



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Wesley José dos Santos

**Pesquisa de *Trypanosoma* spp. em primatas de
cativeiro de cinco regiões do Brasil**

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

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini-Pereira

Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu

2020

Wesley José dos Santos

Pesquisa de *Trypanosoma* spp. em primatas de
cativeiro de cinco regiões do Brasil

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

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini-Pereira

Coorientadora: Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Botucatu

2020

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Wesley José dos.

Pesquisa de *Trypanosoma* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões do Brasil / Wesley José dos Santos. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Coorientador: Virgínia Bodelão Richini Pereira

Coorientador: Maria Izabel Merino de Medeiros

Capes: 40101096

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3. Saúde única.
4. Primatas não humanos. 5. Macaco.

Palavras-chave: Diagnóstico; Doença de Chagas; Macaco; One Health; *Trypanosoma cruzi*.

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO A TODAS AS PESSOAS QUE, MAIS DO QUE NUNCA, NOS MOSTRAM A IMPORTÂNCIA DA CIÊNCIA PARA A NOSSA SOCIEDADE E PARA NOSSAS VIDAS. GRAÇAS AOS GIGANTES DO PASSADO, NÓS PODEMOS ENXERGAR MAIS LONGE. GRAÇAS AOS EXPLORADORES DO PASSADO, PODEMOS CAMINHAR PELAS MARGENS DO OCEANO DA CIÊNCIA COM MENOS MEDO E COM MAIS PRAZER, DESCOBRINDO UM MUNDO NOVO A CADA PASSO, A CADA CAMINHADA, SABENDO QUE ATRÁS DE NÓS, OUTROS SEGUEM NOSSOS PASSOS, E DARÃO CONTINUIDADE A ELES.

AOS MEUS PAIS, IRMÃ E AVÓS QUE SE FIZERAM PRESENTES EM TODOS OS PRINCIPAIS MOMENTOS DE MINHA VIDA. ALGUNS CONHECIMENTOS SÓ OBTEMOS COM O CONTATO E COM A VIVÊNCIA, E ESTA LEVAMOS PARA SEMPRE EM NOSSOS CORAÇÕES.

A TODOS QUE TAMBÉM SÃO APAIXONADOS PELA CIÊNCIA, ESTA DAMA DE SÉCULOS DE IDADE QUE JÁ ENCANTOU TANTOS NO PASSADO, E QUE AINDA NOS MOSTRA TODA A SUA DESENVOLTURA E INTELIGÊNCIA, DEDICO ESTAS LINHAS.

Agradecimientos

OS PASSOS DADOS POR MIM NUNCA TERIAM SERIAM SIDO FEITOS SE NÃO FOSSE PELA COLABORAÇÃO DE TANTAS PESSOAS QUE PASSARAM AO LONGO DOS ANOS DE CONVIVÊNCIA, ÀS VEZES BREVE COMO O CHEIRO DE TERRA MOLHADA NO COMEÇO DE UMA CHUVA, ÀS VEZES DURADOURA, QUASE ETERNA.

LISTAR OS NOMES DE TODOS QUE ME MARCARAM AO LONGO DESTA TRAJETÓRIA SERIA QUASE HERCÚLEO E PEDIRIA UM CALHAMAÇO PRÓPRIO APENAS DEDICADO A ESTES AGRADECIMENTOS. ASSIM, TENTEI SER SUCINTO EM MINHAS RECORDAÇÕES E PEÇO, DE ANTEMÃO, MIL DESCULPAS A TODOS QUE NÃO ENCONTRAREM SEUS NOMES AQUI. MESMO NÃO O TENDO ESCRITO NAS PRÓXIMAS LINHAS QUE SE APRESENTAM ABAIXO, SAIBAM QUE ESTÃO PROFUNDAMENTE MARCADOS A FERRO EM MEU CORAÇÃO E EM MINHAS MEMÓRIAS.

QUEM MAIS PARA AGRADECER SENÃO MEUS PAIS, EDISON E MARISTELA SANTOS QUE, EM UM GRANDE ESFORÇO, PERMITIRAM ME AVENTURAR EM UMA NOVA CIDADE PARA CURSAR BIOLOGIA E QUE COMPARTILHARAM MINHAS FELICIDADES DURANTE TODA A PÓS-GRADUAÇÃO. COM ELES COMPARTILHEI ALEGRIAS E TRISTEZAS, MOMENTOS MÁGICOS QUE ESTARÃO PARA SEMPRE ETERNIZADOS. A ELES, TODO O MEU CARINHO E RESPEITO.

MINHA IRMÃ, STHEFANY SANTOS, A QUAL COMECEI A COMPARTILHAR DE SEUS SORRISOS DEZ ANOS APÓS MINHA VIVÊNCIA SOLO NO INTERIOR PAULISTA. É COM ELA QUE COMPARTILHO MINHA PAIXÃO POR LIVROS, MEMES E QUAL TROCAMOS SEGREDOS E CONVERSAS MESMO À DISTÂNCIA. AMO-TE.

À SONIA E ADROALDO GUIRALDI, ASSIM COMO PARA LÁISA, QUE ME PRESENTEARAM E CUIDARAM COM TODO O CARINHO DA PESSOA QUE MAIS AMO NA VIDA. OBRIGADO POR SEMPRE ME RECEBEREM BEM E POR TODA A AJUDA AO LONGO DOS ANOS.

MEUS AMIGOS DA ÉPOCA DE ESCOLA, TODOS OS QUE TOMARAM SEUS PRÓPRIOS RUMOS E DESEJOS E QUE, COMO DENTES-DE-LEÃO, SE DISPERSARAM POR TODOS OS CANTOS. MAS

NUNCA PERDEMOS OS CONTATOS, RESUMIDOS A PIADAS, TROCAS DE INFORMAÇÕES E ENCONTROS OCASIONAIS QUANDO NOS RETORNAMOS AO SEIO DE NOSSA FAMÍLIA. TODA A SORTE DO MUNDO PARA VOCÊS.

À SEGUNDA FAMÍLIA QUE TENHO, OS AMIGOS DE GRADUAÇÃO. COMPARTILHAMOS AS NOVIDADES, AS INSEGURANÇAS E OS MEDOS – TAMBÉM CONHECIDOS COMO PROVAS DE ANATOMIA –. UM CARINHO ESPECIAL À SEMPRE JAPONIANE ANELI ABE, À PEQUENINA MAÍCE RAMOS, À FOLHINHA A4 NATHÁLIA LOPES, À MORTÍFERA GABRIELA ERAZO (MANDE UM ‘OLÁ’ À SUA SIMPÁTICA MÃE, SE LER ESTES AGRADECIMENTOS), ALÉM DE TODOS OS DEMAIS QUE CONVERSAMOS TANTO E QUE AINDA TROCAMOS PALAVRAS INTERNET AFORA, COMO A LAYSLA, PEDRO, DANILO, DALMASSA E AQUELES QUE CONHEÇO APENAS VIRTUALMENTE, MAS QUE ARRANCAM RISOS E NOS PRESENTEIAM COM CONHECIMENTOS EM NOSSAS CONVERSAS. TUDO DE BOM PARA VOCÊS, SEMPRE!

CLARO QUE NÃO PODERIA DEIXAR DE AGRADECER OS AMIGOS QUE A IC E A PÓS-GRADUAÇÃO ME APRESENTARAM: PESSOAS INTELIGENTES, DIVERTIDAS E PRESTATIVAS QUE DESEMBARCARAM EM MEU CORAÇÃO, CONSTRUINDO MORADA NELE. ÀS MENINAS DO LASAB: MIRIAN E MARIA FERNANDA (MF) (A SEMPRE DUPLA DE NÃO-IRMÃS DE SANGUE, MAS IRMÃS DE CORAÇÃO), A NOSSA INTERNACIONAL PERUANA GABRIELA, A SEMPRE COLABORATIVA BIÓLOGA E VETERINÁRIA DANI, ASSIM COMO PARA A AMANDA, FÁBIO E MARCELO, MEUS PROFUNDOS AGRADECIMENTOS. CERTAMENTE NÃO POSSO DEIXAR DE LADO ÀS INCRÍVEIS, INTELIGENTES E BEM-HUMORADAS SUZANE E EMILLY (ETERNAS COMPANHEIRAS DE CAFEZINHOS), ISABELLA (NÃO É UMA COMPANHEIRA DE CAFEZINHOS, MAS NINGUÉM É PERFEITO, NÃO É?), THAINÁ E DIANA (AS MAIS NOVINHAS NO NOSSO EXCLUSIVO MUNDO LASABIANO), E PARA NUR TAHA (A LIBANESA QUE TENTA ME ENSINAR UM POUCO DE ÁRABE E DO MUNDO ISLÂMICO COM SEU GOSTOSO SOTAQUE). OBRIGADO POR TODOS OS MOMENTOS DE COLABORAÇÃO E DE AMIZADE.

NÃO PODERIA DEIXAR DE MENCIONAR OS BELOS MOMENTOS EM QUE A PÓS NOS PROPORCIONOU, COM SEUS CURSOS DE FÉRIAS QUE SÃO VERDADEIROS CRIADOUROS DE RISADAS E BONS MOMENTOS, REFORÇANDO VÍNCULOS E LAÇOS SOCIAIS E DE AMIZADE QUE ESPERO PERDURAREM PARA SEMPRE. COMEÇO COM A BRUNA JORGETTO, A MELHOR PESSOA PARA RESOLVER OS PEPINOS QUE SÓ UMA PÓS-GRADUAÇÃO SABER GERAR. OBRIGADO PELOS

TANTOS E-MAILS E MENSAGENS TROCADAS E O CARINHO CONSTRUÍDO AO LONGO DESTES ANOS. UM FORTE ABRAÇO PARA A 'CRECHE DA VIRGÍNIA': DÉBORA LOSNAK, COM NOSSAS RISADAS E SESSÕES DE *GAME OF THRONES* (QUE FINAL FOI AQUELE?), LAÍS YAMADA (A SEMPRE LOIRA MIÚDA PSEUDONIPÔNICA (QUE SABE CONTAR ATÉ DEZ EM JAPONÊS)), LAÍS PAIZ (A ACREANA QUE NÃO É DO ACRE (NÃO ME PERGUNTE POR QUÊ)), LORENA CRUZ E NATÁSSIA ESPOSITO (QUE VIAJAVAM EM TEORIAS CONSPIRATÓRIAS AO SOM DE DORIMÊ), BÁRBARA SUARES (NO MOMENTO EM QUE ESCREVO, MAIS INTERNACIONAL QUE NUNCA), AGHATA ALVES ("CREDO, MAMÃE" (PIADA INTERNA)), ASSIM COMO A ALESSANDRA, LUANA E AMANDA (QUE ENTRARAM POSTERIORMENTE E, APESAR DE UNS AMORES DE PESSOAS, CONSEGUIRAM ESCAPAR DE MINHAS OBSERVAÇÕES ENTRE PARÊNTESSES). NO MUNDO DA PÓS, À TATHY (E, DE QUEBRA, SEUS IRMÃOS RENATO, LARISSA E FRANCISCO) POR TODO O CARINHO, COLABORAÇÃO E BONS MOMENTOS. À THAYSA CARVALHO POR NOSSAS CONVERSAS SOBRE LIVROS E CAFÉS. SOMO AOS AGRADECIMENTOS O GRANDE TIÃO, COM TODOS O SEU CALOROSO ABRAÇO AMIGO EM NOSSOS ENCONTROS POR BOTUCATU. DESTACO TAMBÉM AOS AMIGOS DO 'MINHOCA UHAHA!' (NÃO ME PERGUNTE), O MELHOR GRUPO DE *WHATSAPP EVER*! ADORO TODOS VOCÊS!

A TODOS OS PROFESSORES QUE, COM LIVROS E CONHECIMENTO, GUIARAM MEUS PASSOS COM AS LAMPARINAS QUE GÊNIOS DO PASSADO USARAM PARA INDICAR O MELHOR CAMINHO EM BUSCA DA SABEDORIA. DESDE A 'TIA CIÇA' DOS PRIMEIROS ANOS, QUE ME ENSINOU A DESENHAR AS LETRAS, ATÉ OS MESTRES E DOUTORES QUE ME AJUDARAM A ENTENDER SOBRE A CIÊNCIA E O MUNDO NATURAL. MUITO OBRIGADO.

UM AGRADECIMENTO ESPECIAL À MINHA ORIENTADORA, SIMONE LUCHEIS, POR TODA A AJUDA DESDE A IC ATÉ OS PASSOS FINAIS DESTA TRABALHADA QUE SE APRESENTA. METADE DELE NÃO TERIA ACONTECIDO SEM SUA AJUDA (SIM, ODEIO FALAR AO TELEFONE E SUAS LIGAÇÕES SALVARAM ESTE TRABALHO). AGRADEÇO TAMBÉM MINHA COORIENTADORA, VIRGÍNIA PEREIRA, EM SUA DISPONIBILIDADE, AMIGOS-SECRETO E TODA A COLABORAÇÃO MESMO COM A CORRERIA DO DIA-A-DIA; E PARA A MARIA IZABEL (BEL), COM SEUS CAFÉS, CONSELHOS E SESSÕES DE CINEMA. OBRIGADO A TODAS POR EMPRESTAREM SEUS OMBROS PARA ALCANÇAR MEUS OBJETIVOS.

À TODOS OS PROFISSIONAIS QUE, DIRETA OU INDIRETAMENTE, PERMITIRAM QUE ESTA PESQUISA PUDESSE SER REALIZADA: OS CUIDADORES DOS ANIMAIS QUE, JUNTAMENTE COM OS VETERINÁRIOS, ME AUXILIARAM NAS COLETAS DE AMOSTRAS E TIVERAM TODA A PACIÊNCIA, CUIDADO E BOM-HUMOR EM ME ENSINAR ALGUNS DETALHES IMPORTANTES DURANTE AS VISITAS TÉCNICAS FEITAS AOS ZOOLOGICOS BRASILEIROS.

COMO SEMPRE, AGRADEÇO A OPORTUNIDADE CONQUISTADA EM COLABORAR COM O AVANÇO DO CONHECIMENTO CIENTÍFICO, MESMO EM UM DELICADO MOMENTO DE NEGAÇÃO CIENTÍFICA, ONDE TANTAS ÁREAS VÊM TRABALHANDO COM RECURSOS MINGUADOS. AINDA ASSIM, NOSSOS ESFORÇOS SÃO RECONHECIDOS PELA COMUNIDADE CIENTÍFICA DE TODO O MUNDO. À CAPES E À CIÊNCIA BRASILEIRA, SAUDAÇÕES.

CONCLUO, COMO A CEREJA QUE COLOCAMOS AO FINAL DO PREPARO DO BOLO, AGRADECENDO A MINHA LOIRINHA ÍTALO-BRASILEIRA DE OLHOS AZUIS QUE ME ACOMPANHA DESDE OS PRIMEIROS DIAS DA GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E, POR ARRANJOS DO DESTINO, SEGUIMOS A MESMA ÁREA NA PÓS-GRADUAÇÃO. SEM VOCÊ, METADE DOS PASSOS QUE TOMEI ATÉ ESTE MOMENTO JAMAIS TERIAM ACONTECIDO. À LÍVIA, MEU ETERNO AMOR E AMIZADE: SABE QUE MEU CORAÇÃO É SEU. SE EXISTEM OUTROS UNIVERSOS ALÉM DO NOSSO, ELES AINDA NÃO SERIAM SUFICIENTES PARA MENSURAR TODO O AMOR QUE SINTO POR TI. AGRADEÇO POR VIVER NESTE MESMO PLANETA E ÉPOCA COM VOCÊ PARA ME PERDER NO OCEANO DE SEUS OLHOS. ❤️

A TODOS QUE LEREM ESTE TRABALHO, AGRADEÇO A ATENÇÃO RECEBIDA. E ACESSEM MEU SITE DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA: WWW.NANO-MACRO.COM

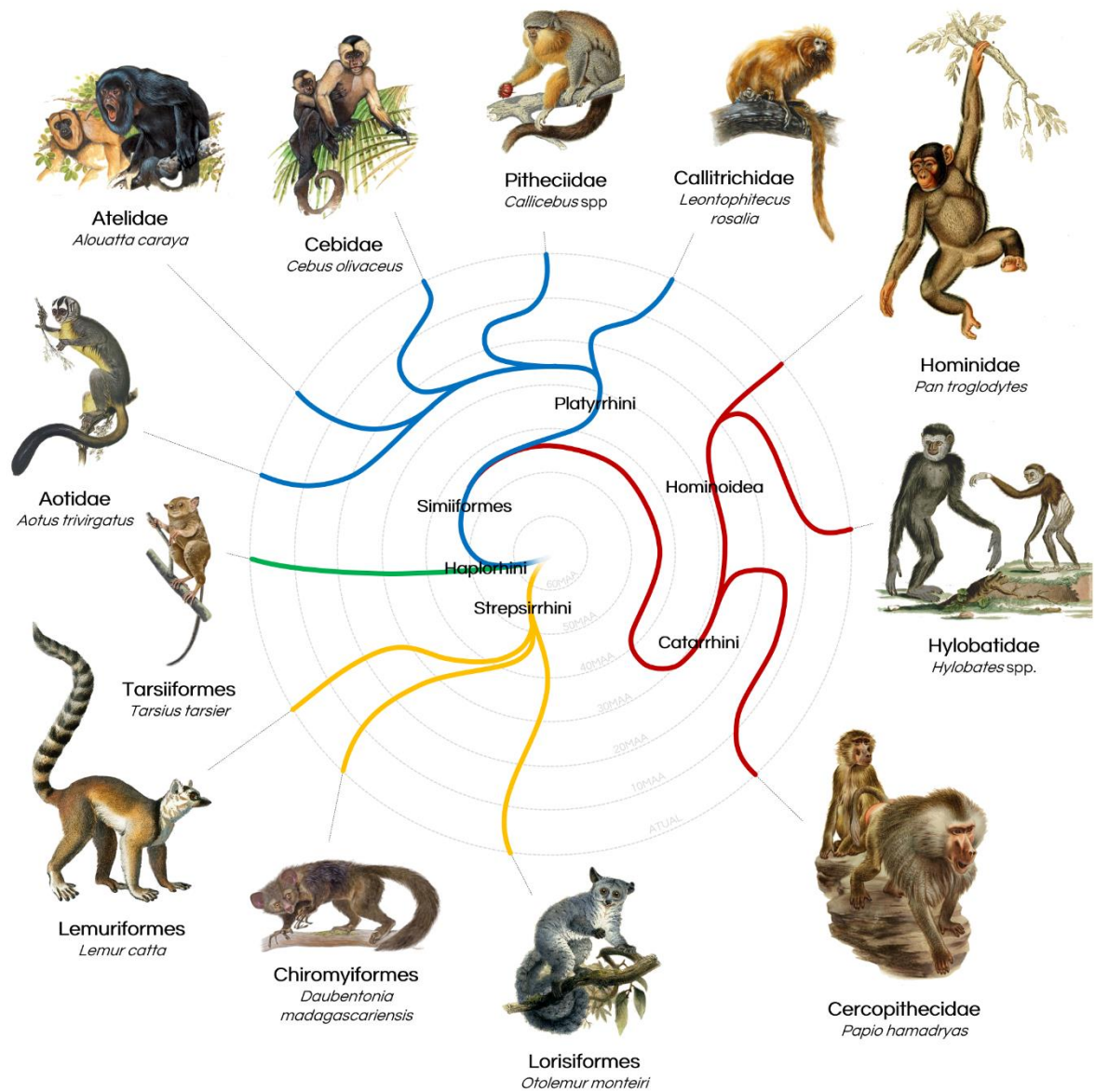
AOS PRIMATAS DESTE TRABALHO,
MEUS PARENTES EVOLUTIVOS MAIS PRÓXIMOS, MINHAS SAUDAÇÕES.

“Há tantos átomos em uma simples molécula de DNA quanto estrelas em uma galáxia típica. Somos, cada um de nós, um pequeno universo.”

(NEIL DEGRASSE TYSON)

“Eu não quero acreditar. Eu quero saber.”

(CARL SAGAN)



Na página anterior:

Árvore filogenética com os principais representantes dos primatas. Dados de relação filogenética e separação temporal de Strepsirrhini, Tarsiiformes e Catarrhini baseado em Springer et al. (2012) e Platyrrhini por Rylands e Mittermeier (2009).

© Wesley Santos (2020).

Crédito das imagens utilizadas no desenho:

O. monteiri: © Wolf Joseph: <https://www.photo.rmn.fr/archive/09-550180-2CLC2SK5AL.html>

D. madagascariensis: © Kano Serrano: <https://br.pinterest.com/pin/24277285498187755/>

L. catta: © Charles Dessalines D'Orbigny: <https://www.rawpixel.com/image/467651/free-illustration-vector-lemur-charle-dessaline-orbigny-charle-dessaline>

T. tarsier: © Encyclopædia Britannica: <https://www.britannica.com/animal/tarsier>

A. trivirgatus: © Edward Lear (restored): [https://iif.lib.harvard.edu/manifests/view/ids:30873955\\$1i](https://iif.lib.harvard.edu/manifests/view/ids:30873955$1i)

A. caraya/C. olivaceus: © Jan Dungel: <https://www.jandungel.com/en/drawings/start>

Callicebus spp.: © Geoffroy Saint-Hilaire: <https://archive.org/stream/descriptiondesma14geof/#page/n168/mode/1up>

L. rosalia: © Marek Mertinko: <http://www.blog.illustraciencia.info/2016/03/leontopithecus-rosalia-marek-mertinko.html>

P. troglodytes: © Charles Dessalines D'Orbigny: <https://www.pictureboxblue.com/vintage-animal-prints/>

Hylobates spp.: © Johann Schreber: <http://www.panteek.com/Schreber/pages/sch3-351.htm>

P. hamadryas: © Claus Caspari: <https://www.etsy.com/sq-en/listing/547259609/hamadryas-baboon-vintage-lithograph-from>

Referências:

Rylands AB, Mittermeier RA. (2009). The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. In PA Garber, A Estrada, JC Bicca-Marques et al. (Eds), South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation (pp. 23-54). Springer. doi: 10.1007/978-0-387-78705-3

Springer MS, Meredith RW, Gatesy J, Emerling CA, Park J, et al. (2012) Macroevolutionary Dynamics and Historical Biogeography of Primate Diversification Inferred from a Species Supermatrix. PLOS ONE 7(11): e49521. doi.org/10.1371/journal.pone.0049521

Resumos

Resumo

SANTOS WJ. **Pesquisa de *Trypanosoma* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões do Brasil.** 2020. 251 p. Tese (Doutorado). – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

Os tripanosomas são parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae, sendo um amplo gênero de parasitos de grande interesse médico, já que eles infectam vertebrados e utilizam diversos insetos como agentes vetores. Um dos tripanosomas mais conhecidos é *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, que infecta humanos e animais, incluindo primatas não humanos (PNH). Os PNH são naturalmente infectados por tripanosomas presentes no ambiente onde estão inseridos, mesmo os mantidos em cativeiro, como parques zoológicos e centros de conservação. Esses ambientes não estão livres da ação de insetos hematófagos que são transmissores desses tripanosomas e os PNH podem ser infectados durante atividade de repasto sanguíneo do vetor. Assim, o objetivo deste trabalho foi pesquisar tripanosomas em PNH procedentes de quatro zoológicos e um centro de conservação das cinco regiões do Brasil. Foram recebidas 576 amostras biológicas (compreendendo sangue total, soro, esfregaço por extensão e *swab* conjuntival) de 189 PNH que foram utilizadas para técnica parasitológica de esfregaço por extensão, técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e em tempo real (qPCR) para *T. cruzi* e família Trypanosomatidae. Das 140 lâminas de esfregaço por extensão, duas (1,0%) apresentaram formas sugestivas de tripanosomas, enquanto das 149 amostras de sangue de PNH, 49 (32,9%) amplificaram para *T. cruzi* ou para outro tripanosoma, além de 49 amostras (32,9%) que quantificaram pela qPCR para tripanosomatídeos (as quais 28 delas não haviam amplificado à PCR). Das 121 amostras de *swab* conjuntival, 41 PNH (34,7%) amplificaram para tripanosomas. Todos os 166 PNH foram não reagentes à técnica de RIFI. Esta pesquisa apontou a circulação de *T. cruzi* entre os PNH de cativeiro de todos os zoológicos e do centro de conservação estudados de todas as cinco regiões do Brasil, sendo o primeiro relato da presença de *T. cruzi* em PNH de cativeiro em Sorocaba, em primatas no Estado da Bahia e em primatas da região Sul do país, e primeiro a apontar a viabilidade do uso de *swab* conjuntival como método de detecção não invasiva nestes animais. Tais resultados indicam que há circulação de triatomíneos vetores desses parasitos próximos aos animais, o que se sugere a necessidade de busca ativa para controle vetorial.

