 material inoculado proveniente de hansenoma humano; de 22 a 29 material inoculado proveniente de tatu infectado (T — 19).

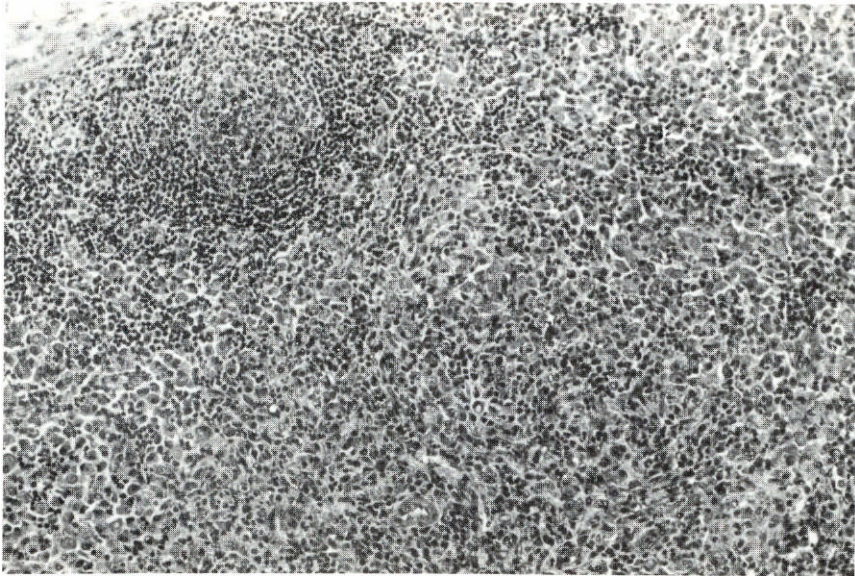


FIGURA 1 Tatu inoculado com *M. leprae*. Linfonodo infiltrado macrófago extenso em áreas paracorticais. H.E. 40 aumentos.

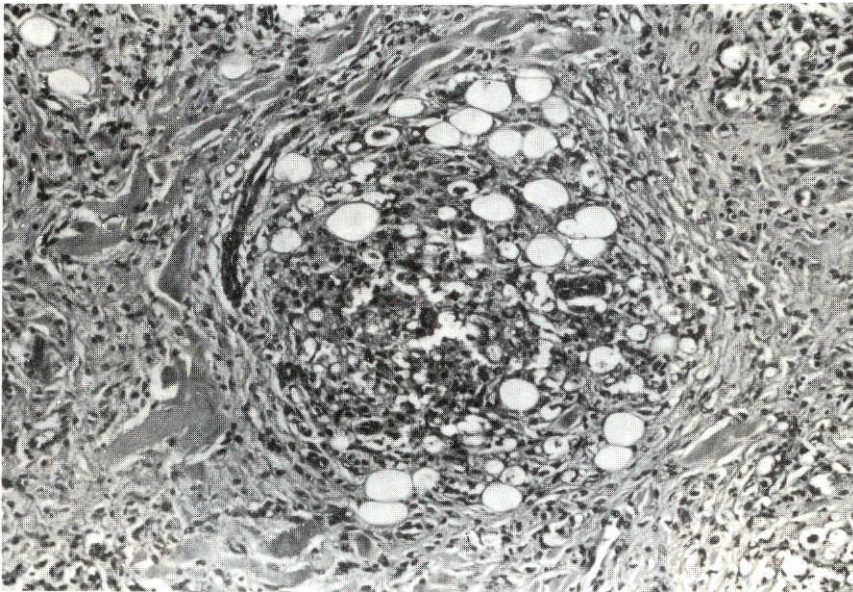


FIGURA 2 Tatu inoculado com *M. leprae* subcutâneo. Infiltrado macrófago com características regressivas englobado por proliferação fibrosa H.E. 100 aumentos.