Palavras-chave: doença de Chagas; macaco; diagnóstico; One Health; *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

SANTOS WJ. **Research of *Trypanosoma* spp. in captive primates from five regions of Brazil.** 2020. 251 p. Thesis (Doctor). – Medical School Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2020.

Trypanosomes are parasites belonging to the Trypanosomatidae family, being a wide genus of parasites of wide medical interest, since they infect vertebrates and use various insects as vectors. One of the most well-known trypanosomes is *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, which infects humans and animals, including non-human primates (NHP). NHPs are naturally infected by trypanosomes present in the environment, even in captivity, such as zoo parks and conservation centers. These environments are not free from the action of blood-sucking insects that transmit these trypanosomes and NHP can be infected during their blood meal activity. Thus, the objective was to research *T. cruzi* in NHP from four zoos and a conservation center in the five regions of Brazil. 576 biological samples (whole blood, serum, blood smears and conjunctival swab) of 189 NHP were received and used for parasitological technique of blood smear, serological technique of Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Polymerase Chain Reaction molecular technique (PCR) and in real time (qPCR) for *T. cruzi* and Trypanosomatidae family. Of the 140 blood smears, two (1.0%) had suggestive forms of trypanosomes, while of 149 blood samples from NHP, 49 (32.9%) amplified for *T. cruzi* or for another trypanosome, in addition to 49 samples (32.9%) that were quantified by qPCR (28 of which had not been amplified in PCR). 166 samples were tested using the RIFI technique and none were reagent. This research points to the circulation of *T. cruzi* among the NHP of all zoos and the conservation center of all regions of Brazil, being the first report of the presence of *T. cruzi* in captive NHP in Sorocaba, in the primates from State of Bahia and in primates in the Southern region of Brazil and first to point out the feasibility of using conjunctival swab as a non-invasive detection method in these animals. These results indicate that there is circulation of triatomine vectors of these parasites close to the animals, which suggests the need for an active search for vector control.

Keywords: Chagas disease; monkey; diagnosis; One Health; *Trypanosoma cruzi*.

Listas

Lista de ilustrações

FIGURA 1: Distribuição dos zoológicos e centro de conservação de primatas da pesquisa, com indicação dos números de primatas por zoológico e centro de conservação, clima e vegetação predominantes nesses ambientes. As cores no mapa indicam o clima predominante de acordo com a classificação de Koppen. Fonte: Wikipédia, com alterações.	47
FIGURA 2: Técnicas diagnósticas utilizadas a partir de amostras biológicas de primatas não humanos do estudo.. Fonte: arquivo pessoal.	50
FIGURA 3: Cronograma de coleta, recebimento e visita técnica realizados no estudo, compreendido entre o início das atividades, em agosto de 2016, até o recebimento das últimas amostras, em novembro de 2019. O período de pré-pesquisa, entre março e agosto de 2016 foi o construção do delineamento do estudo e inclui contato, por email e telefone, com os zoológicos e centro de conservação para firmar parceria na pesquisa. Legenda: para facilitar a compreensão, as siglas dos Estados (e Distrito Federal) foram usados para indicar o local do estudo onde as amostras foram colhidas, recebidas ou realizado a visita técnica. Assim, DF representa o Zoo Brasília; PR o Zoo Curitiba; SP o Zoo Sorocaba; BA o Zoo Salvador; e PA o CENP.	59
FIGURA 4: Lâminas de esfregaço por extensão com formas sugestivas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma</i> sp. observadas em dois primatas do estudo. (A), lâmina de <i>Alouatta</i> sp. proveniente do Zoo Brasília. (B), lâmina de <i>Sapajus xanthosternus</i> do Zoo Salvador. Aumento de 1000x.	60
FIGURA 5: Mapa com a distribuição dos primatas não-humanos (PNH) do estudo. As áreas dos círculos representam a quantidade de PNH amostrados ou positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os círculos coloridos (exceto o azul-claro) representam as amostras de PNH que amplificaram para o conjunto de <i>primers</i> descritos no detalhe na imagem. A sobreposição dos círculos indica amplificação de um mesmo animal para mais de um conjunto de <i>primers</i> . Os PNH do CENP (região Norte), no Pará (os círculos mais acima da imagem) é o único caso em que todas as amostras dos animais amplificaram para os <i>primers</i> 121/122. Os detalhes estão disponíveis nas tabelas no APÊNDICE E.	63
FIGURA 6: Etapas de extração de DNA seguindo o protocolo do fabricante. Os tubos na parte superior indicam que houve troca de tubos ou transferência de líquidos ou parte dele para um novo micrutubo. Os volumes utilizados, tempo de incubação e configuração das centrifugações estão disponíveis ao longo do texto.	124
FIGURA 7: Etapas de extração de DNA a partir de amostras de primatas não-humanos em swab conjuntival pelo método de salting out in house com overnight.	127
FIGURA 8: Perfil de ciclagem da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em (1), a fase da desnaturação, em que a fita de DNA é aberta, expondo as bases nitrogenadas. (2), a fase de anelamento, a qual os <i>primers</i> se ligam à fita de DNA aberta, permitindo que se inicie a síntese da nova fita. (3), fase de extensão, a qual a Taq polimerase age, construindo a nova fita de DNA usando a amostra como base. Esse ciclo se repete várias vezes.	130

FIGURA 9: Exemplo de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Cerca da primeira metade do ciclo não é possível detectar sinal de fluorescência (SF) sendo emitido pelo corante na reação. Esse início é a *baseline*, indicado pelo número 1. Assim que o SF ultrapassa o limite de detecção, entra a fase exponencial (2). As reações continuam acontecendo durante a fase linear (3), atingindo o máximo de reação na fase platô, próxima ao fim da reação (4). Abundância de material geralmente faz as amostras saírem da *baseline* mais cedo que amostras menos abundantes. Assim, amostras mais abundantes tem menos ciclos de quantificação (Cq), apresentando Cq baixo. Já amostras menos abundantes apresentam Cq alto. 132

FIGURA 10: Etapas de quantificação de parasitos para a extração de controles da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Os volumes e cálculos utilizados estão disponíveis no texto. 134

FIGURA 11: Principais etapas para sensibilização de lâminas para a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os volumes, tempo e velocidades de centrifugação estão disponíveis no texto..... 136

FIGURA 12: Principais etapas da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Ao final do processo, é possível determinar se o animal foi reagente (R) ou não reagente (NR) pela técnica. Volumes, tempo e temperaturas dos procedimentos da técnica estão disponíveis no texto. 138

FIGURA 13: Classificação dos primatas. Alguns grupos e gêneros foram desconsiderados para facilitar a compreensão. As linhas em vermelho indicam que alguns animais dentro desses grupos foram amostrados em nosso trabalho. 153

FIGURA 14: Zoo Brasília. (A), vista geral de um dos locais do Zoo Brasília, chamado de Ilha dos Primatas. Nesse espaço, alguns PNH pertencentes ao zoológico vivem livres. (B), *Sapajus libidinosus*, um dos habitantes da Ilha dos Primatas. (C), *Alouatta seniculus* em seu recinto no micário, outro espaço reservado aos PNH. (D), *Aotus nigriceps* durante contenção para coleta de amostra de sangue realizado pelo veterinário do zoológico. (E), coleta de sangue de um PNH por meio de punção venosa femoral..... 154

FIGURA 15: Zoo Salvador. (A), vista geral da Ilha dos Primatas, onde alguns PNH vivem soltos. (B), visão de alguns recintos de PNH, os quais foram construídos 'túneis' a partir de projeções da própria tela que fecha o recinto, permitindo aos PNH ficarem próximos às árvores ao redor. (C) *Sapajus xanthosternus* se alimentando, vivendo na Ilha dos Primatas. (D), *Ateles paniscus* observando através das grades do recinto onde está alojado. (E), *Alouatta caraya* em seu recinto. 155

FIGURA 16: Zoo Sorocaba. (A), recinto de PNH neotropicais cobertos por tela antimosquito, uma medida adotada pelo zoológico durante o surto de febre amarela que atingiu o estado de São Paulo em 2018, período da visita. (B), *Sapajus nigratus*, observando através de uma abertura da tela antimosquito. (C), *Papio hamadryas*, PNH do Velho Mundo em seu recinto à céu aberto. (D), Ilha dos Primatas, onde os PNH vivem livremente. (E), micário coberto, destinado aos PNH de pequeno porte. (F), *Ateles marginatus* socializando na Ilha dos Primatas. (G), *Leontopithecus chrysomelas* observando os visitantes do micário. 156

FIGURA 17: Zoo Curitiba. (A), vista da Ilha dos Primatas, local onde alguns PNH vivem livremente. (B) *Saimiri sciureus* em seu recinto em uma área do zoológico destinada aos pequenos PNH. (C), veterinário do Zoo Curitiba observa um grupo de *Ateles paniscus* em seu recinto. (D), *Ateles paniscus* que vive livremente na Ilha dos Primatas. (E), *Sapajus apella* durante procedimento de coleta de mucosa conjuntival por *swab*. (F), recinto de *Ateles paniscus*, o qual compreende parte de uma vegetação natural dentro do espaço. 157

FIGURA 18: Géis com corrida eletroforética comparando *primers* que amplificam minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*. (1), marcador de peso molecular de 100pb; (2-34), amostras do Zoo Sorocaba, de SP01 até SP33; (35), controle positivo contendo *amplicons* de *T. cruzi*; (36), controle negativo com água ultrapura. (A), resultado da corrida eletroforética para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2. (B), utilizando *primers* 121/122. 194

FIGURA 19: Géis com corrida eletroforética comparando *primers* que amplificam genes conservados em tripanosomatídeos (1), marcador de peso molecular de 100pb; (2-22), amostras do Zoo Sorocaba e Zoo Brasília; (23-24), controles positivos contendo *amplicons* de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente; (25), controle negativo com água ultrapura; (26), linha vazia. (A), resultado da corrida eletroforética para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* hsp70. (B), utilizando *primers* SSU561. 195

FIGURA 20: Amplificação e curvas de amplificação (acima e abaixo, respectivamente) dos controles quantificados de *T. cruzi* (na ordem de 10^5 a 10 parasitos/mL) utilizados na pesquisa. 220

FIGURA 21: Amplificação e curvas de amplificação (acima e abaixo, respectivamente) exemplificando a quantificação da amostra DF36 do Zoo Brasília, que também amplificou à PCR utilizando os mesmos *primers*, obtendo uma média de 120,01 parasitos/mL. 221

FIGURA 22: Amplificação e curvas de amplificação (acima e abaixo, respectivamente) exemplificando a quantificação da amostra BA24 do Zoo Salvador, que não amplificou à PCR utilizando os mesmos *primers*, obtendo uma média de $1,81 \times 10^3$ parasitos/mL. 222

Lista de tabelas

TABELA 1: Descrição dos <i>primers</i> utilizados no trabalho.	53
TABELA 2: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e número de lâminas de esfregaço sanguíneo por extensão.	59
TABELA 3: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e número de sangue total.	61
TABELA 4: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e número de <i>swab</i> conjuntival.	61
TABELA 5: resumo das informações de amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando <i>primers</i> que amplificam o gene <i>hsp70</i> , comparando com os achados utilizando os mesmos <i>primers</i> na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).	66
TABELA 6: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e o número de soro.	67
TABELA 7: relação dos primatas não-humanos (PNH) do estudo e a quantidade de animais coletados por zoológico ou centro de conservação.	151
TABELA 8: Resumo do número total de primatas não-humanos (PNH) e detalhamento do total de amostras de sangue total, soro, <i>swab</i> conjuntival e esfregaço sanguíneo de cada local.	158
TABELA 9: Detalhamento das amostras recebidas pelo Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua, Pará, com a descrição do primata não-humano (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.	159
TABELA 10: Detalhamento das amostras recebidas pelo Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoo Salvador), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.	160
TABELA 11: Detalhamento das amostras recebidas pela Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Zoo Brasília), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.	163
TABELA 12: Detalhamento das amostras recebidas pelo Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Zoo Sorocaba), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.	167
TABELA 13: Detalhamento das amostras recebidas pelo Parque Zoobotânico de Curitiba (Zoo Curitiba), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.	170
TABELA 14: Resumo dos resultados de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue dos primatas não-humanos (PNH), detalhando os valores obtidos, por local de estudo (em µg/mL).	172

TABELA 15: Resumo dos resultados de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) a partir de extração por kit comercial, detalhando os valores obtidos, por local de estudo (em µg/mL).	172
TABELA 16: Resumo dos resultados de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) a partir de extração por <i>salting out</i> , detalhando os valores obtidos, por local de estudo (em µg/mL).	172
TABELA 17: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Centro Nacional de Primatas (CENP). Os valores de DNA estão em µg/mL.	173
TABELA 18: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador. Os valores de DNA estão em µg/mL.....	174
TABELA 19: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília. Os valores de DNA estão em µg/mL.	176
TABELA 20: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba. Os valores de DNA estão em µg/mL.....	177
TABELA 21: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba. Os valores de DNA estão em µg/mL.....	179
TABELA 22: Total de primatas não-humanos (PNH) amostrados no estudo e número de animais que apresentaram amostras biológicas amplificadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	180
TABELA 23: Resumo dos resultados comparando a amplificação por mais de um alvo de interesse. Os números apontam para amplificação de amostras biológicas para o mesmo primata não-humano (PNH) em dois ou três conjuntos de <i>primers</i> . Os demais PNH apresentaram amplificação de amostras apenas para um conjunto de <i>primers</i>	181
TABELA 24: Relação de todos os primatas não-humanos (PNH) positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase a partir de amostras de sangue extraídas. Foram excluídos todos os demais PNH que, ou não continham sangue total para a técnica ou cujas amostras biológicas não amplificaram para nenhum conjunto de <i>primers</i> (exceto $\beta 1/\beta 2$).	182
TABELA 25: Total de primatas não-humanos (PNH) do Centro de Conservação de Primatas (CENP) amostrados e número de amostras de sangue de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.	183

TABELA 26: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	184
TABELA 27: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	187
TABELA 28: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	189
TABELA 29: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	192
TABELA 30: Total de primatas não-humanos (PNH) amostrados no estudo e número de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.	196
TABELA 31: Relação de todos os primatas não-humanos (PNH) positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase a partir de amostras de <i>swabs</i> conjuntivais extraídas pelo método de <i>salting out</i> . Foram excluídos todos os demais PNH que, ou não continham <i>swab</i> conjuntival coletado para a técnica ou cujas amostras não amplificaram para nenhum conjunto de <i>primers</i> (exceto $\beta 1/\beta 2$).	197
TABELA 32: Total de primatas não-humanos (PNH) do Centro de Conservação de Primatas (CENP) amostrados e número de amostras de <i>swab</i> conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.	198
TABELA 33: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador amostrados e número de amostras de <i>swab</i> conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.	199
TABELA 34: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília amostrados e número de amostras de <i>swab</i> conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	202
TABELA 35: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba amostrados e número de amostras de <i>swab</i> conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.	203
TABELA 36: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba amostrados e número de amostras de <i>swab</i> conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os <i>primers</i> do estudo.....	206
TABELA 37: Resultados de biologia molecular para todos os primatas não-humanos (PNH) de todos os locais de estudo, discriminando por tipo de amostra extraída (sangue total e <i>swab</i> conjuntival).	207

TABELA 38: Resultados de biologia molecular para as amostras de sangue total e <i>swab</i> conjuntival de primatas não-humanos (PNH) do Centro Nacional de Primatas (CENP).....	209
TABELA 39: Resultados de biologia molecular para as amostras de sangue total e <i>swab</i> conjuntival de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador.	210
TABELA 40: Resultados de biologia molecular para as amostras de sangue total e <i>swab</i> conjuntival de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília.	213
TABELA 41: Resultados de biologia molecular para as amostras de sangue total e <i>swab</i> conjuntival de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba.	215
TABELA 42: Resultados de biologia molecular para as amostras de sangue total e <i>swab</i> conjuntival de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba.	218
TABELA 43: Dados de quantificação de amostras que amplificaram na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando <i>primers</i> para gene hsp70. As amostras com campos sombreados indicam que elas também amplificaram à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os mesmos <i>primers</i>	223

Lista de abreviaturas e siglas

°C: graus Celsius; graus centígrados.

µg: micrograma.

µL: microlitro

µM: micromolar.

APTA: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios; unidade vinculada à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado de São Paulo.

BA: Bahia; estado da Bahia; estado brasileiro.

BPI: Biotecnologia, Pesquisa e Inovação; laboratório particular.

CDC: Center for Diseases Control and Prevention; Centro de Controle e Prevenção de Doenças, órgão de saúde dos EUA. Veja: EUA.

CENP: Centro Nacional de Primatas; centro na região Norte do Brasil.

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais.

CO₂: dióxido de carbono; gás carbônico.

DF: Distrito Federal; distrito do Brasil.

DNA: deoxyribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico; material genético. Também: kDNA, DNA de cinetoplasto; nDNA, DNA nuclear.

dNTP: deoxynucleoside triphosphate; desoxirribonucleotídeos trifosfatados.

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; ácido etilenodiamino tetra-acético.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ensaio imunoenzimático; sorologia.

EUA: Estados Unidos da América; Estados Unidos.

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz.

FMB: Faculdade de Medicina de Botucatu, ligada à UNESP. Veja: UNESP.

HCl: ácido clorídrico.

IAL: Instituto Adolfo Lutz, vinculado à Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo.

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade; órgão vinculado ao MMA. Veja: SISBIO; MMA.

IEC: Instituto Evandro Chagas; instituto ligado ao Ministério da Saúde do Brasil.

IFAT: Immunofluorescence Antibody Technique. Veja: RIFI.

IgG: imunoglobulina G; anticorpo.

ISO: International Organization for Standardization; Organisation Internationale de Normalisation; Organização Internacional para Padronização.

KCl: cloreto de potássio.

LASAB: Laboratório de Sanidade Animal de Bauru; laboratório da APTA. Ver: APTA.

LIT: Liver Infusion Tryptose; meio de cultura.

LTDA: limitada; sociedade limitada; sociedade empresarial limitada.

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis; software.

MgCl₂: cloreto de magnésio.

mL: mililitro.

mM: milimolar.

MMA: Ministério do Meio Ambiente; ministério do Brasil.

NCBI: National Center for Biotechnology Information; Centro Nacional para Informação em Biotecnologia; centro vinculado à Biblioteca de Medicina do Instituto Nacional de Saúde dos EUA. Veja: EUA.

nm: nanometro.

NNN: Novy, MacNeal e Nicolle; meio de cultura.

OMS: Organização Mundial da Saúde. O mesmo que: WHO.

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde; órgão de saúde vinculado à OMS.

PA: Pará; estado do Pará; estado brasileiro.

PCR: Polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase. Também: qPCR, PCR em tempo real (ou quantitativo).

PNH: primatas não-humanos.

PR: Paraná; estado do Paraná; estado brasileiro.

RFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; sorologia. O mesmo que: IFAT.

RNA: ribonucleic acid; ácido ribonucleico; material genético. Também: rRNA: RNA ribossômico.

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade; sistema eletrônico ligado ao ICMBio. Veja: ICMBio; MMA.

SP: São Paulo; estado de São Paulo; governo de São Paulo; estado brasileiro.

SSA: Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado de São Paulo. Veja: APTA.

SUCEN: Superintendência de Controle de Endemias.

TBE: solução tampão contendo Tris, ácido bórico e EDTA. Veja: TRIS; EDTA.

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano; C₄H₁₁NO₃.

U: unidade.

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; universidade estadual pública, ligada ao Governo do Estado de São Paulo.

V: Volt; voltagem.

WHO: World Health Organization. Veja: OMS.

Sumário

Sumário

1 Introdução	31
1.1 Tripanosomas.....	31
1.2 Vetores triatomíneos	34
1.3 Primatas não-humanos (PNH).....	35
1.4 PNH e tripanosomas	36
1.5 Técnicas diagnósticas	38
1.6 Zoológicos e centro de conservação de PNH	40
2 Objetivo	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3 Material e Métodos.....	47
3.1 Zoológicos e centro de conservação do estudo	47
3.2 Animais	48
3.3 Coleta de amostras biológicas.....	49
3.4 Local de realização das técnicas	50
3.5 Questões legais e de ética no uso animal.....	51
3.6 Parasitológico	51
3.6.1 Parasitológico de esfregaço sanguíneo por extensão	51
3.7 Biologia molecular	52
3.7.1 Extração do DNA	52
3.7.2 Quantificação do DNA	52
3.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para sangue.....	52
3.7.4 PCR para swab conjuntival	54
3.7.5 Eletroforese	54
3.7.6 PCR em tempo real (qPCR)	55
3.7.7 Controles	55
3.8 Sorologia	56
3.8.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	56
4 Resultados	58
4.1 Zoológicos e centro de conservação	58
4.2 Amostras biológicas	58
4.3 Parasitológico	59
4.3.1 Parasitológico de esfregaço sanguíneo por extensão	59
4.4 Biologia molecular	60
4.4.1 Amostras.....	60
4.4.2 Quantificação de DNA	61

4.4.3 PCR de sangue total.....	62
4.4.4 PCR de swab conjuntival.....	64
4.4.5 PCR de sangue total e swab conjuntival	65
4.4.6 qPCR de sangue total.....	66
4.5 Sorologia	67
4.5.1 Amostras.....	67
4.5.2 RIFI com conjugado anti-macaco	67
5 Discussão.....	69
5.1 Limitações do estudo.....	83
6 Conclusão	87
Referências	90
Manuscrito.....	109
Anexos	123
Apêndices.....	151

Introdução

1 Introdução

1.1 Tripanosomas

A família Trypanosomatidae é um amplo grupo filogenético que reúne dezenas de espécies de protozoários de diversos gêneros de interesse médico, veterinário e agrícola. Entre os animais, podem infectar praticamente todos os vertebrados existentes e diversos invertebrados que agem como vetores desses parasitos. Sabe-se que mais de 900 espécies de vertebrados e mais de 500 invertebrados podem participar do ciclo desses protozoários (Podlipaev, 2001).

Os gêneros mais conhecidos dessa família são *Trypanosoma* e *Leishmania*, responsáveis por causarem diversas doenças tanto em homens como em animais, domésticos ou não (Lukes, 2009a). Somado a isso, está o interesse dos cientistas em estudar mecanismos de interação hospedeiro-parasito-ambiente que são refinados nesses gêneros (Cooper et al., 2017).

Trypanosoma pode ser dividido em dois subgrupos: Salivaria e Stercoraria (Lukes, 2009b). O Salivaria são tripanosomas em que parte do seu ciclo de vida ocorre no interior das glândulas salivares dos insetos vetores, sobretudo em dípteros. Eles são transmitidos para vertebrados durante o repasto sanguíneo. Já Stercoraria englobam protozoários que são transmitidos via conteúdo fecal ou urinário do inseto vetor, principalmente por triatomíneos, vulgarmente conhecidos como “barbeiros”, após o repasto sanguíneo (Stevens e Gibson, 1999). Os tripanosomas atingem a corrente sanguínea do vertebrado pela abertura na pele feita pelo vetor durante o repasto.

Um dos tripanosomas do subgrupo Stercoraria mais conhecido é *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas ou, ainda, tripanossomíase americana (WHO, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é listada como uma das 20 doenças tropicais negligenciadas, que afetam cerca de um bilhão de pessoas no mundo (WHO, 2020), das quais cerca de seis a sete milhões de pessoas infectadas em toda a América Latina, sendo 4,7 milhões apenas no Brasil (Martins-Melo et al., 2014; WHO, 2019; Ministério da Saúde, 2019b).

Nos últimos anos, a doença de Chagas também foi detectada em países como os Estados Unidos, Canadá, além de locais pouco comuns para a doença, como

a Europa e, mais recentemente, na Ásia, principalmente por transfusão sanguínea (Yasukawa, 2012; Blumental et al., 2015). Acredita-se que a mobilidade populacional dos latino-americanos seja a responsável por esses países apresentarem casos de tripanossomíase (WHO, 2020). Ela chegou a ser associada como “a nova aids das Américas”, o que proporcionou debates entre os especialistas da área (Hotez et al., 2012; Pays, 2012), tendo em vista a reagudização da doença, em casos de imunossupressão do paciente.

A tripanossomíase americana convive com os humanos por milhares de anos, pois foram encontradas evidências do protozoário em tecidos mumificados de índios Chinchorro com datação estimada entre quatro a oito mil anos atrás, no Chile (Guhl et al., 1999; Guhl et al., 2014) e de pelo menos 560 anos no Brasil (Fernandes et al., 2008).

A doença foi primeiramente descrita pelo médico sanitário Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, há mais de 100 anos (Chagas, 1909). Em seu trabalho, Chagas discorre para a criação de um novo gênero, *Schizotrypanum*, nomeando a nova espécie de *Schizotrypanum cruzi*. Entretanto, a nova espécie acabou sendo inserida no existente *Trypanosoma*, gênero este que Chagas havia inserido anteriormente, em uma nota publicada um ano antes (Chagas, 1909).

Trabalhos sobre a origem do *T. cruzi* apontam que sua origem se deu logo após a separação da América do Sul da África, durante o Cretáceo médio, cerca de 100 milhões de anos atrás. Essa separação física levou a mudanças genéticas e morfológicas que a desagregaram do grupo Salivaria, adaptando-se a insetos vetores no novo continente (Haag et al., 1998). Acredita-se que os humanos entraram no ciclo do *T. cruzi* à medida que a população humana se assentava na América, sobretudo os povos andinos, com a domesticação de animais que naturalmente participavam do ciclo do parasito (Araújo et al., 2009). O mesmo ocorreu com os triatomíneos vetores, que se adaptaram ao ambiente peridomiciliar, os quais eram atraídos pela comida estocada pelos povos antigos e por animais (Schofield et al., 1999).

Os tripanosomas, principalmente *T. cruzi*, restringiam-se ao ciclo silvestre. Entretanto, com a degradação ambiental provocada pelo homem, desde práticas agropecuárias mal executadas até o avanço urbano frente a áreas rurais, vetores começaram a invadir habitações humanas, alimentando-se do sangue de animais

domesticados que se encontravam no peridomicílio, como caninos, felinos, caprinos, ovinos e principalmente em aves, como galinhas, além do próprio humano (Barreto, 1967; Coura, 2013). Além disso, outros animais silvestres foram inseridos no ciclo da doença, pois começaram a aproximar-se do peridomicílio, como os gambás (*Didelphis* spp.), em busca de abrigo e alimento (Drozino et al., 2019).

Apesar da forma clássica de transmissão ser a vetorial, outras formas de transmissão são conhecidas, como a transmissão por transfusão sanguínea (Fong et al., 2014; Angheben et al., 2015); por transplante de órgãos sólidos, ocorrendo principalmente em países não endêmicos para a tripanossomíase (Huprikar et al., 2013; Salvador et al., 2018); por transmissão congênita, com cerca de 15 mil casos ocorrendo por ano na América Latina, ocorrendo em cerca de 5 a 10% dos nascimentos em mães com a doença crônica (Carlier et al., 2015; Messenger e Bern, 2018); por acidentes laboratoriais, em que 65 de 199 (32,6%) dos casos relatados de infecção em acidentes laboratoriais foram ocasionados por *T. cruzi*, (Herwaldt, 2001; Coelho e Díez, 2015); e a infecção transmitida pela ingestão de alimentos contaminados com fezes e/ou urina contendo formas tripomastigotas de *T. cruzi*, ocasionando doença de Chagas agudo. Pode-se citar como exemplo, o hábito do consumo da polpa de açaí produzido de maneira artesanal (Barbosa et al., 2012; Ferreira et al., 2018), principalmente na região Norte do Brasil, como no Estado do Amazonas (Nóbrega et al., 2009; Souza-Lima et al., 2013; Santana et al., 2019) e, principalmente, Pará (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012; Santos et al., 2018; Barbosa et al., 2019), onde os casos apresentaram aumento nos últimos anos (Steindel et al., 2005, Vargas et al., 2018).

No Brasil, mais de 70% dos casos de doença de Chagas agudo em humanos registrados entre 2012 a 2016 foram causados por consumo de alimentos contaminados, sendo a transmissão vetorial a segunda causa, com quase 9% dos registros. A região norte do país é, disparado, a região com mais casos da doença, com mais de 1,1 mil casos no mesmo período, representando 97% de todos os registros (Ministério da Saúde, 2019a).

1.2 Vetores triatomíneos

A transmissão dos tripanosomas do subgrupo *Stercoraria* ocorre principalmente pelo inseto vetor triatomíneo, de diferentes espécies, que variam de acordo com a região onde se encontra (WHO, 2019; CDC, 2019). Já nos primeiros anos do século 20, o barbeiro foi associado à transmissão de doença de Chagas no Brasil (Neiva, 1913), sendo o *Triatoma infestans* o principal vetor da doença de Chagas no Brasil no passado. Os altos números de casos da doença de Chagas até metade do século 20 mobilizaram autoridades de saúde da época em criar medidas de controle do barbeiro em meados da década de 1960, visando a erradicação do mesmo (Silva et al., 1998).

Ainda que *T. infestans* tenha sido virtualmente eliminado do Brasil em 2006 (Ferreira e Silva, 2006), existem, ainda, mais de 60 espécies de triatomíneos identificados (Fiocruz, 2014; Galvão, 2014; Ministério das Saúde, 2019a), entre os quais se destacam, além de *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus*, que são considerados triatomíneos de grande importância epidemiológica (Coura, 2003, Ministério da Saúde, 2019a). Com o desequilíbrio ecológico, tem-se observado que triatomíneos de origem silvestre, principalmente das espécies *P. megistus*, *Rhodnius neglectus* e *Triatoma sordida*, tem se adaptado ao domicílio e peridomicílio, assim como os animais silvestres, que são cada vez mais encontrados nas cidades. Projeções apontam que as mudanças climáticas de origem antrópica podem deslocar os triatomíneos para novas regiões, expondo a população humana e de animais aos parasitos frequentemente transmitidos por esses insetos (Carmona-Castro et al., 2018).

A subfamília Triatominae pertence à ordem Hemiptera, um amplo grupo de insetos encontrados em todo o mundo. Os triatomíneos eram considerados insetos que se alimentam obrigatoriamente de sangue, mas pesquisas recentes revelam que esses insetos podem se alimentar de seiva doce de plantas, aumentando sua diversidade alimentar (Schofield, 2000; Díaz-Albiter et al., 2016).

São naturalmente encontrados nas folhas de palmeiras, cascas de árvores e frestas por entre pedras, além de pequenos refúgios próximos a vertebrados que usam como fonte de repasto sanguíneo. A aproximação de habitações humanas é variável, de acordo com a época do ano e o clima. É comum os insetos saírem dos ambientes de matas e áreas peridomiciliares durante a noite para se alimentar em

animais domésticos e humanos, para depois retornarem aos seus habitats (Lazzari et al., 2013).

Apesar da concentração de CO₂ modular uma resposta de atração ou repulsão nesses insetos durante a busca por vertebrados (Barrozo e Lazzari, 2004), seu principal mecanismo de acuidade é através do calor emanado pelos animais. Estes insetos podem detectar o calor do rosto humano cerca de dois metros de distância e até a uma distância muito maior de mamíferos do tamanho de cães domésticos (Lorenzo et al., 1999). Assim, eles conseguem identificar um potencial animal para repasto sanguíneo a grandes distâncias, mesmo durante a noite, período o qual muitos vertebrados estão dormindo.

1.3 Primatas não-humanos (PNH)

Os primatas constituem uma ordem de mamíferos terrestres que emergiram ainda durante o limite Cretáceo-Paleogeno, cerca de 70 milhões de anos atrás. Com a extinção dos dinossauros e o alvorecer das angiospermas, novos nichos estavam disponíveis aos mamíferos, que permitiu uma rápida e explosiva diversificação desse grupo de animais (Pozzi et al., 2014). Indiscutivelmente, os fósseis mais antigos de primatas verdadeiros apareceram abruptamente nos estratos da época do Eoceno tardio, mais de 55 milhões de anos atrás, na África (Silcox et al., 2017). Atualmente, há mais de 420 espécies de primatas em mais de 70 gêneros e estão amplamente distribuídos pelo mundo, sendo a espécie humana a única a ser encontrada em todos os continentes (Pozzi et al., 2014).

A ordem Primates é dividida em duas subordens, a Strepsirrhini e a Haplorhini. A primeira subordem inclui todos os lêmures e galagos, animais de grande agilidade motora, sendo a maioria de hábito noturna. Já a segunda subordem inclui todos os demais PNH conhecidos. Dentro dessa subordem, a infraordem mais conhecida é a Simiiformes, que inclui todos os PNH antropóides. Esse grupo é dividido entre Platyrrhini, ou PNH do Novo Mundo, e os Catarrhini, os primatas do Velho Mundo. Os humanos estão nesse último grupo, junto com demais PNH vivos e extintos de origem africana (FIGURA 13 no APÊNDICE A).

Os PNH do Novo Mundo chegaram à América do Sul cerca de 30 milhões de anos atrás (Nyakatura, 2019), em uma época em que essa ordem estava se

diversificando enormemente pela África e Ásia. Na América, esses animais encontraram ambiente propício para sua rápida adaptação e diversificação.

O Brasil é um dos países com maior número de PNH catalogados, com mais de 130 espécies distribuídas em quase 20 gêneros, tendo se adaptado em praticamente todos os biomas brasileiros, sendo a Amazônia o local com mais animais conhecidos, com 90 espécies (Paglia et al., 2012).

Apesar das dificuldades de manejo e observação, sempre houve um grande interesse em pesquisas com PNH, justamente por sua proximidade com os humanos e por seu avançado nível de interação social, que oferece excelentes *insights* sobre a evolução do comportamento (Schweinfurth e Call, 2019), os quais podem ser espelhados para os humanos. Pesquisas com PNH tendem elucidar melhor sobre como parasitos diversos agem no organismo e a ação de medicamentos voltados para uso humano. Tal proximidade acaba trazendo fortes questionamentos éticos do uso desses animais em pesquisa (Arnason, 2018).

1.4 PNH e tripanosomas

Grande parte do conhecimento sobre a ação do parasito e a resposta imunológica se deve a experimentos realizados em animais, sobretudo em roedores, comumente utilizados em laboratórios. Entretanto, devido à distância filogenética aos humanos, muitos dados observados não foram transpostos de forma eficaz entre os dois grupos de mamíferos (Almeida et al., 1992). O trabalho de Barreto (1967) mostrou que os PNH são considerados reservatórios silvestres do *T. cruzi*. Um dos primeiros experimentos para observar a infecção intencional a partir de triatomíneos utilizou um sagui (*Callithrix penicillata*), tendo-se verificado que o animal, transcorrido alguns dias, estava com formas evolutivas de *T. cruzi* no sangue (Chagas, 1909).

Os tripanosomas são os parasitos mais frequentemente relatados entre os PNH de região tropical (Ziccardi et al., 2000), e os primatas do Novo Mundo são naturalmente susceptíveis à doença (Philipp e Purcell, 2005).

Embora animais de cativeiro estejam mais protegidos do meio silvestre, sendo monitorados constantemente, ainda podem ser infectados por diversos parasitos, incluindo tripanosomas. O sul dos Estados Unidos (EUA) possui relatos de

casos de infecção natural por *T. cruzi* em vários animais silvestres (Bern et al., 2011). Um estudo realizado em um centro de primatas no Texas, EUA, a fim de verificar a *causa mortis* de PNH diagnosticados com miocardite, constatou por PCR de tecido cardíaco em parafina, que babuínos (*Papio* spp.) e macacos-cinomolgos (*Macaca fascicularis*) estavam infectados por *T. cruzi* (Mubiru et al., 2014). Outro estudo revelou para macacos-rhesus (*Macaca mulata*) positividade para *T. cruzi*, tanto por métodos sorológicos como moleculares nesse mesmo centro (Hodo et al., 2018).

Bugios (*Alouatta* spp.) também foram positivos para *T. cruzi* em testes sorológicos realizados nesses animais em matas no sudeste do México. Apesar de este estudo ter sido um dos primeiros a encontrar animais positivos no país, pesquisas subsequentes não foram realizadas em outros animais em outros pontos do país (Rovirosa-Hernández et al., 2013).

Na América Central, são escassos os relatos de PNH infectados por *T. cruzi*. Um trabalho da década de 1970 apontou para a presença de diversos tripanosomas em amostras de PNH colhidas no Panamá (Sousa et al., 1974) e outro estudo revelou que a circulação de tripanosomas é comum em animais silvestres também na região caribenha (Petana, 1978). Um estudo mais recente encontrou mais de 70% dos triatomíneos capturados positivos para *T. cruzi* na Colômbia caribenha, indicando uma alta circulação tanto de insetos vetores como de tripanosomas por toda essa região da América Latina (Escalante et al., 2015)

Já na América do Sul, os relatos de PNH com *T. cruzi* são mais frequentes. Animais adquiridos pelo Canadá entre 1985 a 1998 oriundos da Guiana e Peru foram positivos tanto por métodos parasitológicos de esfregaço por extensão, como por sorologia e molecular (Ndao et al., 2000). Já um estudo realizado em um centro de primatas dos EUA detectou que quase 50% dos macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) adquiridos da Bolívia foram positivos para tripanosomas (D'Alessandro et al., 1986). Outro estudo conduzido no Peru com PNH naturais do país encontrou animais positivos para *T. cruzi* e apesar de o trabalho ter encontrado uma maior prevalência de PNH de vida livre infectados quando comparados aos de cativeiro, o trabalho destacou para a importância de pesquisa em animais que estão mais próximo de humanos, como os de cativeiro (Aysanoa et al., 2017).

Há poucos estudos em outros países da América do Sul da prevalência de tripanosomas em animais, mesmo considerando animais silvestres de forma geral (Argibay et al., 2016; Yefi-Quinteros et al., 2018), focando mais nos casos em humanos. Considerando esses trabalhos, um estudo sorológico na Argentina detectou quase 10% das pessoas que vivem uma área rural como reagentes para *T. cruzi* (Hoyos et al., 2016), indicando a circulação do parasito mesmo em regiões mais ao sul da América do Sul.

No Brasil, Lisboa et al. (2000) identificaram a presença de PNH naturalmente infectados por *T. cruzi* na Reserva Biológica de Poço das Antas, no Estado do Rio de Janeiro. No estudo, mais da metade dos 118 micos-leões-dourados (*Leontopithecus rosalia*) foram positivos em técnica sorológica, além do parasito ter sido isolado em quase 40 deles. Outros estudos também apontaram a presença de tripanosomas em animais silvestres, incluindo PNH, tanto de vida livre como de cativeiro (Lisboa et al., 2000; Ziccardi et al., 2000; Roque et al., 2013; Tenório et al., 2014; Santos, 2016; Jansen et al., 2018; Reis et al., 2019).

1.5 Técnicas diagnósticas

Desde as primeiras observações a partir de esfregaços por extensão sanguínea em lâmina de Chagas (1909), as técnicas para detecção de *T. cruzi* avançaram consideravelmente. Contudo, cada técnica possui suas peculiaridades e seus usos são tão diversos quanto as finalidades das pesquisas às quais elas estão sendo utilizadas.

A mais tradicional, mas que ainda apresenta desafios na identificação, mesmo com pessoal qualificado (Wells et al., 2019), é a observação parasitológica direta, com a observação do parasito em lâminas, geralmente fixadas e coradas. Contudo, esta é uma das técnicas em que há um variável grau de concordância com outras técnicas, sobretudo quando se leva em consideração o tipo de amostra, como a partir de sangue total, que se mostra mais baixa quando comparada com amostras da camada leucocitária (Ndao et al., 2000; Maia da Sila et al., 2008; Sato et al., 2008).

Já a técnica sorológica busca identificar anticorpos produzidos pelos vertebrados que foram expostos aos patógenos. Geralmente após a infecção, o organismo cria uma resposta imunológica, que pode ser celular, mediada por linfócitos

T, e a resposta humoral, mediada por imunoglobulinas – ou anticorpos – que reconhecem o antígeno e se ligam a ele (Furman e Davis, 2015). Após o contato com o antígeno, o organismo mantém uma cicatriz sorológica, onde os anticorpos ainda são detectáveis no soro. As técnicas sorológicas buscam identificar justamente esses anticorpos para elucidar o passado sorológico do organismo.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é uma das técnicas sorológicas mais utilizadas, tendo suas bases para a pesquisa na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* descrito por Camargo (1966), tendo recebido pouquíssimas modificações ao longo do tempo. Nessa técnica, o antígeno de interesse (como *T. cruzi* mantidos em cultura) é fixado em lâminas de microscopia, os quais entram em contato com o soro do organismo estudado. Se houver a presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, eles se ligarão nos antígenos fixados na lâmina e será possível determinar se o animal foi reagente ou não à técnica (ANEXO G e ANEXO H).

O melhor entendimento da biologia molecular das últimas décadas permitiu que os pesquisadores pudessem identificar trechos específicos de material genético, desde anormalidades que levam a condições genéticas específicas (Saiki et al., 1985) até na identificação de organismos (Petrisor et al., 2005). Uma das principais técnicas moleculares é pela reação em cadeia da polimerase (PCR), que busca amplificar pequenos trechos de DNA em grandes quantidades, os quais podem ser visualizados ao se submeter o material amplificado – os *amplicons* – em uma corrida eletroforética. Os resultados são considerados de alta sensibilidade e alta especificidade. (ANEXO D).

Os trabalhos na identificação de tripanosomas ocorreram logo nos primeiros anos de padronização da técnica de PCR (Moser et al., 1989a; Moser et al., 1989b; Sturm et al., 1989), avançando consideravelmente nos últimos anos. Atualmente existem dois principais alvos de interesse na identificação de *T. cruzi*: por meio da amplificação de trechos de DNA nuclear (nDNA) ou por minicírculos de DNA cinetoplasto (kDNA), sendo este último um dos alvos apontados pela WHO como sendo melhor em análises de amostras humanas (Guarner, 2019). Além disso, muitos trabalhos buscam a amplificação de trechos conservados entre os tripanosomatídeos, os quais podem ser identificados por técnicas de sequenciamento genético. O uso de PCR em tempo real (qPCR) também se mostra uma boa ferramenta de pesquisa, já

que é possível quantificar os parasitos no material amostrado (Schijman, 2018) (ANEXO E).

Como a PCR para *T. cruzi* depende da presença do parasito na amostra para que o DNA seja amplificado, o tipo de material coletado influencia no resultado. As amostras de sangue são úteis quando o organismo parasito está na fase aguda da infecção, pois o parasito ainda circula no sangue. Contudo, na fase crônica, os tripanosomas tendem a se encistar em tecidos musculares, os quais as biópsias desses tecidos trazem melhores resultados. Apesar disso, biópsias tendem a ser menos utilizados na pesquisa, já que são métodos invasivos, tanto em estudos com humanos como em animais.

1.6 Zoológicos e centro de conservação de PNH

Mesmo com uma grande diversidade de espécies animais, o Brasil possui mais de 100 zoológicos e aquários que abrigam pelo menos 50 mil animais de diferentes espécies da fauna brasileira e espécies exóticas (Wild Welfare, 2019). Todas as regiões brasileiras possuem zoológicos de referência em manejo e cuidados, além de atrações para o público visitante e atuação em pesquisa e ensino. Tais zoológicos e centros de conservação acabam integrando, muitas vezes, o bioma onde estão localizados. Assim, a fauna e flora local acabam constituindo parte do ambiente desses espaços, o que acaba permitindo o trânsito livre de outros animais que não pertencem ao plantel dessas instituições e de insetos, alguns dos quais realizam repasto sanguíneo e podem transmitir parasitos para os animais.

O bioma Amazônia, localizado na região Norte do Brasil, possui uma grande circulação de vetores e de parasitos, sobretudo o agente da doença de Chagas. Grande parte dos casos agudos da doença, relatados em humanos nos últimos anos, foram registrados na região Norte e se deu principalmente pelo consumo da polpa de frutos não higienizados ou de triatomíneos triturados junto ao alimento, apontando para uma forte circulação do parasito e de insetos vetores neste ambiente. O estado do Pará possui altos índices de doença de Chagas em humanos, com mais de mil casos registrados entre 2012 a 2016 (Ministério da Saúde, 2019a).

O Centro Nacional de Primatas (CENP), em Ananindeua, no Estado do Pará, foi criado através da Portaria Ministerial nº 115, de 15 de março de 1978 a partir

de um convênio do Ministério da Saúde, o Ministério da Agricultura, OPAS e WHO. O CENP concentra primatas que são utilizados em diversas pesquisas básicas e aplicadas, de caráter biomédico. Estes animais estão inseridos em ambiente propício onde podem ser fonte de repasto sanguíneo de triatomíneos, visto que casos de doença de Chagas agudo ocasionado por ingestão de polpa de açaí contaminado com fezes e urina de triatomíneos já foram relatados nesse município (Homma et al., 2006; Ferreira et al., 2016).

A região Nordeste brasileira é rica em biomas, sendo o interior caracterizado pelo bioma Caatinga, e a região litorânea com resquícios da Mata Atlântica (caracterizado pela Zona da Mata). Estes biomas estão distribuídos por diversos Estados, incluindo o Estado da Bahia. O Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, em Salvador, tem mais de 700 mil m² de área construída e preservada (250 mil m² de remanescentes da Mata Atlântica). Inaugurado em 1956, o Zoológico de Salvador recebe mais de 500 mil visitantes anualmente e possui mais de 1,5 mil animais em seu plantel de mais de 150 espécies distintas, sendo 40 de mamíferos, muitos da fauna brasileira. O zoológico tem preocupação com pesquisa de manejo e reprodução, sendo conhecido por trabalhos de reprodução de macacos-prego, por exemplo. Por estar localizado na região litorânea do Estado, está inserido em um fragmento de vegetação natural de Mata Atlântica dentro do ambiente urbano soteropolitano, habitat natural para diversos triatomíneos que já foram encontrados no município (Santana et al., 2011; Ministério da Saúde, 2019a).

A região Centro-Oeste ostenta um rico ecossistema, já que é ambiente de transição entre os biomas Amazônia e Cerrado e por ser região do bioma Pantanal, considerada a maior superfície inundável do mundo (Souza et al., 2006). Tais biomas abrigam uma infinidade de ecossistemas que permitem a existência de uma grande diversidade de organismos, desde mamíferos, insetos vetores e parasitos. Casos de doença de Chagas no centro-oeste são comuns, com circulação de diversos triatomíneos nessa região, principalmente em suas áreas de Cerrado. Brasília, capital do Brasil, está localizado no Distrito Federal, um enclave dentro do Estado de Goiás.

A Fundação Jardim Zoológico de Brasília, foi inaugurada em 1957 e possui mais de 1,4 mil animais de mais de 200 espécies que estão distribuídos em mais de 1 milhão de m² de área natural e construída. Destaca-se o Santuário da Vida Silvestre, onde pesquisas importantes são conduzidas nesse espaço. Pesquisas recentes já

encontraram tanto *P. megistus*, um dos principais vetores da doença de Chagas, como PNH e outros animais positivos para a *T. cruzi* nesse zoológico, como em canídeos, felídeos e tamanduás (Minuzzi-Souza et al., 2016; Reis et al., 2019; Reis et al., 2020).

Já a região Sudeste, o predomínio do bioma Cerrado permitiu uma grande adaptação de triatomíneos de diversas espécies no ambiente peridomiciliar (Dantas et al., 2018). Comum até metade do século XX, a doença de Chagas perdeu força na região sudeste, em especial no Estado de São Paulo, depois que medidas adotadas por órgãos de saúde da época eliminaram exclusivamente o principal vetor da doença, o *T. infestans*. Entretanto, casos ainda são relatados na região, principalmente pela grande presença de triatomíneos no Estado de São Paulo e, também, pela extensa atividade agrícola da monocultura de cana-de-açúcar, onde os triatomíneos são comumente encontrados nessas plantações (Cardoso et al., 2006).

O Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba, São Paulo, recebe mais de 600 mil visitantes por ano. Inaugurado em 1968, o Zoológico de Sorocaba possui quase 130 mil m², distribuídos em áreas construídas para visitação e locais preservados, com destaque para a mata com diversas espécies livres. Considerado um dos melhores zoológicos do país, o zoológico possui importante papel na conservação de animais ameaçados de extinção, além de possuir atividades educacionais ao longo do ano, recebendo mais de 90 mil alunos por ano em suas dependências. Totalmente inserido em ambiente urbano, já foi detectada a presença de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) para *T. cruzi* nesse local (Zetun et al., 2014), além de triatomíneos terem sido encontrados na cidade nos últimos anos (SUCEN, 2016).