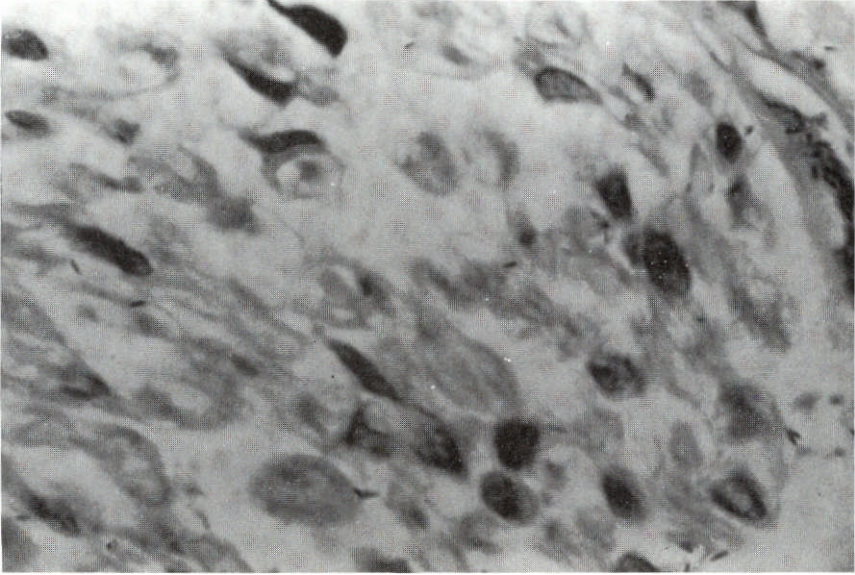


FIGURA 3 Tatu inoculado com *M. leprae*. Bacilos em nervo periférico. Fite-Faraco. 400 aumentos.

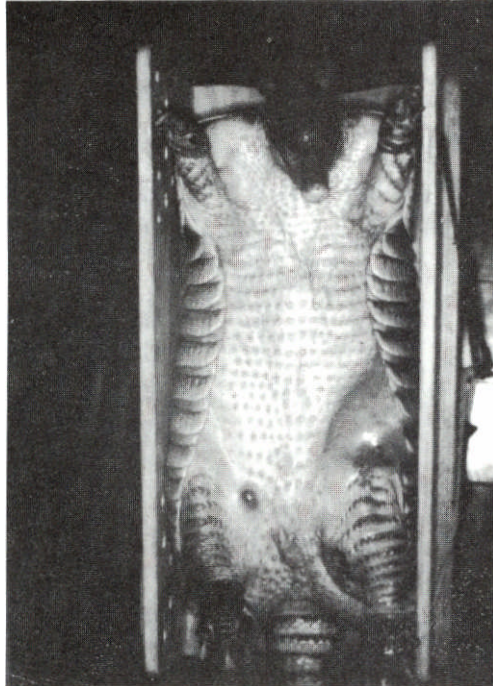


FIGURA 4 Tatu inoculado com *M. leprae*. Aspecto do ventre evidenciando lesões nodulares in  
flamatórias na coxa direita e raiz da coxa esquerda

mentados de volume e na superfície de corte apresentavam grande número de grânulos amarelados. Microscopicamente os nódulos da parede abdominal eram constituídos por infiltrados de macrófagos com numerosos BAAR, semelhantes aos encontrados na hanseníase virchowiana humana. Os nervos estavam comprometidos da mesma forma que o globo ocular, mucosa nasal, língua e linfonodos. No fígado havia intensa infiltração histiocitária com BAAR nos espaços porta e nos sinusóides e os bacilos também eram visíveis no interior dos hepatócitos. As suprarrenais e o baço também se mostravam infiltrados e em menor intensidade os pulmões, rins e encéfalo. Não foram encontrados bacilos no miocárdio, pâncreas, tireóide e testículos.