A região Sul do Brasil, embora caracterizada por um clima mais ameno, casos de doença de Chagas eram comumente relatados em estados como Rio Grande do Sul, no passado (Forattini, 1980). Seu bioma é caracterizado principalmente por grandes áreas abertas, as pradarias, onde assentamentos e prática da pecuária nesses locais permitem um constante contato de humanos e animais aos insetos vetores. Em 2005, caso de doença de Chagas agudo foi relatado no estado de Santa Catarina (Steindel et al., 2008), pelo consumo de caldo de cana contaminado com *T. cruzi*. Atualmente, casos de doença de Chagas crônico e a presença de triatomíneos são relatados no norte do Paraná, sobretudo em Maringá (Gasparim et al., 2018; Ferro e Silva et al., 2018; Ministério da Saúde, 2019).

O Zoológico Municipal de Curitiba, localizado na capital do Paraná, está situado no Parque Municipal do Iguaçu, ocupando uma área de quase 590 mil m², mesclando áreas construídas e naturais, recebendo mais de 600 mil visitantes por ano. Inaugurado em 1982, conta um impressionante plantel de mais de 2,3 mil animais. Pesquisas da presença de *T. cruzi* em PNH não haviam sido conduzidas até o presente estudo.

Diversas cidades do Brasil estão em processo de urbanização crescente e muitas vezes não planejado, causando desequilíbrios ambientais e ecológicos, o que pode levar vetores e reservatórios de vários parasitos a conviverem mais próximos do ambiente urbano e em busca de novas fontes de alimentação. Com isso, faz-se importante conhecer a importância epidemiológica dos PNH de cativeiro inseridos em zoológicos e centro de conservação na manutenção desses parasitos nas cinco regiões do Brasil.

Objetivos

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a presença de *Trypanosoma* em amostras de primatas não-humanos (PNH) oriundos do plantel de instituições localizadas nas cinco regiões do Brasil, por meio de técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- a. Verificar a viabilidade do uso de técnicas moleculares para a amplificação do gene conservados em amostras de sangue total e *swab* conjuntival que demandam longos períodos de transporte;
- b. Empregar o uso de *primers* que amplificam genes de interesse para a família Trypanosomatidae e para *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue total e *swab* conjuntival de PNH e a viabilidade de uso;
- c. Verificar se o uso de amostras de *swab* conjuntival para a busca molecular de tripanosomas em amostras coletadas por este método nos PNH é viável como método de detecção não-invasivo;
- d. Verificar a viabilidade do uso de método parasitológico de esfregaço sanguíneo por extensão para detecção direta do parasito a partir das amostras de sangue de PNH;
- e. Empregar método sorológico na busca de anticorpos anti-*Trypanosoma* nas amostras de soro dos PNH;
- f. Compreender a disseminação de *Trypanosoma* por entre os PNH dos zoológicos e centro de conservação estudados;
- g. Divulgar os resultados obtidos aos médicos veterinários e funcionários que possuem contato direto os animais sobre os resultados encontrados, para que desenvolvam estratégias de controle da disseminação nestes locais.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Zoológicos e centro de conservação do estudo

Todos os primatas do estudo são provenientes dos quatro zoológicos e de um centro de conservação de primatas, um de cada região do Brasil (FIGURA 1).

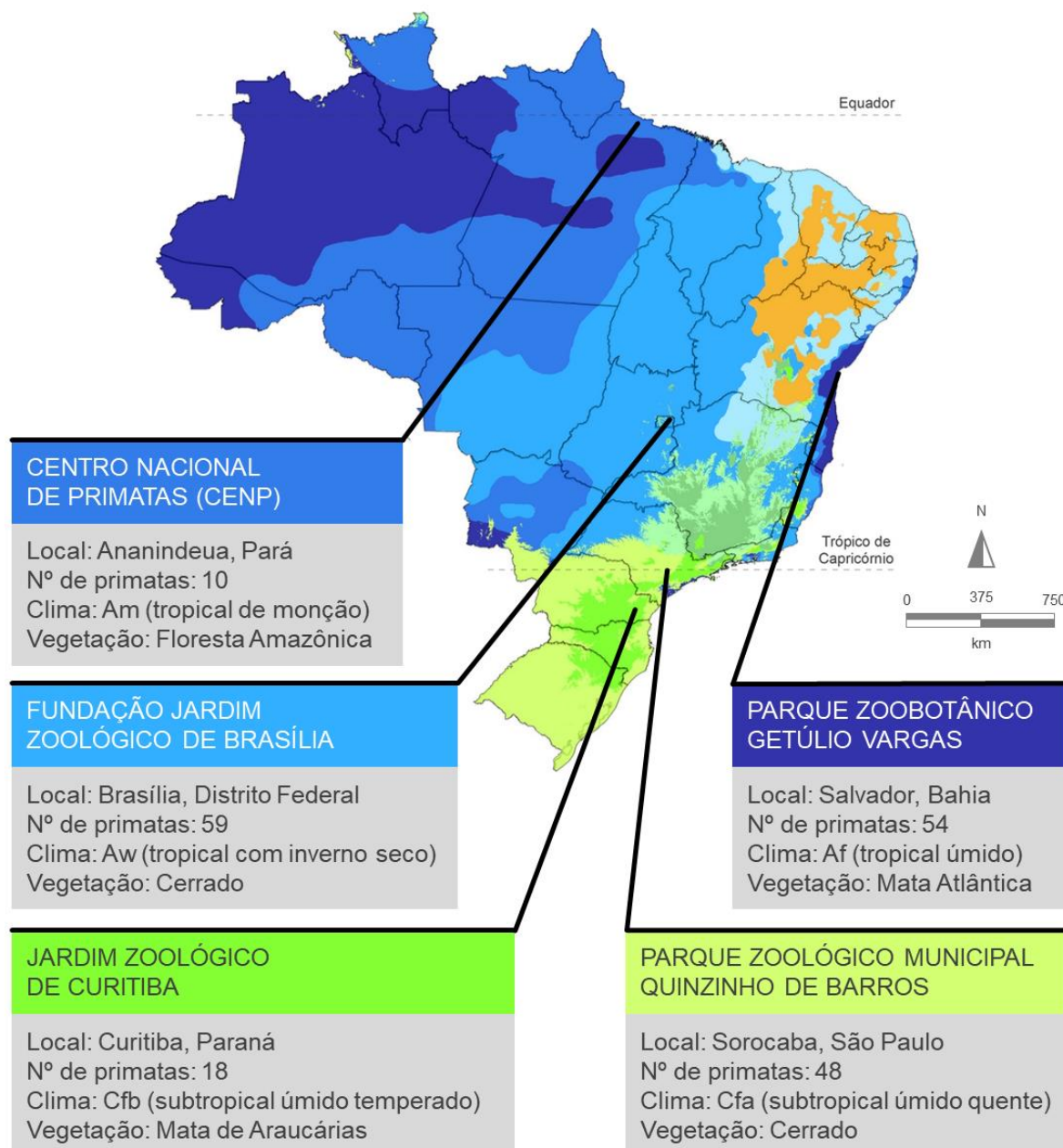


FIGURA 1: Distribuição dos zoológicos e centro de conservação de primatas da pesquisa, com indicação dos números de primatas por zoológico e centro de conservação, clima e vegetação predominantes nesses ambientes. As cores no mapa indicam o clima predominante de acordo com a classificação de Köppen. Fonte: Wikipédia, com alterações.

A região norte do Brasil foi representada pelo Centro Nacional de Primatas (CENP), um centro de conservação de primatas vinculado à Secretaria de Vigilância

em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS). Está localizado na cidade de Ananindeua, Estado do Pará (1°23'00"S 48°22'50"W).

A região nordeste foi representada pelo parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoo Salvador), vinculado à Secretaria do Meio Ambiente do Estado da Bahia. Está localizado próximo à orla em Salvador, capital da Bahia (13°00'24"S 38°30'27"W).

A Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Zoo Brasília) foi o espaço escolhido para a região centro-oeste brasileira. É mantido indiretamente pela Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do DF e de empresas parceiras e está localizado em Brasília, Distrito Federal (15°50'39"S 47°56'35"W).

A região sudeste foi representada pelo Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Zoo Sorocaba). Pertence à Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura de Sorocaba, São Paulo (23°30'18"S 47°26'14"W).

O Jardim Zoológico de Curitiba (Zoo Curitiba) representa a região sul do Brasil. Localizado em Curitiba, Paraná (25°33'33"S 49°13'53"W), o local pertence a Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura de Curitiba.

Os quatro zoológicos foram visitados durante o período de estudo, com o objetivo de compreender a rotina e o manejo dos PNH, bem como entender o espaço onde esses animais vivem e as áreas ao seu entorno. Devido a questões técnicas, o CENP foi o único local onde não foi possível a visita.

Faz-se necessário informar que o CENP não é considerado um zoológico, mas um centro de conservação de primatas que foi incluído em nosso trabalho. Portanto, não é possível tratar nesse estudo e relacionar os locais como sendo 'cinco zoológicos', mas sim como quatro zoológicos e um centro de conservação.

3.2 Animais

Ao todo, 189 (cento e oitenta e nove) PNH de 16 gêneros (ao menos 38 espécies) foram utilizados nesse estudo, todos distribuídos de forma não igual entre os quatro zoológicos e o centro de conservação de primatas citados anteriormente. Dos 16 gêneros estudados, apenas dois são PNH do Velho Mundo, enquanto os 14 demais são de PNH do Novo Mundo. Foram coletadas amostras biológicas de 10 PNH do CENP, 54 PNH do Zoo Salvador, 59 PNH do Zoo Brasília, 48 PNH do Zoo

Sorocaba e 18 PNH do Zoo Curitiba. A descrição detalhada dos animais por espécie e origem está disponível na TABELA 7 no APÊNDICE A.

3.3 Coleta de amostras biológicas

Todas as coletas de amostras biológicas dos PNH foram realizadas pelos médicos veterinários e funcionários dos locais onde os animais estavam contidos. Foram seguidos os protocolos de contenção e coleta de amostras biológicas pré-estabelecidas de cada local do estudo, nunca coletando mais de um animal por vez. Foi aproveitada a rotina de manejo dos próprios zoológicos e centro de conservação, a fim de reduzir o estresse no manejo desnecessário dos animais.

A coleta de sangue foi realizada pelo médico veterinário responsável do local, mediante assepsia com álcool 70% e punção venosa periférica. Uma alíquota do sangue coletado, de valor variável mediante cada coleta, foi armazenada em tubos BD Vacutainer® com EDTA K2 para a realização dos exames parasitológicos de esfregaço por extensão sanguíneo e de técnicas moleculares.

Outra alíquota de sangue, de valor variável, foi armazenada em tubos BD secos, para a realização de técnicas sorológicas.

Durante a contenção dos PNH, foram realizadas colheitas de mucosa conjuntival com auxílio de *swab* estéril, os quais foram imediatamente acondicionados em microtubos livres de DNases e RNases, para uso em técnicas de biologia molecular.

Todo o monitoramento pós-contenção foi realizado pela equipe dos zoológicos e do centro de conservação, a fim de garantir o bem-estar dos PNH.

As amostras de sangue (em tubos com EDTA e seco) e os *swabs* foram acondicionados em caixas isotérmicas e encaminhadas via Correios até o laboratório. A FIGURA 2 ilustra os tipos de amostras recebidas neste estudo dos zoológicos e centro de conservação.

Devido a rotina e as condições específicas no momento da coleta, cada zoológico coletou uma quantidade variável de amostras de cada primata do estudo. O número mínimo aceitável para ser incluído no estudo foi de uma amostra biológica por PNH, independente da amostra ser sangue total, soro, *swab* conjuntival e esfregaço

sanguíneo, sendo quatro o número máximo de amostras por PNH. Assim, dos 189 PNH do estudo, um total de 576 amostras biológicas foram recebidas entre 2017 a 2019. O detalhamento da quantidade de amostras por tipo (sangue total, soro, *swab* conjuntival e esfregaço por extensão) estão disponíveis na TABELA 8 do APÊNDICE C.

A descrição completa do tipo de amostra biológica coletada por PNH de cada zoológico e centro de conservação do estudo estão disponíveis nas TABELA 9 a TABELA 13 do APÊNDICE C.



FIGURA 2: Técnicas diagnósticas utilizadas a partir de amostras biológicas de primatas não humanos do estudo..
Fonte: arquivo pessoal.

3.4 Local de realização das técnicas

As técnicas de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal de Bauru (LASAB), da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA/SAA-SP), em Bauru, São Paulo e no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz (IAL), Centro de Laboratórios Regionais Bauru, São Paulo.

As técnicas de sorologia foram conduzidas no Laboratório de Sorologia do IAL, em Bauru, São Paulo. Já as técnicas parasitológicas de esfregaço sanguíneo por extensão foram realizadas no LASAB/APTA/SAA-SP, em Bauru, São Paulo.

3.5 Questões legais e de ética no uso animal

Todos os procedimentos conduzidos nos PNH seguiram os protocolos de bem-estar animal adotados nos zoológicos e centro de conservação do estudo.

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu, São Paulo, sob número 1213/2017 (ANEXO I), além de ter sido aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob número 57382-3 (ANEXO J).

A pesquisa também foi aprovada pelos zoológicos e centro de conservação do estudo, os quais autorizaram a coleta de material biológico dos PNH sob suas responsabilidades.

O uso dos PNH do CENP foi aprovado pelo CEUA do Instituto Evandro Chagas (IEC), sob o número 20/2019 (ANEXO K). O uso dos PNH do Zoo Salvador, Zoo Brasília, Zoo Sorocaba e Zoo Curitiba também receberam declaração de aprovação, seguindo os trâmites internos de cada zoológico (ANEXO L a ANEXO O).

3.6 Parasitológico

3.6.1 *Parasitológico de esfregaço sanguíneo por extensão*

Para a realização da técnica de esfregaço sanguíneo por extensão, uma gota de sangue de cada animal foi depositada em lâminas de vidro. Posteriormente, as lâminas foram coradas pela técnica de Giemsa. As lâminas foram secas naturalmente e armazenadas em caixas de madeira até o momento da observação em microscopia ótica com óleo de imersão em aumento de 1000X.

3.7 Biologia molecular

3.7.1 Extração do DNA

As técnicas de extração de DNA a partir do sangue armazenado em tubos com EDTA foram realizadas utilizando o kit de extração comercial Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit® (GE Healthcare®), seguindo o protocolo do fabricante, disponível no ANEXO A.

As técnicas de extração de DNA a partir dos *swabs* conjuntivais foram realizados utilizando o mesmo kit comercial para as amostras de sangue total. Também foi realizado a extração de DNA destas amostras através de um método *in house* por *salting out* com *overnight*, adaptado a partir de Benassi et al. (2017), tendo suas etapas descritas no ANEXO B.

3.7.2 Quantificação do DNA

Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas utilizando o aparelho NanoVue Plus (GE Healthcare). A metodologia de leituras de quantificação está disponível no ANEXO C.

3.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para sangue

Para a amplificação de trechos específicos de DNA de interesse no estudo a partir das amostras de sangue total extraídas, foi realizada a técnica molecular de PCR, que foi realizada nas seguintes condições: cada tubo de reação de 0,2mL recebeu tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, EUA), 0,2µM de cada *primer*, 1µL da amostra testada e 8,3µL de água ultra pura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo continha 11µL do MIX-PCR e 1µL do produto de extração do DNA. Os procedimentos da PCR estão descritos no ANEXO D.

A PCR foi realizada utilizando os termocicladores Mastercycler Pro® (Eppendorf) e 96 Well Thermal Cycler® (Applied Biosystems). Os alvos gênicos de interesse, os *primers* utilizados e os perfis de ciclagem utilizados na PCR estão descritos na TABELA 1, abaixo.

TABELA 1: Descrição dos *primers* utilizados no trabalho.

Amplificação de interesse	Alvo gênico	Primers e tamanho aproximado dos amplicons (em pares de bases (pb))	Perfil de ciclagem e referência
Gene constitutivo	Gene beta-globulina	β1: 5'ACCACCAACTTCATCCACGTTTAC3'; β2: 5'CTTCTGACACAACGTGTGTTCACTAGC3' ≈120pb	1x (95 °C/5min); 30x (95 °C/30s, 60 °C/30s, 72 °C/30s); 1x (72 °C/5min) (Edvinsson, 2006).
<i>Trypanosoma cruzi</i>	DNA nuclear	TCZ1: 5'CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT3'; TCZ2: 5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3' ≈180pb	1x (94 °C/30s); 25x (94 °C/20s, 57 °C/30s, 72 °C/30s); 1x (72 °C/30min) (Virreira et al., 2003; Moser et al., 1989b, com modificações).
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Minicírculos de kDNA	121: 5'AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA3'; 122: 5'GGTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA3' ≈350pb	1x (94 °C/3min); 35x (94 °C/30s, 57 °C/30s, 72 °C/30s); 1x (72 °C/7min) (Fitzwater et al., 2008).
Família Trypanosomatidae	Gene codificador da proteína de choque térmico (hsp70)	HSP70F: 5'AGGTGAAGGCGACGAACG3'; HSP70R: 5'CGCTTGTCCATCTTTGCGTC3' ≈300/400pb	1x (94 °C/4min); 40x (94 °C/30s, 59 °C/30s, 57 °C/30s); 1x 72 °C/10min) (Hernandez et al., 2014, com modificações).
Família Trypanosomatidae	Região V7/V8 do gene 16S SSU rRNA	SSU561F: 5'TGGGATAACAAAGGAGCA3'; SSU561R: 5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3' ≈650pb	30x (94 °C/30s, 54 °C/1min, 72 °C/2min) (Noyes et al., 1996).

3.7.4 PCR para swab conjuntival

Para a PCR de *swab* conjuntival, as amostras foram submetidas às mesmas condições descritas para a PCR convencional de sangue total, com a diferença da realização de PCR da PCR de todas as amostras extraídas. Assim, os *amplicons* resultantes da primeira rodada de PCR serviram de amostras para a realização da segunda rodada de PCR. Esta técnica visa aumentar a quantidade de *amplicons* no final do trabalho, considerando a baixa concentração de DNA obtidas na extração.

Foi utilizado o termociclador Eppendorf Mastercycler Pro® e utilizado os mesmos *primers* com o mesmo perfil de ciclagem descrito na TABELA 1.

3.7.5 Eletroforese

Alíquotas de 10µL dos *amplicons* foram homogeneizadas com 2µL de preparado de azul de bromofenol, e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA).

A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 2,0%, preparado com TBE 0,5X (0,05M Tris, 0,045M de ácido bórico e 0,0005M de EDTA), corado com SybrSafe® (Invitrogen®) 0,1µL/mL. A voltagem utilizada foi de 100V com tempo variável, condizente com o tamanho do gel, com tempo mínimo de 50 minutos.

Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger® 100bp DNA Ladder (Norgen®) e o tamanho dos fragmentos amplificados foram comparados visualmente com os padrões de peso molecular. Cepas-padrão foram utilizadas como controles positivos. Foi utilizado o transiluminador Major Science® Compact Digimage System® UVDI Series para visualização em luz ultravioleta (254nm). As imagens do gel foram registradas com uso da câmera fotográfica Canon PowerShot® G12, com as seguintes configurações: exposição de oito segundos, ISO 1250 e demais configurações em modo automático.

3.7.6 PCR em tempo real (qPCR)

Para a determinação da carga parasitária nas amostras de sangue total extraídas dos PNH, foi realizada a qPCR. Utilizou-se o sistema SYBR®Green por meio do reagente Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific). As reações ocorreram em placas MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific). Cada poço de 0,1mL recebeu 12µL de água ultrapura, 10µL do reagente SYBR®Green e 0,5µL de cada *primer* (MIX-qPCR). Assim, cada poço da placa continha 23µL de MIX-qPCR mais 2µL da amostra extraída, totalizando 25µL. Todas as amostras foram testadas em duplicata na mesma placa.

As placas passaram pelo processo de ciclagem e leitura por meio do equipamento StepOne® Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems® by Thermo Fisher Scientific). Para a realização da curva-padrão foram utilizadas amostras de DNA de cepas de *T. cruzi*, nas concentrações decrescentes de 10⁵ a 10 parasitos/mL. Todos os controles foram colocados na placa em triplicata. Os procedimentos da qPCR foram descritos no ANEXO E.

Foram utilizados os *primers* que amplificam o gene codificador hsp70, segundo Hernandez et al. (2014), os mesmos utilizados na PCR convencional (disponível na TABELA 1). O perfil de ciclagem para a qPCR foi de um ciclo inicial de desnaturação à 95 °C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 1min, com a captura de sinais de fluorescência no final de cada ciclo além de mais um ciclo final para a curva de dissociação, com os dados sendo armazenados e analisados pelo software StepOne® Software v2.3.

3.7.7 Controles

Como controles positivos para PCR foram utilizadas DNA extraído a partir de cepas Y de *T. cruzi*, que foram mantidas em cultivo no LASAB/APTA/SAA-SP Bauru em meio NNN-LIT (Novy, MacNeal, Nicolle e Liver Infusion Tryptose) em estufa a 25 °C, repicados conforme rotina no laboratório. Água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo.

Para os controles para a qPCR foram utilizadas cepas Y de *T. cruzi* mantidas em cultivo em meio NNN-LIT no LASAB/APTA/SAA-SP. A quantificação dos parasitos por μL foi feita utilizando câmara de Neubauer. A partir da obtenção do concentrado em 10^5 parasitos por mL, foi realizado uma diluição seriada até a concentração de 10 parasitos por mL. Foram extraídos o DNA a partir desses concentrados, que foram utilizados como controles de quantificação para a qPCR. Água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo. A descrição da técnica de quantificação dos controles pode ser vista no ANEXO F.

3.8 Sorologia

3.8.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Foram utilizados como antígenos cepa Y de *T. cruzi* mantidos em tubos rosqueados contendo NNN-LIT. As lâminas foram sensibilizadas utilizando 10 μL da suspensão de epimastigotas. A técnica de RIFI foi realizada de acordo com Camargo (1966), com a utilização do conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de macaco (IgG, γ chain specific, Sigma-Aldrich®), diluído 1:500 em solução de Azul de Evans a 20%. Foi utilizado também o conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de humano. As técnicas de sensibilização e os procedimentos da RIFI estão descritos nos ANEXO G e ANEXO H.

Apenas as amostras de soro com titulação a partir de 20 foram consideradas positivas.

Resultados

4 Resultados

4.1 Zoológicos e centro de conservação

Ao todo, quatro zoológicos e um centro de conservação participaram do estudo, sendo um local de cada região administrativa do Brasil. Cada local apresenta condições climáticas, de vegetação e altitude distintas.

Foram realizadas visitas técnicas em todos os zoológicos entre 2016 a 2018 e foram feitos registros fotográficos dos locais onde os animais eram instalados, sobretudo os PNH, bem como diversas características de funcionamento desses zoológicos, como a rotina de alimentação e de manejo, além dos aspectos veterinários¹ relacionados à saúde e bem-estar dos animais. O registro fotográfico das visitas técnicas a esses locais pode ser visto das FIGURA 14 a FIGURA 17 disponíveis no APÊNDICE B.

Por dificuldades técnicas e financeiras, o CENP foi o único local do estudo em que não foi possível realizar nenhum tipo de visita ou acompanhamento de suas atividades, sendo algumas informações obtidas apenas por telefone, e-mail ou site.

4.2 Amostras biológicas

Foram recebidas no LASAB/APTA entre os dias 18 de maio de 2017 a 05 de novembro de 2019, 576 amostras de 189 PNH dos quatro zoológicos e de um centro de conservação. Com base nos dados enviados pelos veterinários, as amostras foram colhidas entre 05 de outubro de 2016 a 24 de outubro de 2019. Detalhamento das quantidades de amostras biológicas por PNH de cada zoológico e centro de conservação, assim como datas de coletas e recebimento destas estão disponíveis nas TABELA 9 a TABELA 13, no APÊNDICE C.

Ao todo foram recebidas 149 amostras de sangue total, 166 amostras de soro, 121 amostras de *swab* conjuntival e 140 lâminas de esfregaço por extensão. Dos 189 PNH, 127 possuíam conjuntamente amostras de sangue total e soro (67,2%).

¹ Por aspectos veterinários entende-se o conjunto de informações fornecida, quando possível, pela equipe responsável pelo manejo dos PNH de cada localidade estudada, a respeito das características físicas dos animais, como peso e altura, além de presença de co-morbididades e a presença ou não de outras doenças, como verminoses. Contudo, como houve pouco registros destes dados adicionais, eles foram descartados na versão final desta tese.

A TABELA 8, disponível no APÊNDICE C, traz um detalhamento resumido das quantidades de amostras coletadas por local do estudo. A FIGURA 3 ilustra o período de coletas e recebimento das amostras, bem como os períodos de visita técnica feitos ao longo do estudo.

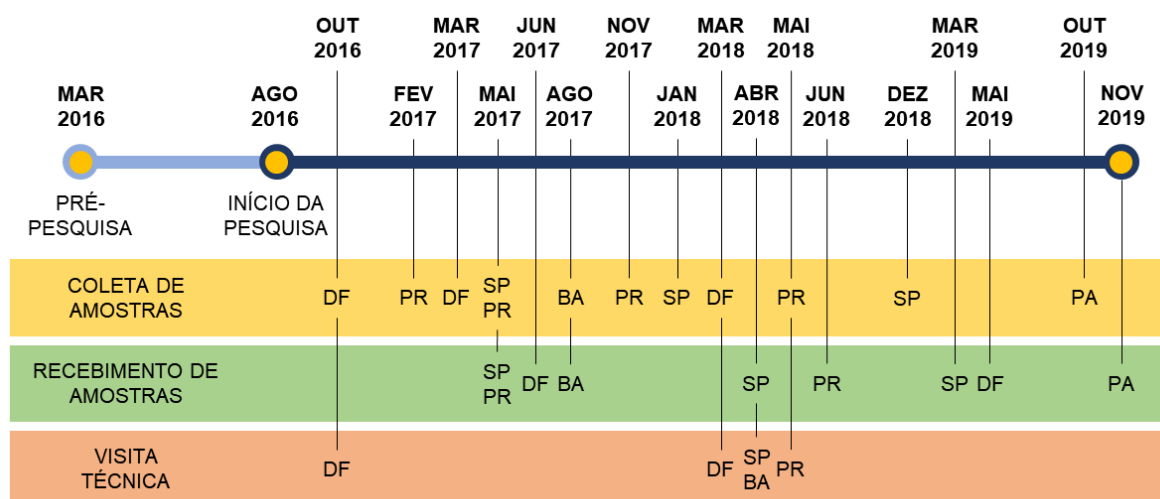


FIGURA 3: Cronograma de coleta, recebimento e visita técnica realizados no estudo, compreendido entre o início das atividades, em agosto de 2016, até o recebimento das últimas amostras, em novembro de 2019. O período de pré-pesquisa, entre março e agosto de 2016 foi o construção do delineamento do estudo e inclui contato, por email e telefone, com os zoológicos e centro de conservação para firmar parceria na pesquisa. Legenda: para facilitar a compreensão, as siglas dos Estados (e Distrito Federal) foram usados para indicar o local do estudo onde as amostras foram colhidas, recebidas ou realizado a visita técnica. Assim, DF representa o Zoo Brasília; PR o Zoo Curitiba; SP o Zoo Sorocaba; BA o Zoo Salvador; e PA o CENP.

4.3 Parasitológico

4.3.1 Parasitológico de esfregaço sanguíneo por extensão

Das 576 amostras de 189 PNH, foram recebidas 140 lâminas de esfregaço sanguíneo, coradas pela técnica de Giemsa. Detalhes das quantidades de lâminas recebidas por zoológico e centro de conservação estão disponíveis na TABELA 2.

TABELA 2: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e número de lâminas de esfregaço sanguíneo por extensão.

	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
Total de PNH	10	54	59	48	18	189
Lâminas de PNH	10	53	14	46	17	140

Relação (em %)	100	98,1	23,7	95,8	94,4	74,0
-------------------	-----	------	------	------	------	------

A partir de observações nas lâminas, foi possível encontrar formas sugestivas de tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. em duas (1,0%), sendo um primata do Zoo Brasília e um do Zoo Salvador, do gênero *Alouatta* (DF56) e *Sapajus xanthosternos* (BA04), respectivamente. As formas sugestivas podem ser visualizadas na FIGURA 4.

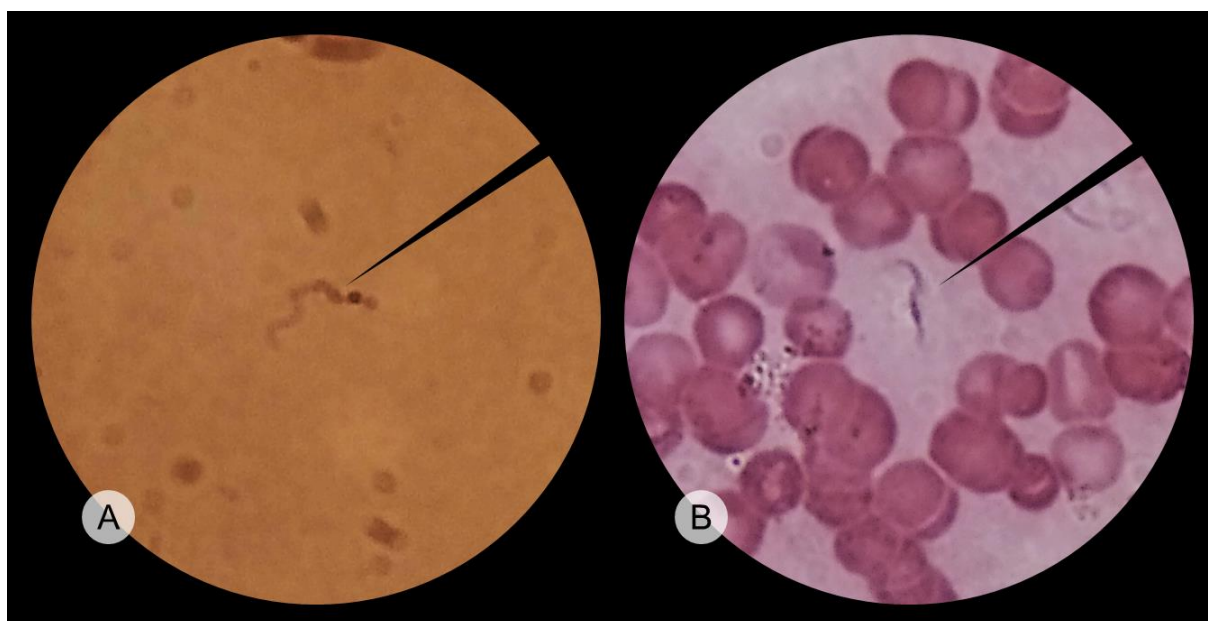


FIGURA 4: Lâminas de esfregaço por extensão com formas sugestivas de tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. observadas em dois primatas do estudo. (A), lâmina de *Alouatta* sp. proveniente do Zoo Brasília. (B), lâmina de *Sapajus xanthosternos* do Zoo Salvador. Aumento de 1000x.

4.4 Biologia molecular

4.4.1 Amostras

Foram analisadas 149 amostras de sangue total dos 189 PNH, destinadas à biologia molecular passando pelo processo de extração de DNA. Os detalhes das quantidades de sangue total recebidas por zoológico e centro de conservação estão disponíveis na TABELA 3.

Também foram feitas extração de DNA a partir de *swab* conjuntival. Todas as 121 amostras de *swab* dos quatro zoológicos e de um centro de conservação foram

processadas. Detalhes das amostras recebidas por local estão disponíveis na TABELA 4.

TABELA 3: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e número de sangue total.

	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
Total de PNH	10	54	59	48	18	189
Sangue de PNH	10	53	20	48	18	149
Relação (em %)	100	98,1	33,9	100	100	78,8

TABELA 4: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e número de *swab* conjuntival.

	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
Total de PNH	10	54	59	48	18	189
<i>Swab</i> de PNH	10	47	5	47	12	121
Relação (em %)	100	87,0	8,8	97,9	66,6	64,9

4.4.2 Quantificação de DNA

Todas as amostras extraídas de sangue total e *swab* conjuntival foram quantificadas. Os dados resumidos de quantificação a partir da extração de sangue total de cada zoológico e centro de conservação está disponível na TABELA 14 no APÊNDICE D. Já os valores para *swab* conjuntival utilizando o método comercial de sangue para a extração de DNA estão disponíveis na TABELA 15, enquanto que os valores de quantificação dos *swabs* a partir do método de extração por *salting out* estão disponíveis na TABELA 16, no mesmo apêndice.

Os dados completos da concentração do DNA e a relação $^{260}/_{280}$ obtida a partir das amostras extraídas de sangue total e *swab* conjuntival dos PNH dos

zoológicos e centro de conservação do estudo estão disponíveis nas TABELA 17 a TABELA 21, todos disponíveis no APÊNDICE D.

4.4.3 PCR de sangue total

Todas as 149 amostras de DNA extraídas a partir de sangue total dos PNH foram submetidas a PCR utilizando *primers* que amplificam o gene codificador da beta-globulina, uma região conservada presente em diversos organismos, se tornando útil como um indicador da qualidade de extração do DNA. Todas amplificaram o trecho de interesse, indicando a viabilidade do método utilizado no trabalho.

Usando *primers* que amplificam trechos de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, 36 PNH (24,2%) amplificaram, sendo todos por meio dos *primers* 121/122 e nenhum pelos *primers* TCZ1/TCZ2. A comparação entre as corridas eletroforéticas pode ser vista na FIGURA 18 no APÊNDICE E.

Com a utilização de *primers* que amplificam o gene codificador hsp70, presente em tripanosomatídeos, 21 amostras de PNH (14,1%) apresentaram amplificação. Os *primers* que amplificam a região V7/V8 do gene 16S SSU rRNA também presente em tripanosomatídeos 14 amostras de PNH (9,4%) amplificaram. A FIGURA 19 no APÊNDICE E apresenta uma das corridas eletroforéticas utilizando esses *primers*.

Foram realizadas no total, 745 reações de PCR para os cinco conjuntos de *primers* do estudo, os quais 220 apresentaram algum tipo de amplificação (29,5%). Excluindo as reações utilizando-se os *primers* $\beta 1/\beta 2$, foram 71 amostras (9,5%). A FIGURA 5 a seguir apresenta uma descrição visual no mapa da distribuição, tanto dos PNH do estudo como dos animais positivos. Quarenta e nove dos 149 PNH (32,9%) do estudo amplificaram para pelo menos um conjunto de *primers* – exceto $\beta 1/\beta 2$. Todos os dados resumidos estão disponíveis na TABELA 14 disponível no APÊNDICE E. Ao menos 16 espécies foram positivas para um dos conjuntos de *primers* de interesse no estudo. Os dados podem ser vistos na TABELA 22, enquanto que na TABELA 23, ambas no APÊNDICE E, observa-se o número de PNH que apresentaram amostras biológicas amplificadas em mais de um conjunto de *primers*.

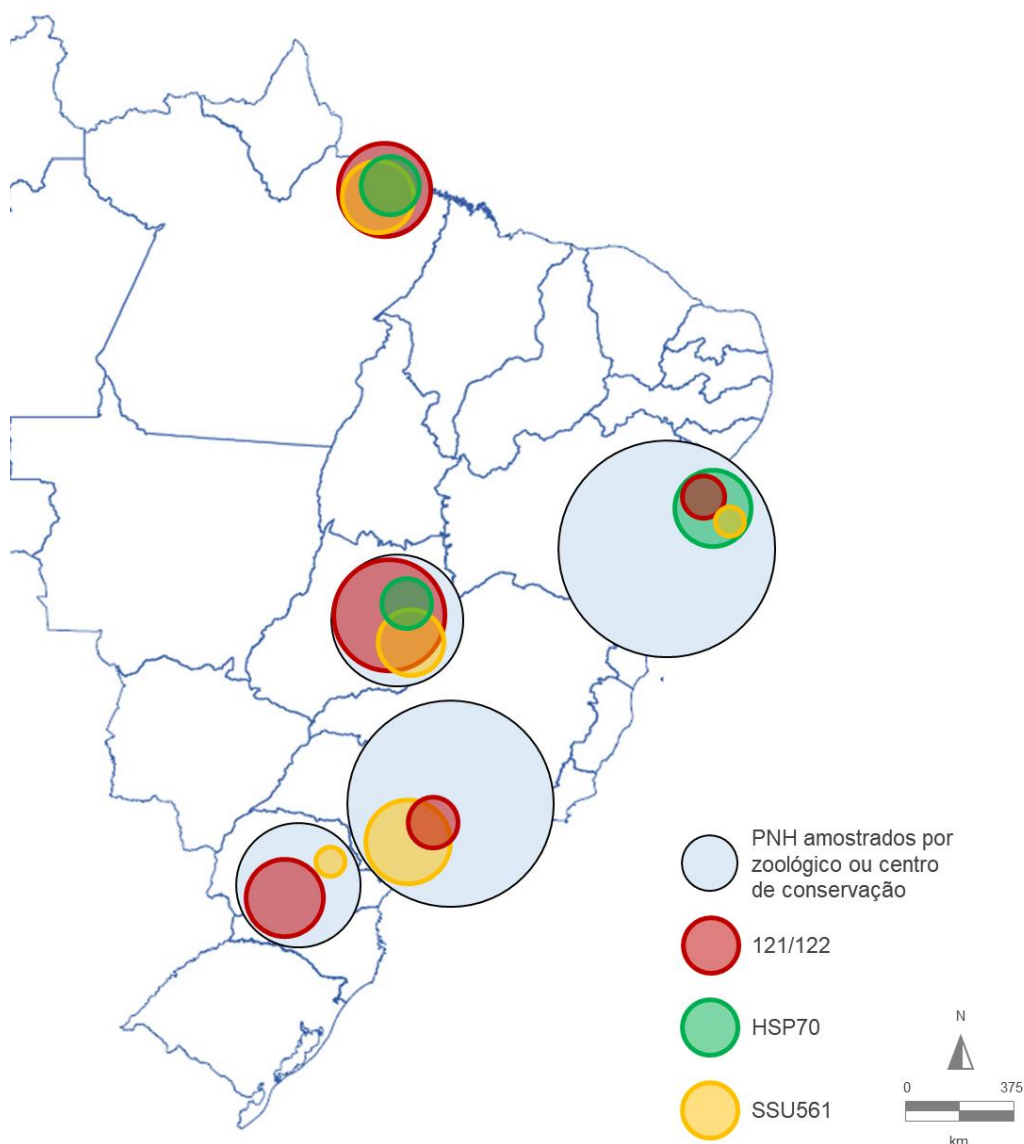


FIGURA 5: Mapa com a distribuição dos primatas não-humanos (PNH) do estudo. As áreas dos círculos representam a quantidade de PNH amostrados ou positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os círculos coloridos (exceto o azul-claro) representam as amostras de PNH que amplificaram para o conjunto de *primers* descritos no detalhe na imagem. A sobreposição dos círculos indica amplificação de um mesmo animal para mais de um conjunto de *primers*. Os PNH do CENP (região Norte), no Pará (os círculos mais acima da imagem) é o único caso em que todas as amostras dos animais amplificaram para os *primers* 121/122. Os detalhes estão disponíveis nas tabelas no APÊNDICE E.

Entre os zoológicos e centro de conservação, os PNH do CENP foram o que apresentaram maior quantidade de amplificações, com 10 PNH (100%) amplificando para algum dos conjuntos de *primers* (excetuando *primers* $\beta 1/\beta 2$). O Zoo Salvador apresentou menor quantidade de amplificações, com sete PNH (13,2%). Todos os dados de amplificação de cada PNH de cada zoológico e centro de conservação do estudo estão disponíveis nas TABELA 25 a TABELA 29 no APÊNDICE E.

4.4.4 PCR de swab conjuntival

Devido aos resultados pouco satisfatórios obtidos na quantificação a partir da extração de DNA dos *swabs* conjuntivais, foi realizado um pré-teste submetendo as amostras à PCR utilizando os *primers* $\beta 1/\beta 2$, sendo que as amostras foram não reagentes à técnica.

Foi realizado a extração de DNA seguindo um segundo protocolo *in house* de *salting out* com *overnight* para os *swabs*, como uma forma de testar esse método em comparação com o método tradicional a partir de kit de extração. Das 121 amostras de *swab* conjuntival, três amostras foram comprometidas durante o processo de extração, resultando em 118 amostras extraídas pelo método de *salting out*.

Das 118 amostras extraídas, 91 (77,1%) amplificaram com o uso de *primers* $\beta 1/\beta 2$. Assim como utilizado para as amostras extraídas de sangue total, o uso de *primers* que amplificam o gene da beta-globulina são importantes para garantir a viabilidade das amostras.

Das 590 reações realizadas para este trabalho², 140 amplificaram para ao menos um conjunto de *primers*. Destas, excluindo $\beta 1/\beta 2$, 49 amostras de *swab* conjuntival extraídas (41,5%) de 41 PNH (34,7%) amplificaram para ao menos um conjunto de *primers*.

Com o uso de *primers* 121/122 que amplificam os minicírculos de kDNA, 33 amostras (28,0%) apresentaram amplificação, enquanto oito amostras (6,8%) amplificaram para os *primers* SSU561. Sete amostras (5,9%) amplificaram com os *primers* HSP70 e duas amostras (0,8%) amplificaram para os *primers* TCZ1/TCZ2. Todos estes dados estão disponíveis na TABELA 30 no APÊNDICE F. A relação de todos os animais que tiveram as amostras de *swab* conjuntival extraídas amplificadas (exceto $\beta 1/\beta 2$) de todos os zoológicos, está disponível na TABELA 31 do mesmo

² Importante ressaltar que todas as reações de PCR para as amostras extraídas a partir de *swab* conjuntival foram realizadas duplamente (PCR da PCR), afim de reforçar o número de *amplicons*. Assim, foram feitas 1180 reações de PCR para estas amostras no total (desconsiderando as reações para controles positivos e negativos).

apêndice. A descrição detalhada de amostras amplificadas de todos os animais discriminadas por zoológico ou centro de conservação estão disponíveis nas TABELA 32 a TABELA 36 do mesmo apêndice.

4.4.5 PCR de sangue total e swab conjuntival

Ao total, 49 amostras de sangue total de PNH amplificaram para, ao menos, um dos *primers* utilizados no estudo (excetuando $\beta 1/\beta 2$), enquanto o mesmo ocorreu com 41 amostras de *swab* conjuntival. Assim, 71 amostras das duas origens amplificaram para algum *primer* alvo deste estudo (37,6% do total de PNH do estudo).

Das amostras que amplificaram, 15 (21,1%) foram para o mesmo PNH utilizando o mesmo *primer* de interesse, sendo o CENP o que houve maior concordância, tendo-se 10 amostras de sangue total e 10 amostras de *swab* conjuntival amplificado para o mesmo alvo gênico (100%). O Zoo Curitiba, apesar de 11 amostras de PNH terem amplificado tanto para sangue quanto para *swab* conjuntival, não havendo concordância em nenhum dos alvos estudados.

O Zoo Salvador e Zoo Curitiba foram dois locais onde as amostras de *swab* conjuntival retornaram mais animais positivos que as amostras de sangue, sendo 15 (32,6%) e 10 (22,2%), respectivamente, contra apenas 7 (13,2%) e 9 (18,8%) das amostras de sangue processadas, respectivamente. Nos demais locais as amostras de sangue superaram as de *swab* conjuntival em número de ampliações.

No APÊNDICE G é possível comparar todos os resultados obtidos à biologia molecular a partir de amostras extraídas com *swab* conjuntival e com as amostras extraídas de sangue total, em relação ao mesmo PNH e em relação aos *primers* utilizados. A TABELA 37 resume e reúne os resultados para todos os zoológicos e centro de conservação do estudo, com totais de animais únicos positivos, independente da origem da amostra, assim com a concordância entre as amostras (sangue total e *swab* conjuntival) para o mesmo PNH. As TABELA 37 a TABELA 42 discriminam as informações por zoológico e centro de conservação.

4.4.6 qPCR de sangue total

Foi realizado um teste dos controles quantificados de *T. cruzi* utilizados na qPCR, os quais apresentaram resultados satisfatórios, como pode ser visto na FIGURA 20 disponível no APÊNDICE H.

Todas as 149 amostras de sangue total recebidas dos quatro zoológicos e um centro de conservação foram submetidas à técnica de qPCR, utilizando *primers* que amplificam trecho do gene *hsp70*. Destas, foi possível quantificar a carga parasitária em 21 PNH (14,1%) positivos na PCR utilizando os mesmos *primers* (FIGURA 21 no APÊNDICE H), bem como de outras 28 amostras (49 amostras no total, ou 32,9%) que não haviam amplificado anteriormente na PCR (FIGURA 22 no APÊNDICE H).

A TABELA 5 abaixo apresenta o número de PNH que amplificaram na qPCR em cada zoológico e centro de conservação comparando com o total de amostras recebidas e o número de PNH positivos na PCR utilizando os mesmos *primers*. Os valores de quantificação dos 49 PNH podem ser visualizados na TABELA 43 no APÊNDICE H.

TABELA 5: resumo das informações de amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando *primers* que amplificam o gene *hsp70*, comparando com os achados utilizando os mesmos *primers* na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

	PNH	qPCR	PCR	Relação PNH x qPCR (em %)	Relação qPCR x PCR (em %)
CENP	10	10	6	100,0	166,6
Zoo Salvador	53	25	1	47,2	2500
Zoo Brasília	20	5	5	25,0	100
Zoo Sorocaba	48	8	8	16,7	100
Zoo Curitiba	18	1	1	5,6	100
Total	149	49	21	26,2	
Relação* (em %)		32,9	14,1		

Legenda: * = relação (em %) entre o total das técnicas de qPCR ou PCR com o total de amostras.

4.5 Sorologia

4.5.1 Amostras

Dos 189 PNH, foram recebidas ou processadas 166 amostras de soro, destinados para a realização de provas sorológicas. A TABELA 6 a seguir descreve o total de primatas e a quantidade de soro recebida de cada local do estudo.

TABELA 6: Relação entre a quantidade de primatas não-humanos (PNH) amostrados e o número de soro.

	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
Total de PNH	10	54	59	48	18	189
Soro de PNH	10	53	42	44	17	166
Relação (em %)	100	98,1	71,2	91,7	94,4	87,8

4.5.2 RIFI com conjugado anti-macaco

Todas as 166 amostras de soro foram submetidas a técnica de RIFI na busca de anticorpos anti-*T. cruzi*, utilizando conjugado anti-macaco. Todas as amostras foram não reagentes à técnica.

Discussão

5 Discussão

Os PNH são fonte inesgotável de aprendizagem, tanto por suas características comportamentais as quais podem espelhar e servir de parâmetro para entender alguns aspectos humanos (Schweinfurth e Call, 2019), como também no entendimento de como algumas doenças e infecções se comportam em organismos que são, em termos taxonômicos, mais aparentados conosco (Pozzi et al., 2014).

Já em seu primeiro trabalho que levou à descoberta do *T. cruzi*, Chagas mostrou como PNH de pequeno porte se infectavam e mantinham o parasito, o qual era visualizado na corrente sanguínea (Chagas, 1909).

Atualmente sabe-se que os PNH, assim como os demais mamíferos, são naturalmente infectados pelo *T. cruzi* (Jansen et al., 2018). Apesar de haver trabalhos sobre o assunto tanto em animais silvestres como os mantidos em cativeiro demonstrando a circulação do parasito, a melhor compreensão da circulação de *T. cruzi* em PNH em ambientes de cativeiro como os zoológicos e centros de conservação (Hodo et al., 2018) são, em sua maioria, inseridos em ambientes urbanos, nos permite obter um melhor panorama sobre o assunto e compreender a ocorrência da manutenção dos tripanosomas em ambientes peridomiciliares.

O Brasil recebeu, em 2006, um selo da Organização Pan-americana de Saúde de país livre da transmissão vetorial de doença de Chagas pelo *T. infestans*, considerado um dos principais transmissores da doença até então (Ferreira e Silva, 2006). Contudo, sabemos que existem pelo menos 65 espécies de triatomíneos catalogados no Brasil, sendo que 84,6% delas possuem capacidade de transmitir *T. cruzi* (Galvão, 2014), sem contar capturas eventuais de *T. infestans* realizados nos últimos anos em pontos no interior da Bahia (Ministério da Saúde, 2019a).

Nosso trabalho revela a presença de tripanosomas circulantes entre os primatas de cativeiro, o que demonstra a livre circulação de insetos vetores em ambientes próximos aos centros urbanos, como nos zoológicos deste estudo. Dados do Ministério da Saúde (2019) informam que, no período de 2012 a 2016, 16 espécies de triatomíneos de importância epidemiológica para a doença de Chagas foram encontrados no Brasil, entre espécies silvestres e adaptadas ao ambiente peri e intradomiciliar.