Suspensões bacilares desse material foram inoculadas em 8 tatus também *D. novemcinctus*, sendo que 4 deles são animais jovens, nascidos em cativeiro.

Atualmente um outro tatu, o de número 11, inoculado com uma suspensão de  $1,2 \times 10^8$  bacilos por via intracardíaca, já apresenta após 10 meses de inoculação, nódulos com BAAR na parede abdominal.

Acredita-se que com os resultados já conseguidos o Hospital "Lauro de Souza Lima" estará brevemente em condições de fornecer material para as instituições existentes no País ou outras que se interessarem no estudo do *M. leprae*, e para o preparo do antígeno de Mitsuda, tão carente nos programas de controle da hanseníase.

ABSTRACT — The authors report their experiences in raising armadillos and the results obtained in inoculating them with *M. leprae*.

They begin by reporting on the origin of the animals, how they were captured, and their efforts until they found the right kind of housing for the armadillos.

They also tell of their attempts to develop the correct feeding procedures. The result is the feed used now in their laboratory: chicken feed mixed with bread, eggs, meat and milk. Along with this, they report on the way each animal is registered and the examination it undergoes upon admittance, namely, recording of its weight, rectal temperature, feces examination, hemogram and hemossedimentation. They also tell how animals are immobilized so as to take blood samples for the inoculations.

Lastly, they present the results of the inoculations with *M. leprae* in three armadillos of the *Euphractus sexcinctus* species and 26 of the *Dasypus novemcinctus* species, with special reference to an armadillo of the *D. novemcinctus* species, which had systemic infection 15 months after being inoculated subcutaneously and intravenously. Bacilli were found in large quantities in various organs like the skin, lymph nodes, liver, kidneys and spleen. No bacilli were found in the myocardium, pancreas, thyroid and testicles.

The authors are of the opinion that this is the first armadillo of the *D. novemcinctus* species to present experimental systemic infection with *M. leprae* in South America.

Another armadillo, which has been inoculated with a suspension of  $1,2 \times 10^8$  bacilli by the intracardiac route already showed nodules with bacilli on the abdominal wall 10 months after being inoculated.

They believe that the results already obtained indicate that soon they will be able to provide material for institutions in Brazil as well as other countries that are interested in the study of *M. leprae* and in the preparation of the Mitsuda antigen which is so vital to the control of Hansen's disease.

Key words: Armadillo. *Mycobacterium leprae*. Inoculation.



## REFERÊNCIAS

- BINFORD, C.H.; STORRS, E.E.; WALSH, G.P. Disseminated infection in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) resulting from inoculation with *M. leprae*. *Int. J. Lepr.*, 44(1/2) :80-83, 1976.
- CONVIT, J. et al. Leprosy in the armadillo: clinical and pathological aspects. Washington, DC Pan American Health Organization, 1978.
- KIRCHHEIMER, W.F. Significance of nine banded armadillo in biomedical leprosy research. *Lepr. India*, 48(4) :4619-427, 1976.
- KIRCHHEIMER, W.F. & STORRS, E.E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr.*, 39(3) :693-702, 1971.
- KIRCHHEIMER, W.F.; STORRS, E.E.; BINFORD, C.H. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopatologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the armadillo. *Int. J. Lepr.*, 40(3) :229-242, 1972.
- MEYERS, W.M.; KVERNES, S.; BINFORD, C.H. Comparison of reactions to human and armadillo lepromins in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 43(3) :218-225, 1975.
- STORRS, E.E. The nine banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. *Int. J. Lepr.*, 39 (3) :703-714, 1971.
- STORRS, E.E. & GREER, W.E. Maintenance and husbandry of armadillo colonies. *Lab. Anim. Sci.*, 23:823-829, 1973 spud *Int. J. Lepr.*, 42(4) :489, 1974.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The armadillo as an experimental model in biomedical research*. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1978. (PARO. Scientific Publication, n. 366).

Recebido para publicação em dezembro de 1979.