Nosso estudo encontrou a presença de DNA de *T. cruzi* em primatas de todas as regiões do país. Mesmo trabalhando com zoológicos e centro de conservação de locais tão distantes um dos outros, cada um representando uma região do Brasil, com condições climáticas e de vegetação distintas uma das outras, é possível afirmar que a circulação de *T. cruzi* está amplamente distribuída pelo país e, aparentemente, os triatomíneos ainda configuram um agente de disseminação importante no território nacional.

Nos últimos anos, observamos um aumento do número de casos e de pesquisas apontando para os problemas de saúde em humanos provocados pelo consumo de alimentos contaminados por *T. cruzi*, com destaque para os Estados da região Norte do país onde o consumo de polpa de açaí fabricada de maneira artesanal e não pasteurizada ainda é bem comum, geralmente provocando casos de doença de Chagas agudo em pequenos grupos familiares (Santos et al., 2018; Santana et al., 2019).

Durante as visitas técnicas realizadas nos quatro zoológicos do estudo, foi acompanhado a rotina de tratamento dos PNH, incluindo sua alimentação. Mesmo considerando as diferenças entre os zoológicos, todos possuíam uma dieta básica de frutos frescos e ração. Os zoológicos possuem protocolos de higienização dos alimentos antes de serem processados e distribuídos para o plantel da instituição, como o uso de solução de hipoclorito de sódio. Assim, os animais só eram servidos com frutos e produtos previamente higienizados e processados pela equipe da cozinha do zoológico. Somado a isso, os alimentos não eram deixados por muito tempo dentro do recinto e os restos de frutos não consumidos eram recolhidos e descartados pela equipe destes locais, mitigando assim a possibilidade de os animais adquirirem a doença de Chagas por via oral, uma das formas atuais de infecção relatados em humanos (Filigheddu et al., 2017).

O CENP, localizado em Ananindeua, Pará, foi o único local onde não foi possível realizar nenhum tipo de visita técnica ao longo de todo o período de estudo. Questões burocráticas fizeram com que, ao final, recebêssemos amostras de 10 PNH. Mesmo com baixo número de amostras vindo de um centro de pesquisa com primatas, todas elas retornaram positividade para *T. cruzi* na prova molecular, tanto em nossas buscas nas amostras extraídas de sangue, como nas de *swab* conjuntival. Com

certeza os resultados sobre a circulação de *T. cruzi* nos PNH na região Norte seria muito mais robusto se tivéssemos acesso a amostras de mais PNH do CENP.

Ainda assim os resultados encontrados podem ser espelhados para todos os demais primatas do plantel do CENP, estimado em mais de 500 animais, de acordo com planilha recebida na época do primeiro contato. Em um estudo com PNH mantidos em cativeiro na Amazônia, 14 dos 112 animais (12,5%) foram positivos para *T. cruzi* em testes moleculares, sendo o Pará o segundo estado com mais amostras positivas para esses animais (Bahia et al., 2017). Somado a isso, Ananindeua apresentou um crescente de casos de doença de Chagas em humanos nos últimos anos, sendo o Pará o estado com mais casos da doença entre os anos de 2012-2016, com 1.026 casos registrados (86,2% do total no país no mesmo período) (Ministério da Saúde, 2019).

O Zoo Salvador, localizado próximo à orla de Salvador, é uma região natural cercada pelo ambiente urbano. A ocupação urbana ao longo das décadas fez do zoológico um ponto natural isolado do restante da vegetação de Mata Atlântica da região. Apesar desse isolamento, isso não impediu de encontrar animais positivos para *T. cruzi*. Sete das 53 amostras de sangue extraídas de PNH (13,2%) foram positivas em alguma técnica molecular na PCR e outros 24 (45,2%) quantificaram altas cargas parasitárias na qPCR. Além disso, 15 amostras (32,6%) extraídas a partir de *swab* conjuntival também amplificaram para, ao menos, um dos *primers* utilizados no trabalho, apontando que insetos vetores estão mantendo a circulação do *T. cruzi* no ambiente, em regiões próximas às habitações humanas.

Apesar de PNH capturados em fragmentos de matas de Salvador terem sido positivos para *Leishmania* sp. e não para *T. cruzi* (Trüeb et al., 2018), nosso estudo é o primeiro a revelar primatas positivos para *T. cruzi* no Estado da Bahia, indicando que esses animais estão mantendo o parasito no ambiente urbano. Mais do que aumentar as chances de que outros animais do Zoo Salvador sejam suscetíveis a infecção por tripanosomas, existe o risco de que a população ao redor também se infecte, algo já discutido no passado (Dias-Lima e Sherlock, 2000), colocando em risco a Saúde Única.

Apesar das chances serem baixas, há estudos que discutem a possibilidade da degradação ambiental e as mudanças climáticas podem deslocar

insetos vetores de diversas doenças, incluindo os transmissores de doença de Chagas, para mais próximo das habitações humanas ou para regiões onde eles não existiam (Garrido et al., 2019), aumentando as chances de reemergência da doença de Chagas na América do Sul (Tapia-Garay et al., 2018).

Com insetos no ambiente urbano, a possibilidade de conseguirem sair das limitações do zoológico e adentrarem em casas e terrenos baldios de regiões ao entorno do local se mostra uma possibilidade real, já que eles são naturalmente atraídos por luz artificial das habitações humanas (Lazzari et al., 2013), mesmo que, paradoxalmente, serem conhecidos por sua aversão à luz. Além disso, as condições climáticas são um fator importante para sua dispersão, muito maior em noites quentes durante os períodos de primavera e verão que em períodos frios, podendo deslocar-se por distâncias superiores a 40 metros dos locais de nidificação (Vazquez-Prokopek et al., 2006). Somado a isso, é sabido que algumas espécies de triatomíneos durante a fase adulta podem fazer viagens mais longas, saindo de regiões de mata para se alimentar em regiões peridomiciliares e retornarem novamente para a mata (Dumonteil et al., 2002).

Santana e colaboradores (2011) apontaram para captura de quase 480 triatomíneos na capital baiana, sendo 44% deles dentro das residências. Do total, 48,6% amplificaram para *T. cruzi*. Entre 2012-2016, várias espécies de triatomíneos de importância epidemiológica foram encontradas no Estado da Bahia (Ministério da Saúde, 2019), sobretudo *P. megistus* e *T. brasiliensis*, que possuem alta relevância vetorial e estão adaptados aos ambientes intra e peridomiciliares (Almeida et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Ribeiro et al., 2019).

No sudeste, há registros de *P. megistus*, além de *R. neglectus* e *T. sordida* no Estado de São Paulo, sendo este último um dos mais encontrados também no país (Ribeiro et al., 2014). Ferreira (2019) encontrou *P. megistus* em matas circundantes e dentro de recintos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, com 90% deles positivos para tripanosomas. Primatas de cativeiro de centros de pesquisas nos EUA também já foram naturalmente infectados por *T. cruzi* por triatomíneos infectados que vivem próximos a esses espaços (Hodo et al., 2017).

Isto aponta para uma constante necessidade de monitoramento da presença desses vetores em ambientes naturais inseridos no ambiente urbano. Além

disso, animais silvestres e domésticos, inclusive animais abandonados, que vivem ao redor de espaços dentro da zona urbana também podem ser fonte de repasto sanguíneo para esses triatomíneos, podendo ser suscetíveis e infectados por tripanosomas. O nosso achado de positividade pela técnica molecular é um forte indício de que outros animais do zoológico estão mantendo o protozoário no ambiente e havendo assim uma grande circulação desses triatomíneos nesses locais, que podem até mesmo se alimentando de animais de fora do zoológico, levando os parasitos para além das fronteiras desses espaços.

O Zoo Sorocaba é um zoológico completamente inserido no ambiente urbano e apresentou animais cujas amostras biológicas amplificaram à PCR. Nove amostras de sangue extraídas dos 48 PNH (18,8%) e 10 amostras extraídas de *swab* conjuntival de 45 PNH (22,2%) foram positivos por alguma técnica molecular que detectou DNA de *T. cruzi* e/ou outro tripanosoma. Zetun et al. (2014) já haviam demonstrado para a circulação de *T. cruzi* em mamíferos no mesmo zoológico, indicando que a circulação nesses espaços já ocorria anteriormente, mas nosso estudo é o primeiro registro da presença de *T. cruzi* em PNH de cativeiro no município.

Dados da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) do Estado de São Paulo revelam que mais de 200 notificações de triatomíneos foram feitas em Sorocaba entre janeiro de 2014 a dezembro de 2015, representando mais de 11% das notificações feitas no estado naquele período. Infelizmente não foi conduzida pesquisa alguma para identificação de tripanosomas nestes insetos (SUCEN, 2016), mas é possível afirmar que triatomíneos infectados por tripanosomas circulam livremente pelo município, visto que outros estudos realizados no Estado de São Paulo já encontraram esses resultados (Carvalho et al., 2014; Ribeiro et al., 2016).

Reforçamos os nossos achados nestes animais já que, de acordo com as informações fornecidas pela equipe do Zoo Sorocaba, seis PNH nasceram no local, sugerindo que estes animais se infectaram no zoológico.

Os PNH positivos de nosso estudo são de grande porte, e vivem em recintos amplos ou na Ilha dos Primatas. As amostras de sangue dos demais primatas de pequeno porte não amplificaram em nenhuma técnica molecular, indicando que os vetores não conseguiram se alojar nos espaços onde esses animais vivem ou que os vetores existentes nestes espaços não estejam infectados por tripanosomas. Pode-se

sugerir que apenas em espaços mais abertos, próximos das árvores e vegetação rasteira, ao redor dos recintos e dentro da própria Ilha dos Primatas ocorram triatomíneos e que estes estejam infectados.

Trabalho de Lehane et al. (1992) discutiam a possibilidade de que triatomíneos tendem a voar para outros locais de nidificação quando há uma queda na oferta nutricional. Este fato pode ser um indicativo de que os triatomíneos que infectaram os PNH fora do micário conseguiram os nutrientes necessários com estes e/ou outros animais facilmente acessíveis, dispensando a necessidade de procurar outros pontos de nidificação.

O mesmo pode ser dito para o Zoo Salvador, que não possui um micário isolado da vegetação como ocorre com o Zoo Sorocaba. O Zoo Salvador possui uma Ilha dos Primatas e um longo corredor onde os primatas ficam alocados, imediatamente à frente de vegetação natural. Vários recintos desses primatas possuem “túneis” feitos a partir de projeções da própria rede do recinto, que passam por dentro ou por imediações da vegetação nativa, permitindo que os PNH desses recintos fiquem mais expostos.

O Zoo Curitiba, assim como o Zoo Brasília, está localizado em pontos menos habitados, quando comparados aos demais zoológicos do estudo, mas ainda dentro do ambiente urbano.

O Estado do Paraná já tem um histórico de doença de Chagas crônico entre sua população. Contudo, a cidade de Curitiba não apresenta casos da doença. Um trabalho sobre sangue doado descartado em um hemocentro de Curitiba encontrou uma baixa flutuação de doença de Chagas entre as amostras. Como a origem do doador é desconhecida não é possível afirmar que o doador sempre tenha residido na capital do Paraná (Monich et al., 2017). Os autores apontam para a possibilidade do crescimento urbano desordenado, que pode ter relação com os casos positivos no sangue doado, o que reforça as chances da presença de triatomíneos em ambientes de transição urbana e silvestre, onde o Zoo Curitiba está inserido.

Dados do Ministério da Saúde (2019) não indicam casos de transmissão vetorial em humanos no Paraná, devido aos programas de combate ao vetor conduzidos décadas atrás no país, mas é possível dizer que existe transmissão vetorial em PNH do Zoo Curitiba, como constatamos a partir da descoberta de DNA

de *T. cruzi* em oito dos 18 PNH estudados neste local que foram positivos na PCR a partir de amostras de sangue extraídas (44,4%) e um (5,6%) quantificado na qPCR (totalizando nove PNH distintos), demonstrando haver uma manutenção do parasito no ambiente. Estes achados são o primeiro relato na literatura sobre a circulação de *T. cruzi* em PNH na região Sul do Brasil.

Curitiba possui as médias de temperatura mais baixas dentre os demais locais do estudo, sendo uma das capitais mais frias do país, com médias compensadas anuais abaixo dos 20 °C. Triatomíneos tendem a não voar e ficar próximos das zonas de nidificação em temperaturas abaixo de 20 °C (Lehane et al., 1992), o que aponta para uma alta possibilidade de que os ninhos de nidificação desses insetos estejam próximos dos recintos dos PNH do Zoo Curitiba, sobretudo de *P. megistus*, os quais já foram encontrados anteriormente na capital. A capital paranaense, apesar do clima pouco favorável aos triatomíneos, possui características paisagísticas propícias para a manutenção dos insetos no ambiente (Ferro e Silva et al., 2018).

Somado a isso, o Zoo Curitiba está localizado em uma região de mata natural, com a presença de animais silvestres que circulam dentro e fora do espaço do zoológico, já que muitos são atraídos pelos alimentos disponibilizados aos animais do próprio zoológico. Assim, é possível que os tripanosomas possam estar circulando livremente tanto dentro como fora do zoológico, o que indica a necessidade de uma busca ativa de triatomíneos no recinto do zoológico e na mata ao entorno.

Já as condições climáticas e a vegetação podem explicar os achados no Zoo Brasília, no qual 15 dos 20 PNH (75%) foram positivos para alguma das técnicas moleculares (excetuando os resultados com $\beta 1/\beta 2$), indicando uma forte circulação de *T. cruzi* no zoológico. O Cerrado, bioma o qual Brasília está inserido, é um dos habitats de diversos triatomíneos, como *R. neglectus* (Gurgel-Gonçalves et al., 2004). PNH foram positivos em um trabalho de Minuzzi-Souza e colaboradores (2016) realizado nesse zoológico, além de terem relatado a presença de *P. megistus* em um dos recintos dos primatas na época do estudo.

Em um trabalho recente realizado no Zoo Brasília, foi encontrado colônias de triatomíneos no recinto dos ouriços-cacheiros (*Coendou prehensilis*), sendo quatro (de 16 encontrados no estudo, 25%) positivos para *T. cruzi* na biologia molecular (Reis

et al., 2019). Além disso, 67,6% dos animais estudados por eles amplificaram para *T. cruzi*, em um valor próximo de nossos resultados, corroborando nossos achados de alta prevalência de tripanosomas circulantes neste ambiente.

Apesar de trabalhos sobre as preferências de alimentação dos triatomíneos serem escassos, alguns trabalhos indicam que cães e humanos são fonte preferencial de repasto por esses insetos (Jirón e Zeledón, 1982; Hernández et al., 2016; Silva et al., 2017) e que os triatomíneos tendem a encontrar suas fontes de alimentação através de diferenças térmicas entre o ambiente e o vertebrado (Fresquet e Lazzari, 2011). Os PNH, apesar de sua temperatura corporal variar enormemente de acordo com as condições do ambiente, a sua temperatura média tende a ser levemente acima da humana (Thompson et al., 2014). Assim, os triatomíneos também podem ter os PNH como preferência para o repasto sanguíneo. Ainda que não se tenham realizado buscas de vetores nos recintos dos PNH avaliados, há um forte indicativo de que os mesmos estarem por toda a extensão do zoológico a se alimentar, o que resultou na infecção dos PNH avaliados em nosso estudo.

O uso de *primers* que identificam trechos conservados entre mamíferos, como o gene codificador da beta-globulina (Edvinsoon, 2006), foram utilizados para verificar a qualidade da amostra de DNA extraída. Este passo foi de suma importância para o estudo, já que as amostras de sangue total dos PNH vieram de zoológicos e centro de conservação distantes do laboratório onde as mesmas foram analisadas e sabe-se que a demora no transporte pode comprometer a qualidade final do material coletado e prejudicar os resultados subsequentes (Fitzwater et al., 2008). Assim, certificar-se de que o DNA extraído estava em condições para as demais análises moleculares mostrou-se uma forma de validar os resultados negativos do estudo, já que todas elas amplificaram com o uso dos *primers* $\beta 1/\beta 2$, eliminando a possibilidade de amostras negativas devido a problemas na extração.

O uso dos *primers* que amplificam DNA nuclear, TCZ1/TCZ2, se mostraram pouco viáveis com as amostras de PNH de nosso estudo, visto que nenhuma amostra de sangue de primata amplificou utilizando este jogo de *primers*.

No caso dos *primers* 121/122, que amplifica trechos de minicírculo de kDNA, 36 amostras de sangue dos 149 PNH (24,2%) amplificaram, apontando para a presença de DNA de *T. cruzi* no sangue.

Apesar de trabalhos revelarem o bom desempenho do TCZ1/TCZ2 na detecção de DNA de *T. cruzi* em uma variedade de amostras e até mesmo uma melhor sensibilidade dele em relação ao 121/122 (del Puerto et al., 2010), os resultados obtidos com nossos PNH demonstraram justamente o oposto.

Moser et al. (1989b) em seu trabalho sobre os *primers* TCZ1/TCZ2, já haviam relatado o bom uso desses iniciadores, visto que eles amplificam um dos principais trechos de DNA do parasito. Contudo, Degraeve et al. (1988) demonstraram que o uso de *primers* que amplificam minicírculos de kDNA podem ser mais vantajosos na pesquisa de tripanosomas, em especial *T. cruzi*, já que existem minirepetições de vários trechos dentro do minicírculo de kDNA, que existem em maior número dentro do parasito. Assim, durante a técnica de PCR, existe maior sucesso em amplificar trechos de minicírculos de kDNA do que de DNA nuclear, principalmente em amostras com baixa carga parasitária, como foi o caso dos PNH amostrados, já que apenas 1% das lâminas amostradas continham formas sugestivas de *Trypanosoma*.

Das 36 amostras de sangue de PNH que amplificaram com *primers* 121/122, 19 (52,8%) amplificaram apenas para esse conjunto de iniciadores, o que denota uma maior sensibilidade deste conjunto de *primers* quando comparado com os demais utilizados no estudo. No uso de *primers* hsp70, apenas oito das 21 amostras de sangue de PNH amplificaram (38,1%) e três de 14 PNH amplificaram apenas com o uso de *primers* SSU561 (21,4%).

Ao comparar o número de amostras sanguíneas de PNH que amplificaram para 121/122 e mais um conjunto de *primers*, o uso de hsp70 se mostrou ligeiramente superior ao uso de SSU561, já que das 57 amostras de sangue de primatas que amplificaram tanto para 121/122 e hsp70, 12 (21,1%) foram para o mesmo PNH, ao passo que, das 50 amostras que amplificaram para 121/122 e SSU561, apenas nove (18,0%) positivaram para a mesma amostra. Quando comparado com o uso dos três conjuntos de *primers*, apenas quatro das 71 amostras de sangue de PNH amplificadas foram para a mesma amostra (5,6%).

Chama a atenção esta metodologia um conjunto de *primers* específicos e um conjunto de *primers* amplos são suficientes para identificar os animais positivos para *T. cruzi*, como ocorreu em nosso estudo com a utilização de 121/122 e hsp70, que demonstraram serem ligeiramente superiores quando comparado com o uso de

121/122 e SSU561. Futuras pesquisas que busquem DNA de *T. cruzi* em amostras de primatas de cativeiro poderão restringir o uso de alvos gênicos, otimizando assim gastos e atividades de laboratório na análise de amostras.

Isso se reforça quando considerado o uso individual dos demais iniciadores. O uso dos *primers* que amplificam regiões conservadas em tripanosomatídeos, como o gene codificador da proteína hsp70 e da região V7/V8 do gene 16S SSU rRNA, utilizados nesse estudo, amplificaram 35 das 149 amostras de sangue de PNH (23,5%), sendo 21 e 14 PNH, respectivamente. Destes, oito das 21 amplificaram apenas para gene hsp70 (38,1%) e apenas três das 14 amplificaram apenas para gene SSU rRNA (21,4%), reforçando a confiabilidade do uso de hsp70 em comparação com o SSU561.

A realização da técnica de PCR em tempo real também foi útil na quantificação da carga parasitária dos PNH, sobretudo aqueles que foram positivos pela PCR convencional (21 PNH), tendo sido detectado amostras com uma variável grau de quantidade de parasitos/mL, sendo 27,72 parasitos/mL a concentração mais baixa e 337,74 parasitos/mL a mais alta. Mas a técnica também apontou outras 28 amostras com concentrações variáveis de parasitos, indicando a sua importância.

A qPCR é uma técnica de biologia molecular que consegue quantificar a carga de DNA na amostra e ser mais sensível que a técnica convencional de PCR, que é apenas qualitativa (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015), o que explica o maior número de achados por essa técnica, sobretudo no Zoo Salvador, onde apenas uma amostra de sangue de um animal havia amplificado na PCR, mas 25 amplificaram na qPCR, uma diferença de 2500%. . A baixa carga parasitária no sangue pode ser um fator de uma menor detecção de amostras positivas na PCR, a qual o uso da qPCR se mostra mais vantajosa (Mohammadiha et al., 2013).

Das 140 lâminas de esfregaço sanguíneo por extensão dos 189 PNH do estudo, em apenas duas lâminas pode-se visualizar formas sugestivas de tripanosomas. Mesmo levando em consideração a capacidade de trabalho e de acurácia variar de microscopista para microscopista, a baixa incidência de lâminas positivas para tripanosomas em nosso estudo pode demonstrar a baixa parasitemia dos PNH no momento da coleta e à baixa sensibilidade do teste.

Sabe-se que mesmo os animais positivos possuem oscilações na carga parasitária no sangue, condizente com o ciclo circadiano e com a maior atividade do vetor (Deane et al., 1973). Apesar de *T. cruzi* aparentemente não seguir nenhum ciclo circadiano (Castro e Prata, 2000), os animais do estudo poderiam estar entrando ou saindo da fase aguda da doença, o que explicaria uma baixa carga parasitária.

Foi realizada a técnica sorológica de RIFI utilizando conjugado anti-macaco, com todos os animais não reagentes, ainda que se tenha realizado trabalhos de padronização e de ajustes da técnica. Com os achados moleculares apontando para a presença de DNA de *T. cruzi* nas amostras de sangue extraídas, é pouco provável que nenhum dos PNH do estudo não tenha sido exposto ao parasito antes das coletas para nosso estudo e que nenhum PNH tivesse soroconvertido.

A literatura aponta para a presença de reação cruzada comum em testes sorológicos como a RIFI e ELISA para doença de Chagas, leishmaniose e toxoplasmose (Troncarelli et al., 2009; Viol et al., 2012; Zanette et al., 2014) e mesmo com essa possibilidade, nenhum PNH foi reagente à técnica. Problemas com a qualidade do soro recebido dos zoológicos e centro de conservação do estudo é a opção a menos provável, já que estudos apontam para uma boa estabilização do soro em temperatura ambiente que ainda o torna viável para análises sorológicas (Castejon et al., 2014). Entretanto, o ideal seria realizar-se uma sorologia pareada das amostras, com novas coletas em um período posterior, para que se pudesse estabelecer um comparativo e para que, possivelmente, pudesse haver uma soroconversão. Como não foi possível obtermos novas amostras, não há como ser inferir tais possibilidades.

As amostras dos primatas a partir de *swab* conjuntival foram extraídas, primeiramente, utilizando o mesmo kit comercial para as amostras de sangue total. Contudo, estas não retornaram bons resultados na quantificação de DNA e nem em testes na PCR utilizando os *primers* $\beta 1/\beta 2$. Acreditamos que a extração a partir de kit comercial para sangue total não deve ser utilizado ou necessite ser adaptado para extração a partir de *swabs*, e desaconselhamos a adoção deste método de extração para estas amostras no presente momento.

Fizemos, portanto, uso do método de extração de DNA por *salting out*, adaptando um protocolo *in house* com *overnight* (Benassi et al., 2017) que se mostrou eficaz na obtenção de DNA a partir dos *swabs* conjuntivais. Apesar da concentração

de DNA ter sido baixa na maioria das amostras, com mediana variando de 5,6 a 12,2 µg/mL, elas foram maiores quando comparados com o uso de kit comercial, com mediana de -1,6 a 6,8 µg/mL.

Resolvemos o problema da baixa concentração de DNA realizando duas rodadas de PCR para a mesma amostra, afim de aumentar a quantidade de *amplicons* para serem visualizados na eletroforese. O método mostrou bons resultados, já que 91 das 118 amostras de *swab* conjuntival amplificaram para o gene constitutivo $\beta 1/\beta 2$ (77,1%). Já nas buscas com de alvos gênicos de interesse, 41 PNH (33,8%) amplificaram para, ao menos, um dos *primers* utilizados.

É sabido que tripanosomas podem utilizar as mucosas conjuntivais como via de infecção em mamíferos (Giddings et al., 2006) e que estudos conduzidos em humanos e cães já encontraram tripanosomatídeos por este método de coleta conjuntival (Serenio et al., 2020) e em mucosas orais em humanos e morcegos (Cortes-Serra et al., 2018; Lourenço et al., 2018). Contudo, trabalhos com amostras de *swab* conjuntival de PNH não foram conduzidos até o presente momento, sendo nosso trabalho o primeiro a relatar o uso de um método não-invasivo na detecção molecular de tripanosomas na conjuntiva destes animais.

Nossos resultados indicam que o método pode substituir a coleta convencional de sangue em animais silvestres, principalmente dos PNH de áreas endêmicas para tripanosomas, como o Norte e Nordeste do Brasil, já que seus resultados foram iguais ou superiores aos achados em amostras de sangue dos mesmos animais. Somado a isso, é uma boa ferramenta para complementar as informações obtidas apenas pelas amostras de sangue total, pois houve divergência de positividade de amostras de sangue e *swab* conjuntival sobretudo da região Sudeste e Sul, aumentando o número total de animais positivos pela biologia molecular.

A diferença dos resultados se deve, provavelmente, à carga parasitária no animal que, quanto maior, maior a facilidade de migrarem para outros tecidos, como já observado em cães positivos para *Leishmania*, onde acredita-se que o parasito possui tropismo para alguns tecidos, como o ocular, alcançando-os via disseminação hematogênica ou, até mesmo, pelo mosquito transmissor ter picado próximo à região ocular (Reithinger et al., 2002; de Almeida Ferreira et al., 2012). O mesmo pode

ocorrer com *T. cruzi*, contudo, poucos trabalhos com este direcionamento foram feitos até o momento e a questão permanece em aberto (Giddings et al., 2006).

Chamou a atenção o fato de que, dos 41 PNH positivos à biologia molecular a partir das amostras de *swab* extraídas, apenas 15 (36,6%) corroboraram com os resultados das amostras de sangue submetidas aos mesmos testes moleculares. Alguns trabalhos têm apontado para o bom uso do *swab* para a detecção de parasitos na conjuntiva de cães com leishmaniose (de Almeida Ferreira et al., 2012) e como podem complementar os resultados obtidos a partir de técnicas mais difundidas, como a PCR e sorologia (Hernández et al., 2015). Nossos resultados apontam para uma possível baixa carga parasitária, tanto obtidos a partir da extração do sangue total como no *swab* conjuntival, mas que a realização de duas rodadas de PCR nas amostras conjuntivais permitiu uma melhor recuperação dos *amplicons* de DNA de tripanosomas presentes nestas amostras.

Acreditamos que concentrar a amostra extraída de DNA com concentradores possa eliminar a etapa de realização de duas rodadas de PCR o que implica em uma redução de custos finais. Infelizmente, devido à emergência da pandemia da covid-19 que ocorreu durante as etapas de biologia molecular, muitas atividades programadas em nosso laboratório tiveram que ser suspensas ou adiadas, o que restringiu uma melhor investigação com as amostras extraídas de *swab* conjuntival. Mais informações estão disponíveis em LIMITAÇÕES DO ESTUDO, mais abaixo. Apesar disso, mostramos a viabilidade de realizar a PCR da PCR para as amostras *swab* de PNH de cativeiro na busca molecular de tripanosomas, pois nem todos os laboratórios possuem um concentrador de amostras biológicas, o que seria um impedimento para a realização da pesquisa.

Além disso, verificamos que há a possibilidade de uso de um método não invasivo para a coleta de amostras biológicas, como a utilização de *swabs* conjuntivais, principalmente em se tratando de animais silvestres, como em PNH, visando portanto o bem estar animal e com menos estresse, possibilitando a sua soltura logo após a coleta (Maia et al. 2020).

O método de extração *in-house* se mostrou viável para ser facilmente conduzido, já que muitos reagentes utilizados são facilmente encontrados em laboratórios já adaptados à técnica de biologia molecular e, também, possuem baixos

custos, exigindo centrífuga, freezer e banho-seco para a realização de praticamente todas as etapas, facilitando a implementação em laboratórios dentro dos próprios centros veterinários existentes em alguns zoológicos e demais espaços que possuam PNH.

O estudo demonstrou que os animais de cativeiro, mesmo com os constantes cuidados dos médicos veterinários e todos os funcionários colaboradores dos zoológicos e centro de conservação de animais, estão suscetíveis a diversas parasitoses, incluindo doença de Chagas (Dorn et al., 2012; Hodo et al., 2018; Sathler-Avelar et al., 2017). Apesar de relatos na literatura descreverem problemas de saúde associados à doença de Chagas crônica e aguda em primatas (Sathler-Avelar et al., 2017), inclusive trazendo consequências negativas para o uso desses animais para pesquisas biomédicas (Hodo et al., 2018), os responsáveis pelos zoológicos e centro de conservação estudados não indicaram problemas de saúde entre os animais estudados compatíveis com os sintomas de doença de Chagas.

Contudo, como os demais animais em cativeiro, os PNH são constantemente transferidos para outros espaços dentro do próprio zoológico ou centro de conservação e até mesmo passando por transferências e empréstimos para outros espaços distantes de seu local original. Com isso, estes animais podem transportar *T. cruzi* e outros parasitos relevantes em locais onde não existiam previamente. Além disso, animais infectados se transferidos podem levar consigo parasitos que poderão ser transmitidos para os animais do novo estabelecimento. Nos casos de PNH nativos do Brasil oriundos de apreensões de tráfico de animais ou que foram recuperados pós-atropelamentos em estradas antes de serem reintroduzidos no meio natural, a Instrução Normativa (IN) nº23 do ICMBio/IBAMA de 31 de dezembro de 2014 instrui a quarentena para animais com testes laboratoriais para a detecção de doenças incluindo, no caso de primatas, testes para doença de Chagas e outras parasitoses, como malária e leishmaniose. Porém, a IN, em seu anexo V, apenas sugere estes exames e não obriga os centros de triagens de animais e nem zoológicos a realizar estes procedimentos (Instrução Normativa IBAMA nº 23/2014). Nossos dados apontam para a necessidade de conduzir análises da presença de *T. cruzi* e outros parasitos relevantes para controle e segurança, sobretudo em PNH recuperados e mantidos em cativeiro.

Assim, o monitoramento da presença de *T. cruzi* entre os PNH de cativeiro nas cinco regiões do Brasil realizada em nosso estudo permitiu traçar um perfil da circulação do parasito no ambiente, destacando a possível utilização dos PNH como sentinelas, para indicar a possível presença de triatomíneos e outros vetores de interesse epidemiológico no local, sobretudo em locais inseridos no meio urbano, o que pode causar impactos diretos a saúde única.

Finalizamos destacando a importância de compartilhar estes dados com os zoológicos e centro de conservação, para que nossos resultados se destinem além do formalismo científico (Romaní et al., 2018). Geramos relatórios condensados das atividades conduzidas com os PNH e recomendações que encaminhamos a todos os locais que colaboraram com este estudo, com o intuito de orientar os médicos veterinários e equipe que manejam estes animais, além dos responsáveis pelas secretarias de meio ambiente e centro de controle de vetores e zoonoses destes municípios. Estes relatórios podem ser vistos no APÊNDICE I, ao fim desta tese.

5.1 Limitações do estudo

Apesar da comodidade em trabalhar com animais de cativeiro, quando comparado com busca ativa dos mesmos animais em ambiente silvestre, o uso de animais mantidos em zoológicos e centro de conservação possuem sérias restrições quanto ao manejo, tanto por restrições éticas como da própria rotina dos locais onde esses animais estão alocados.

Desta forma, mesmo com um longo período disponível para coleta, não foi possível acompanhar os animais com coletas subsequentes para verificar a taxa de infecção na população estudada. Como a coleta dependia diretamente dos médicos veterinários de cada local e da disponibilidade dos zoológicos e centro de conservação, visando causar o menor impacto nas atividades destes espaços, a coleta em vários momentos do estudo se mostrou inviável.

Somado a isso, ficamos responsáveis pelo envio de material necessário para a coleta e o comprometimento de pagamento do envio das amostras até o laboratório. Devido às restrições orçamentárias atuais, isso se mostrou um empecilho para o recebimento de mais amostras de um mesmo animal.

O intuito do estudo foi utilizar-se de métodos pouco invasivos, que fossem fáceis de serem obtidos e, ao mesmo tempo, causassem o menor estresse possível aos PNH. Análises moleculares oriundas de punção medular e de biópsia de baço e linfonodo tendem a trazer melhores resultados que análises de sangue, assim como o uso de técnicas de histoquímica podem complementar os dados obtidos nas técnicas moleculares e sorológicas. Porém, o uso de técnicas invasivas não é o recomendado, pois implicaria em um monitoramento contínuo desses animais pelos médicos veterinário responsáveis por ele, tendo-se, muitas vezes, além da restrição de espaço físico para o acompanhamento adequado, dificuldades em relação ao acompanhamento simultâneo de outros animais que estão sendo monitorados devido a outras complicações de saúde.

O uso de técnicas invasivas enfrentaria maior dificuldade de receber aval tanto da CEUA da universidade como dos zoológicos e centro de conservação, já que esses animais são protegidos por leis de proteção nacional e internacional, além dos motivos já citados.

Os PNH são seres altamente sociáveis e há estudos demonstrando que possuem alto grau de empatia e reciprocidade (Schweinfurth e Call, 2019). Assim, realizar coletas menos invasivas permite que voltem mais rapidamente para o grupo social já estabelecido nos recintos e espaços onde vivem, diminuindo as chances de possíveis complicações pós-manejo.

Portanto, optamos pelo uso de *swab* conjuntival como uma forma alternativa não-invasiva para obtenção de amostras e, com a viabilidade do uso desta técnica com estes animais, pôde-se colaborar com a comunidade científica compartilhando nossos dados. Porém alguns resultados, sobretudo os obtidos com a PCR de *swab*, não puderam ser analisados e revisados mais profundamente devido à emergência da pandemia da covid-19, declarada em março de 2020 pela OMS (WHO, 2020). No Brasil, em especial no Estado de São Paulo, medidas de restrição de circulação e funcionamento de atividades foram decretadas em março, se mantendo por meses (São Paulo (Estado), 2020a; São Paulo (Estado), 2020b). Assim, as atividades conduzidas tanto na Unesp como nos laboratórios ficaram restritas, reduzindo o tempo para um melhor refinamento da técnica que fosse possível de ser conduzida dentro do prazo estipulado pelo Programa de Pós-Graduação.

Ainda, pretendíamos realizar pesquisa sorológica replicando os trabalhos de Ferreira (2019) que conduziu pesquisa sorológica adaptando o kit de RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* humano nos primatas de seu estudo. Novamente, devido à pandemia, a obtenção do kit e de controles sorológicos positivos enfrentou problemas, o que se tornou inviável de ser conduzido em tempo hábil para a conclusão desta tese. Acreditamos que a técnica, se aplicada em nossas amostras, poderiam retornar animais reagentes, tal como ocorreu com Ferreira, que as utilizou em amostras de primatas do Zoológico de São Paulo. Contudo, as amostras de soro estão armazenadas em freezer para uso posterior em nosso laboratório, podendo-se realizar tais testes posteriormente.

Também encontramos dificuldades em realizar uma melhor análise estatística em nossos dados, devido à pandemia covid-19. Com as restrições de circulação e a interrupção no atendimento de atividades conduzidas na Unesp, não tivemos oportunidade e tempo hábil para que os dados fossem encaminhados ao serviço de estatística da universidade. Pretendemos refinar nossos dados com base estatística para futuros manuscritos visando a publicação em periódicos científicos, mas que, infelizmente, não foram possíveis de serem inseridos nesta tese.

O estudo enfrentou problemas no recebimento das amostras, sobretudo as amostras transportadas por via terrestre. Algumas amostras ficaram presas nas estradas durante a greve nacional dos caminhoneiros ocorrida em maio de 2018 (BBC, 2018). Apesar das nossas análises apontarem a integridade do DNA extraído, com o uso de *primers* que amplificam o gene beta-globulina, não foi possível garantir a integridade das amostras de soro e sangue total, e a posterior confecção de lâminas de esfregaço sanguíneo, já que o acondicionamento incorreto pode levar à lise celular.

Tornou-se inviável realizar procedimentos de busca ativa de triatomíneos, seja dentro dos locais do estudo bem como das áreas ao entorno, visto que o procedimento demanda tempo e colaboração das equipes dos zoológicos e centro de conservação, assim como o acompanhamento da coleta devido a realização das demais técnicas em laboratório.

Conclusão

6 Conclusão

- Nosso trabalho apresenta os primeiros relatos de infecção natural de primatas não-humanos (PNH) de cativeiro na cidade de Sorocaba, no Estado da Bahia e na Região Sul do país; os PNH dos zoológicos e centro de conservação estudados estão naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi* e por outros tripanosomas, indicando que existe uma circulação ativa do parasito em ambiente peridomiciliar nas regiões avaliadas;
- Este é o primeiro trabalho em que a utilização de amostras conjuntivais extraídas a partir de *swab* para detecção de tripanosomas em PNH obteve resultados positivos por provas moleculares, como uma indicação de coleta de material biológico não invasiva para animais silvestres;
- O uso de *primers* que amplificam genes conservados, como $\beta 1/\beta 2$, se mostrou importante na verificação da qualidade das amostras que não podem ser processadas no momento da coleta e que são submetidas à longos períodos de transporte;
- A utilização de *primers* 121/122, que amplificam trechos de minicírculos de kDNA de *T. cruzi*, mostrou-se superior ao uso de *primers* TCZ1/TCZ2, que amplificam trechos de DNA nuclear do parasito em nossas amostras extraídas a partir de sangue total e *swab* conjuntival de PNH;
- Para *primers* que amplificam trechos conservados em tripanosomatídeos, a utilização de *primers* hsp70 se mostrou mais viável para amostras extraídas de sangue total e *swab* conjuntival de PNH que o uso dos *primers* SSU561;
- O uso de exames parasitológicos de esfregaço por extensão a partir de amostras de sangue de PNH revelou uma baixa detecção de parasitos, o que reforça a necessidade de se utilizar outras técnicas diagnósticas para tripanosomas em PNH;
- A realização de sorologia por RIFI utilizando conjugado anti-macaco na busca de anticorpos anti-*T. cruzi* mostrou ser não eficiente para as amostras de soro de PNH dos zoológicos e centro de conservação estudados;
- Os PNH de zoológicos e centro de conservação inseridos em áreas urbanas podem atuar como sentinelas para a circulação de *T. cruzi* nestes ambientes, sugerindo que insetos vetores triatomíneos possam utilizar estes animais como fonte de repasto sanguíneo;

- Nosso trabalho demonstrou a importância do monitoramento da infecção por *Trypanosoma cruzi* em PNH dos zoológicos e centros de conservação estudados, procedentes de cada uma das regiões do Brasil para a mitigação dos riscos à Saúde Única. Recomendamos que as equipes de zoológicos e centro de conservação de primatas, juntamente com equipes locais de vigilância epidemiológica, desenvolvam monitoramento e busca ativa de triatomíneos, sobretudo nas Ilhas dos Primatas e na vegetação dentro e ao redor dos recintos dos animais.

Referências

Referências

- ³Almeida EA, Navarro MR, Guariento ME, Carvalho SS. Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi*. Avaliação clínica, eletrocardiográfica e anatomopatológica. Rev Soc Bras Med Trop. 1992;25(1):7-12.
- Almeida CE, Faucher L, Lavina M, Costa J, Harry M. Molecular Individual-Based Approach on *Triatoma brasiliensis*: Inferences on Triatomine Foci, *Trypanosoma cruzi* Natural Infection Prevalence, Parasite Diversity and Feeding Sources. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004447. Published 2016 Feb 18. doi:10.1371/journal.pntd.0004447
- Angheben A, Boix L, Buonfrate D, et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. Blood Transfus. 2015;13(4):540–550. doi:10.2450/2015.0040-15
- Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease-a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:9–16. doi:10.1590/s0074-02762009000900004
- Argibay HD, Orozco MM, Cardinal MV, et al. First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. Parasitology. 2016;143(11):1358–1368. doi:10.1017/S0031182016000925
- Arnason G. The ethical justification for the use of non-human primates in research: the Weatherall report revisited. J Med Ethics. 2018;44(5):328–331. doi:10.1136/medethics-2016-103827
- Aysanoa E, Mayor P, Mendoza AP, et al. Molecular Epidemiology of Trypanosomatids and *Trypanosoma cruzi* in Primates from Peru. Ecohealth. 2017;14(4):732–742. doi:10.1007/s10393-017-1271-8
- Bahia M, de Nazaré Leite Barros F, Magalhães-Matos PC, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in captive Neotropical primates in the Brazilian Amazon. Am J Primatol. 2017;79(2):1–6. doi:10.1002/ajp.22590

³ Baseado no estilo Vancouver/AMA.

Barbosa RL, Dias VL, Lorosa ES, et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in in natura açai pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. *Exp Parasitol*. 2019;197:68-75. doi:10.1016/j.exppara.2018.10.012

Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, et al. Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. *J Food Prot*. 2012;75(3):601–606. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-233

Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da triponossomose americana e suas consequências. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1967;1(4):167-174.

Barrozo RB, Lazzari CR. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem Senses*. 2004;29(4):319–329. doi:10.1093/chemse/bjh035

BBC. A cronologia da crise do diesel, do controle de preços de Dilma à greve dos caminhoneiros. 2018. Acessado em: 19/05/2020. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-44239437>

Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol*. 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.

Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):655–681. doi:10.1128/CMR.00005-11

Blumental S, Lambermont M, Heijmans C, Rodenbach MP, El Kenz H, Sondag D, Bottieau E, Truven C. First documented transmission of *Trypanosoma cruzi* infection through blood transfusion in a child with sickle-cell disease in Belgium. *PLOS Neglect Trop D*. 2015;9(10):1-8.

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnosis of american tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop*. 1966; 8:227-234.

Cardoso AV, Lescano SA, Amato Neto V, Gakiya E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48(5):287–289. doi:10.1590/s0036-46652006000500009

Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):363–368. doi:10.1590/0074-02760140405

Carmona-Castro O, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Impact of climate change on vector transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in North America. Med Vet Entomol. 2018;32(1):84–101. doi:10.1111/mve.12269

Carvalho DB, Almeida CE, Rocha CS, et al. A novel association between *Rhodnius neglectus* and the *Livistona australis* palm tree in an urban center foreshadowing the risk of Chagas disease transmission by vectorial invasions in Monte Alto City, São Paulo, Brazil. Acta Trop. 2014;130:35–38. doi:10.1016/j.actatropica.2013.10.009

Castejon MJ, Yamashiro R, Oliveira CC, Granato D, Oliveira CAF, Ueda M. Study on the stability of internal quality control sera for HIV/AIDS immunodiagnostic tests. 2014. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 50(1), 36-45.

Castro C, Prata A. Absence of both circadian rhythm and *Trypanosoma cruzi* periodicity with xenodiagnosis in chronic chagasic individuals. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33(5):427–430. doi:10.1590/s0037-86822000000500003

CDC. Center for Disease Control and Prevention. American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Triatomine Bug FAQs. Acessado em: 22 mai. 16. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/index.html

Chagas C. Nova tripanozomiaze 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. 1909;1:159-208.

Coelho AC, García Díez J. Biological Risks and Laboratory-Acquired Infections: A Reality That Cannot be Ignored in Health Biotechnology. Front Bioeng Biotechnol. 2015;3:56. Published 2015 Apr 28. doi:10.3389/fbioe.2015.00056

Cooper C, Clode PL, Peacock C, Thompson RC. Host-Parasite Relationships and Life Histories of Trypanosomes in Australia. *Adv Parasitol.* 2017;97:47–109. doi:10.1016/bs.apar.2016.06.001

Cortes-Serra N, Pinazo MJ, de la Torre L, Galizzi M, Gascon J, Bustamante JM. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection Status using Saliva of Infected Subjects. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(2):464-467. doi:10.4269/ajtmh.17-0141

Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. *Cienc. Cult.* 2003;55(1).

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2013;108(8):962-967.

D'Alessandro A, Eberhard M, de Hincapié O, Halstead S. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in *Saimiri sciureus* from Bolivia and *Saguinus mistax* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35(2):285–289. doi:10.4269/ajtmh.1986.35.285

Dantas ES, Gurgel-Gonçalves R, Villela DAM, Monteiro FA, Maciel-de-Freitas R. Should I stay or should I go? Movement of adult *Triatoma sordida* within the peridomestic area of a typical Brazilian Cerrado rural household. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):14. Published 2018 Jan 5. doi:10.1186/s13071-017-2560-3

de Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1596. doi:10.1371/journal.pntd.0001596

de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci.* 2015;5:31. Published 2015 Jun 17. doi:10.1186/s13578-015-0021-2

Deane LM, Da Silva JE, Filho LL. Letter: Circadian rhythm in the parasitaemia of the primate haemoflagellate, *Trypanosoma minasense*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1973;67(3):424–425. doi:10.1016/0035-9203(73)90130-2

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MAB, et al. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1988;27(1):63–70. doi:10.1016/0166-6851(88)90025-4

del Puerto F, Sánchez Z, Nara E, et al. *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(3):386–390. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0006

Dias-Lima AG, Sherlock IA. Sylvatic vectors invading houses and the risk of emergence of cases of Chagas disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(5):611-613.

Díaz-Albiter HM, Ferreira TN, Costa SG, et al. Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines. *Parasit Vectors*. 2016;9:114. Published 2016 Feb 29. doi:10.1186/s13071-016-1401-0

Dorn PL, Daigle ME, Combe CL, Tate AH, Stevens L, Phillippi-Falkenstein KM. Low prevalence of Chagas parasite infection in a nonhuman primate colony in Louisiana. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(4):443–447.

Drozino RN, Otomura FH, Gazarini J, Gomes ML, Toledo MJO. *Trypanosoma* Found in Synanthropic Mammals from Urban Forests of Paraná, Southern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2019;19(11):828–834. doi:10.1089/vbz.2018.2433

Dumonteil E, Gourbière S, Barrera-Pérez M, et al. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(2):176–183. doi:10.4269/ajtmh.2002.67.176

Edvinsoon B. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* immunocompromised patients [tese]. Estocolmo: Karolinska Institutet; 2006.

Escalante ME, Gomez D, Silvera LA, Sánchez G, Venegas J. Detection of high percentage of *Trypanosoma cruzi* infection, the etiologic agent of Chagas disease, in wild populations of Colombian Caribbean triatomines. *Acta Parasitol*. 2015;60(2):315–321. doi:10.1515/ap-2015-0044

Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, et al. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):514–516. doi:10.1590/s0074-02762008000500021

Ferreira ILM, Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico (Carta ao editor). Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(5):507-509.

Ferreira RTB, Cabral ML, Martins RS, et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. Parasit Vectors. 2018;11(1):233. Published 2018 Apr 10. doi:10.1186/s13071-018-2699-6

Ferreira RT, Melandre AM, Cabral ML, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Extraction of *Trypanosoma cruzi* DNA from food: a contribution to the elucidation of acute Chagas disease outbreaks. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(2):190–195. doi:10.1590/0037-8682-0414-2015

Ferreira, SS. Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno. Dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz. 2019:128f.

Ferro E Silva AM, Sobral-Souza T, Vancine MH, et al. Spatial prediction of risk areas for vector transmission of *Trypanosoma cruzi* in the State of Paraná, southern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):e0006907. Published 2018 Oct 26. doi:10.1371/journal.pntd.0006907

Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. Med Clin (Barc). 2017;148(3):125-131. doi:10.1016/j.medcli.2016.10.038

Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79(5):768-770.

Fresquet N, Lazzari CR. Response to heat in *Rhodnius prolixus*: the role of the thermal background. J Insect Physiol. 2011;57(10):1446–1449.

Fong DL, Torrence AE, Vogel KW, et al. Transmission of Chagas disease via blood transfusions in 2 immunosuppressed pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Comp Med*. 2014;64(1):63–67.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saude Publica*. 1980;14(3):265-299.

Furman D, Davis MM. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. *Vaccine*. 2015;33(40):5271–5281.

Galvão C (org). Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6.

Guarner J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(3):164–169. doi:10.1053/j.semmp.2019.04.008

Garrido R, Bacigalupo A, Peña-Gómez F. et al. Potential impact of climate change on the geographical distribution of two wild vectors of Chagas disease in Chile: *Mepraia spinolai* and *Mepraia gajardoi*. *Parasites Vectors* 2019;12(478).

Gasparim AZ, Fontes CER, Rossoni DF, Toledo MJO. Epidemiological and clinical profile of patients with Chagas disease in the Central-North area of Paraná, Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(2):225–230. doi:10.1590/0037-8682-0173-2017

Giddings OK, Eickhoff CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF. Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun*. 2006;74(10):5549-5560. doi:10.1128/IAI.00319-06

Gühl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide C. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-Year-Old Mummified Human Tissue From Northern Chile. *Am J Physic Anthropol*. 1999;108;401-407.

Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int J Parasitol*. 2014;44(9):605–612. doi:10.1016/j.ijpara.2014.02.005

Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2004;46(6):323-330.

Haag J, O'hUigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. Mol Biochem Parasitol. 1998;91(1):37–49. doi:10.1016/s0166-6851(97)00185-0

Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasites & Vectors. 2014; 7(501):1-7.

Hernández C, Salazar C, Brochero H, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. Parasit Vectors. 2016;9(1):620. Published 2016 Dec 1. doi:10.1186/s13071-016-1907-5

Hernández L, Montoya A, Checa R, et al. Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. Vet Parasitol. 2015;207(1-2):149-155. doi:10.1016/j.vetpar.2014.10.035

Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):659–688. doi:10.1128/CMR.14.3.659-688.2001

Hodo CL, Bertolini NR, Bernal JC, VandeBerg JL, Hamer SA. Lack of *Trypanosoma cruzi* Infection in Urban Roof Rats (*Rattus rattus*) at a Texas Facility Housing Naturally Infected Nonhuman Primates. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2017;56(1):57–62.

Hodo CL, Wilkerson GK, Birkner EC, Gray SB, Hamer SA. *Trypanosoma cruzi* Transmission Among Captive Nonhuman Primates, Wildlife, and Vectors. Ecohealth. 2018;15(2):426–436. doi:10.1007/s10393-018-1318-5.

Homma AK, Nogueira OL, de Menezes AJ, de Carvalho JE, Nicoli CM, de Matos GB. Açaí: novos desafios e tendências. Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE). 2006.

Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS, Hallmark CJ, Musselwhite LW, Flink BJ, Bottazzi ME. Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas”. PLOS Neglect Trop D. 2012;6(5);1-4.

Hoyos CL, Cajal SP, Juarez M, et al. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* Infection in the Northwestern Argentina. Biomed Res Int. 2016;2016:6456031. doi:10.1155/2016/6456031

Huprikar S, Bosserman E, Patel G, et al. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. Am J Transplant. 2013;13(9):2418–2425. doi:10.1111/ajt.12340

Instrução Normativa IBAMA nº 23/2014. Define procedimentos para a destinação de animais silvestres apreendidos, resgatados por autoridade competente ou entregues voluntariamente pela população, bem como para o funcionamento dos Centros de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA - CETAS. 2014. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2014/in_icmbio_23_2014_destina%C3%A7%C3%A3o_animais_resgatados_cetas.pdf

Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. Parasit Vectors. 2018;11(1):502. doi:10.1186/s13071-018-3067-2

Jirón LF, Zeledón R. Preferencias alimentarias de tres especies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones experimentales [Feeding preferences in 3 species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in experimental conditions]. Rev Biol Trop. 1982;30(2):151–159.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 2016; 30:2725-2729.

Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. Behavioural biology of Chagas disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108 Suppl 1(Suppl 1):34–47. doi:10.1590/0074-0276130409

Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. Acta Trop. 1992;52(1):27–38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h

Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poco das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(4):445–452. doi:10.1590/s0074-02762000000400002

Lorenzo MG, Flores GB, Lazzari CR, Reisenman CE. Sensory ecology. A. Orientation. In: RU Carcavallo, I Galindez-Giron, J Jurberg, H Lent (eds.), Atlas of Chagas' disease vectors in America, Vol. III. 1999. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 1071-1087.

Lourenço JLM, Minuzzi-Souza TTC, Silva LR, et al. High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savanna. *Acta Trop*. 2018;177:200-206. doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.012

Lukes, J. [Internet]. Trypanosomatida Kent 1880. Version 02 January 2009 (under construction). [2009a] – [cited 2020 Mar 05]. Available from: <http://tolweb.org/Trypanosomatida/98015/2009.01.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Lukes, J. [Internet]. *Trypanosoma* Gruby 1843. Version 02 January 2009 (under construction). [2009b] – [cited 2020 Mar 05]. Available from: <http://tolweb.org/Trypanosoma/98034/2009.01.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Maia C, Cristóvão J, Pereira A, et al. Monitoring *Leishmania* infection and exposure to *Phlebotomus perniciosus* using minimal and non-invasive canine samples. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):119. Published 2020 Apr 21. doi:10.1186/s13071-020-3993-7

Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, et al. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop*. 2008;107(2):168–173. doi:10.1016/j.actatropica.2008.05.015

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2014;130:167–174. doi:10.1016/j.actatropica.2013.10.002

Messenger LA, Bern C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(5):415–421. doi:10.1097/QCO.0000000000000478

Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. 2019a:50(2):1-10.

Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. 2019b;50(36);1-7.

Minuzzi-Souza TT, Nitz N, Knox MB, et al. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. *Parasit Vectors*. 2016;9:39. Published 2016 Jan 26. doi:10.1186/s13071-016-1334-7

Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol*. 2013;133(1):89-94. doi:10.1016/j.exppara.2012.10.017

Monich AG, Dantas TW, Fávero KB, Almeida PTR, Maluf EC, Capeletto CDM, Nisihara, RM. Blood discard rate in a blood center in Curitiba – Brazil. Ten years of study. *Transfusion and Apheresis Science*. 2017;56(2):130–134.

Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*. 1989a;99 Pt 1:57–66. doi:10.1017/s0031182000061023

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989b; 27(7):1477-1482.

Mubiru JN, Yang A, Dick EJ Jr, et al. Correlation between presence of *Trypanosoma cruzi* DNA in heart tissue of baboons and cynomolgus monkeys, and lymphocytic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(4):627–633. doi:10.4269/ajtmh.13-0448

Ndao M, Kelly N, Normandin D, et al. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. *Comp Med*. 2000;50(6):658–665.

Neiva, A. Informações sobre a biologia da vinchuca, *T. infestans* KLUG. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1913;5:24-31.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):653–655. doi:10.3201/eid1504.081450

Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1996; 80:119-123.

Nyakatura JA. Early primate evolution: insights into the functional significance of grasping from motion analyses of extant mammals. *Biological Journal of the Linnean Society.* 2019;127:611–631. doi:10.1093/biolinnean/blz057

Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, Mendes SL, Tavares VC, Mittermeier RA, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil / Annotated checklist of brazilian mammals. 2012. 2nd ed. Arlington.

Pays JF. "No, Chagas disease is not the new AIDS of the Americas!". *B Soc Pathol Exot.* 2012;105(5):337-348.

Petana WB. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in the Caribbean. *Bull Pan Am Health Organ.* 1978;12(1):45–50.

Petrisor IG, Parkinson RA, Horswell J, Waters JM, Burgoyne LA, Catcheside DEA, Dejonghe W, Leys N, Vanbroekhoven K, Pattnaik P, Graves D. 11 - Microbial Forensics. In: Editors: Morrison RD, Murphy BL. *Environmental Forensics.* 2005. Academic Press, 227-257, ISBN 9780125077514. doi.org/10.1016/B978-012507751-4/50033-1.

Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malaria, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, (ed). *The laboratory primate: handbook of experimental animals.* 2005;Elsevier.

Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int J Parasitol.* 2001;31;648-652.

Pozzi L, Hodgson JA, Burrell AS, Sterner KN, Raaum RL, Disotell TR. Primate phylogenetic relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2014;75:165–183.

Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Neiva M, et al. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potencial vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Vet Med Sci*. 2019;00:1-9.

Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Neiva M, Timbó RV, de Moraes IOB, de Lima TM, Hecht M, Nitz N, Gurgel-Gonçalves R. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Vet Med Sci*. 2020 May;6(2):248-256. doi: 10.1002/vms3.216. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31743623; PMCID: PMC7196675.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, et al. *Leishmania* (Viannia) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(1):76-78. doi:10.1016/s0035-9203(02)90249-x

Ribeiro AR, Mendonça VJ, Alves RT, et al. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2014;48(2):295–302. doi:10.1590/s0034-8910.2014048004719

Ribeiro AR, Oliveira RC, Ceretti Junior W, et al. *Trypanosoma cruzi* isolated from a triatomine found in one of the biggest metropolitan areas of Latin America. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(2):183–189. doi:10.1590/0037-8682-0366-2015.

Ribeiro G Jr, Dos Santos CGS, Lanza F, et al. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):604. doi:10.1186/s13071-019-3849-1

Romaní F, Pariasca JC, Madrid JA, Herrera DE. La divulgación científica en el campo de la salud pública. La experiencia del Instituto Nacional De Salud [Scientific dissemination in the field of public health. The experience of The National Health Institute]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(3):515-522. doi:10.17843/rpmesp.2018.353.3640

Rovirosa-Hernández Mde J, Cortes-Ortíz L, García-Orduña F, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in southeastern Mexico. *Am J Primatol*. 2013;75(2):161–169. doi:10.1002/ajp.22094

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-1354.

Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Sulleiro E, et al. Prevalence of Chagas Disease among Solid Organ-Transplanted Patients in a Nonendemic Country. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(3):742–746. doi:10.4269/ajtmh.17-0735

Santana Kde S, Bavia ME, Lima AD, et al. Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. *Geospat Health*. 2011;5(2):199–203. doi:10.4081/gh.2011.172.

Santana RG, Guerra M, Sousa DR, et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*. 2019;25(1):132-135. doi:10.3201/eid2501.180646.

Santos WJ. *Trypanosoma cruzi* e outros tripanosomas em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil [dissertação]. 2016. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 88p.

Santos VRCD, Meis J, Savino W, et al. Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing?. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(5):e170298. doi:10.1590/0074-02760170298

São Paulo (Estado). Decreto nº 64.879, de 20 de março de 2020. Reconhece o estado de calamidade pública, decorrente da pandemia do COVID-19, que atinge o Estado de São Paulo, e dá providências correlatas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*. 2020a;130(56). Disponível em: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/decretos-64879-e-64880.pdf>

São Paulo (Estado). SP contra o novo coronavírus. 2020b. Acessado em: 30/07/2020. Disponível em: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/coronavirus/quarentena/>

Sathler-Avelar R, Mattoso-Barbosa AM, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Vitelli-Avelar DM, VandeBerg JL, VandeBerg JF. *Trypanosoma cruzi* Infection in Non-Human Primates. *Primates*. Burke M, Ptitto M, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.71652. Acessado em: 04/03/2020. Disponível em:

<https://www.intechopen.com/books/primates/trypanosoma-cruzi-infection-in-non-human-primates>

Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 2018;184:59–66. doi:10.1016/j.actatropica.2018.02.019

Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:375–378. doi:10.1590/s0074-02761999000700073

Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the Triatominae. Cad Saude Publica. 2000;16 Suppl 2:89–92. doi:10.1590/s0102-311x2000000800010

Schweinfurth MK, Call J. Revisiting the possibility of reciprocal help in non-human primates. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2019;104:73-86.

Sereno D, Akhoundi M, Sayehmri K, et al. Noninvasive Biological Samples to Detect and Diagnose Infections due to Trypanosomatidae Parasites: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Mol Sci. 2020;21(5):1684. Published 2020 Feb 29. doi:10.3390/ijms21051684

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis. 2012;54(6):845–852. doi:10.1093/cid/cir956

Silcox MT, Bloch JI, Boyer DM, Chester SGB, López-Torres S. The evolutionary radiation of plesiadapiforms. Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews, 2017;26(2):74–94. doi:10.1002/evan.21526

Silva EOR, Wanderley DMV, Rodrigues VLCC. *Triatoma infestans*: importância, controle e eliminação da espécie no Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998;1:73-88.

Silva MBA, Menezes KR, Farias MCG, Andrade MS, Victor MCA, Lorosa ES et al. Description of the feeding preferences of triatominae in the Chagas disease surveillance study for the State of Pernambuco, Brazil (Hemiptera: Reduviidae). Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(4):543-546.

Sousa OE, Rossan RN, Baerg DC. The prevalence of trypanosomes and microfilariae in Panamanian monkeys. Am J Trop Med Hyg. 1974;23(5):862–868. doi:10.4269/ajtmh.1974.23.862

Souza CA, Lani JL, Sousa JB. Origem e evolução do pantanal mato-grossense. VI Simpósio Nacional de Geomorfologia. 2006. Disponível em: <http://lsie.unb.br/ugb/sinageo/6/3/132.pdf>

Souza-Lima Rde C, Barbosa Md, Coura JR, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(4):510–514. doi:10.1590/0037-8682-1367-2013

Steindel M, Dias JCP, Romanha AJ. Doença de Chagas, mal que ainda preocupa. *Ciência Hoje*. 2005;37(217):32-38.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(1):25-32. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.016

Stevens, J., Gibson, W. The evolution of salivarian trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94, 2, 225-228, 1999.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33(3):205–214. doi:10.1016/0166-6851(89)90082-0

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. Vigilância entomológica de vetores. Situação atual. Secretaria do Estado da Saúde. Governo do Estado de São Paulo. 2016. Internet. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/doenca-de-chagas/situacao-atual>. Acessado em: 03/03/2020.

Tapia-Garay V, Figueroa DP, Maldonado A, et al. Assessing the risk zones of Chagas' disease in Chile, in a world marked by global climatic change. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(1):24–29. doi:10.1590/0074-02760170172

Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Vet Parasitol*. 2014;203(1-2):203–206. doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.010

Thompson CL, Williams SH, Glander KE, Teaforde MF, Vinyard CJ. Body temperature and thermal environment in a generalized arboreal anthropoid, wild mantled howling monkeys (*Alouatta palliata*). *Am J Phys Anthropol.* 2014;154(1):1–10. doi:10.1002/ajpa.22505

Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;164(2-4):118-123. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.027

Trüeb I, Portela RD, Franke CR, et al. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in Northeast Brazil. *J Wildl Dis.* 2018;54(1):76–84. doi:10.7589/2017-01-017

Vargas A, Malta JMAS, Costa VMD, et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. *Cad Saude Publica.* 2018;34(1):e00006517. Published 2018 Feb 5. doi:10.1590/0102-311X00006517

Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Marcet PL, et al. Seasonal variations in active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* in rural north-western Argentina. *Med Vet Entomol.* 2006;20(3):273–279. doi:10.1111/j.1365-2915.2006.00637.x

Viol MA, Lima VM, Aquino MC, et al. Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2012;111(4):1607–1613. doi:10.1007/s00436-012-2999-2

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 5:574-583.

Wells B, Camus MS, Mayer J, Cusack L, Khana D, Tarigo JL. What is your diagnosis? Blood smear review in a white-tailed deer. *Vet Clin Pathol.* 2019;48(1):131–133. doi:10.1111/vcp.12683

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2019. Acessado em: 05/03/2020. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

WHO. World Health Organization. Why are some tropical diseases called "neglected"? 2020. Acessado em: 05/03/2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/why-are-some-tropical-diseases-called-neglected>

WHO. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Acessado em: 30/07/2020. Disponível em: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

Wild Welfare. Animal welfare in Brazilian zoos. 2019. Acessado em: 05/03/2020. Disponível em: <https://wildwelfare.org/portfolio/animal-welfare-in-brazilian-zoos/>

Yasukawa, K. Blood donor screening for *Trypanosoma cruzi* infection in Japan. Transfusion. 2012;54(3):745-746.

Yefi-Quinteros E, Muñoz-San Martín C, Bacigalupo A, Correa JP, Cattán PE. *Trypanosoma cruzi* load in synanthropic rodents from rural areas in Chile. Parasit Vectors. 2018;11(1):171. Published 2018 Mar 12. doi:10.1186/s13071-018-2771-2

Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(1):105–107. doi:10.1590/0037-8682-1723-2013

Zetun CB. et al. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do Estado de São Paulo. Vet. e Zootec. 2014;21(1):139-147.

Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira R. The haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91(4):501-505.

Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(2):157–159. doi:10.1590/s0074-02762000000200004

Manuscrito

Manuscrito

American Journal of Primatology



**First report of non-human primates naturally infected by
Trypanosoma cruzi in South of Brazil**

Journal:	<i>American Journal of Primatology</i>
Manuscript ID	AJP-20-0152
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	27-Aug-2020
Complete List of Authors:	dos Santos, Wesley; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Doenças Tropicais Guiraldi, Livia; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina Campus de Botucatu, Doenças Tropicais Medeiros, Maria Izabel; APTA, Sao Paulo Agribusiness Technology Agency Richini-Pereira, Virginia; Instituto Adolfo Lutz, Centro de laboratorios regionais Bauru Lucheis, Simone; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina Campus de Botucatu, Doenças Tropicais; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia Campus de Botucatu, Higiene Veterinária e Saúde Pública; APTA, Sao Paulo Agribusiness Technology Agency
Indicate which taxonomic group was the subject of your study (select all that apply or type another option)::	New World monkeys
Keywords:	monkey, new world primates, trypanosomes, Chagas disease, PCR

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons

1 First report of non-human primates naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in

2 South of Brazil

3

4 Wesley José dos Santos^{1*}, Livia Maísa Guiraldi¹, Maria Izabel Merino de

5 Medeiros², Virginia Bodelão Richini-Pereira³, Simone Baldini Lucheis^{1,2,4}.

6

7 1: Department of Tropical Diseases, Medical School, Sao Paulo State University

8 (UNESP), Botucatu, Brazil.

9 2: São Paulo Agribusiness Technology Agency (APTA), Bauru, Brazil

10 3: Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratories Center II, Bauru, Brazil.

11 4: School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University

12 (UNESP), Botucatu, Brazil.

13 * Corresponding author: wesley.santos@unesp.br

14

15

16 Abstract

17

18 Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a disease that affect millions

19 of people in the Americas, where it is endemic. In addition to humans, several

20 wild animals participate in its life cycle, including non-human primates (NHP),

21 which are naturally susceptible to infection by the parasite. We performed

22 molecular research for *T. cruzi* DNA in samples of 18 NHP from the Curitiba Zoo,

23 in the southern region of Brazil. Of these, seven samples were positive, being the

24 first report of natural infection by *T. cruzi* from NHP in the southern region of the

25 country. Although the triatomine eradication campaigns conducted in the past in

the country and the climatic conditions in the southern region of the country are not favorable for the maintenance of these vectors, it is possible to state that triatomines are using NHP as a source of blood meal and transmitting and *T. cruzi* to these animals, and helping to keep the parasite in the environment. We result showed the need for active searches in zoos and spaces where NHP are maintained, to ensuring the safety them and of other animals that live close to these animals, thus collaborating for the One Health in these establishments.

Key words: monkey; new world primates; trypanosome; Chagas disease; PCR

1 Introduction

Trypanosomatids are a group of parasites with a large importance in human and veterinary medicine. Within trypanosomatids, *Trypanosoma cruzi* is the most relevant, for be the etiological agent of Chagas disease, endemic in Americas. Just in Latin America, it is estimated that six a seven million persons are infected (WHO 2019). In Brazil, are about five million persons infected. Although the existence of vectorial control programs, a dozen of species of triatomines may still participate of the transmission cycle, in humans and mainly in wild animals (Brasil, 2019).

Non-human primates (NHP) are naturally susceptible to the infection by *T. cruzi*, free animals as in captive ones (Ziccardi et al. 2000). Although the care practices to these animals, triatomines may nidificate and to use them as a source of blood meal, transmitting the parasites during this process. (Reis et al., 2019).

The presence of *T. cruzi* in this NHP offers a possibility to know how the circulation of the parasite near to the urban areas. Therefore, we analyzed

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

50 samples of blood from NHP, from a zoo of the South area of Brazil, to research

51 *T. cruzi*.

52

53 2 Material and methods

54 2.1 NHP of the study

55 We analyzed blood samples from 18 NHP from Curitiba Zoo, capital of the
56 Paraná State, South of Brazil, samples being of 08 black-faced black spider
57 monkey (*Ateles chamek*), 05 black-tufted marmoset (*Callithrix penicillata*), 03
58 Tufted capuchin (*Sapajus apella*), 01 common squirrel monkey (*Saimiri sciureus*)
59 and 01 NHP non identified in the database (Figure 1).

60 The study was approved by the Animal Use Ethics Committee at the
61 UNESP School of Medicine under protocol number 1213/2017 and by the System
62 of Authorization and Information in Biodiversity of Chico Mendes Institute for the
63 Conservation of Biodiversity (ICMBio) of Ministry of Environment
64 (SISBIO/ICMBio/MMA N° 57382-3). The research was also approved by the
65 Curitiba Zoo. The proceedings to collect the biological samples were based in the
66 normative of animal welfare.

67

68 2.2 Molecular analysis

69 DNA was extracted from the blood samples using the commercial kit Illustra
70 Blood GenomicPrep® Mini Spin Kit (GE® Healthcare), according to the
71 manufacturer's recommendations.

72 The amplification of the kDNA minicircles fragments of the *T. cruzi* was
73 conducted using the primers 121: 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'
74 and 122: 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3', with the cycling profile

as follows: initial denaturation of 94 °C/3min, following by 35 cycles of 94 °C/30s, 57 °C/30s and 72 °C/30s, with a final extension of 72 °C/7min, according to Fitzwater et al., 2008. The samples were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel, added 0.1 µL/mL SYBR Safe® DNA Gel Stain (Invitrogen).

To evaluate the endogenous quality, DNA integrity, and presence of inhibitors, we used primers for the conserved vertebrate beta globulin genes $\beta 1$ 5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTAC-3' and $\beta 2$ 5'-CTTCTGACACAACTGTGTCTACTAGC-3' with the cycling profile as follows: initial denaturation of 95 °C/5min, following by 30 cycles of 95 °C/30s, 60 °C/30s and 72 °C/30s, with a final extension of 72 °C/5min, adapted from Edvinsson, 2006.

3 Results

Of the 18 PNH, 7 (38.9%) amplified for primers that amplify *T. cruzi* kDNA minicircles, all of them *A. chamek*. The other animals did not amplify for *T. cruzi*. All samples amplified using $\beta 1/\beta 2$, indicating good quality of DNA extraction and ensuring that all other NHP negative for *T. cruzi* are truly negative.

4 Discussion

This is the first report of NHP naturally infected by *T. cruzi* in the southern region of Brazil. Cases of Chagas disease in the South of the country were frequent in the last decades of the 20th century, before the implementation of programs to control the main vector of the parasite in Brazil, *Triatoma infestans*. Thus, most cases registered in the southern population of Brazil refer to chronic

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

99 Chagas' disease, whose the appearance of many typical clinical symptoms may
100 appear decades after infection (Rodrigues-dos-Santos et al., 2018).

101 The Curitiba city, where the zoo is located, has no cases of Chagas disease
102 in the population, nor in surveys conducted with domestic animals. One study
103 about blood discard rate in a blood center in Curitiba showed a low fluctuation of
104 positive donors for Chagas disease. The authors point out that the population
105 explosion may have made the city move towards natural areas, where the
106 triatomines are found (Monich et al., 2017). However, as it is not possible to have
107 access to donors' origin, it is not possible to ensure that donors have always lived
108 in the city.

109 Nevertheless, despite the apparent success of the *T. infestans* eradication
110 program, many other triatomines of epidemiological relevance still circulate in the
111 country and can be vectors of *T. cruzi*. *Panstrongylus megistus* nests have been
112 found in the city previously, mainly in the peri-urban environment, precisely in
113 place where the zoo is located (Brasil, 2019).

114 Curitiba is one of the Brazilian capitals with the lowest annual average
115 temperatures in the country, below 20 °C (68 °F). Triatomines have habits more
116 active during warmer periods. Thus, they tend not to fly and stay close to nesting
117 zones at temperatures below 20 °C (Lehane et al., 1992), which indicates a high
118 possibility that the nesting points of these insects are close to the enclosures of
119 PNH of the study, especially of *P. megistus*, which have been previously found in
120 the capital. The capital of Paraná, despite the climate that is not favorable to
121 triatomines, has favorable landscape characteristics for the maintenance of
122 insects in the environment (Ferro e Silva et al., 2018).

1
2
3 123 All animals positive by the molecular technique belong to the same species
4
5 124 of NHP. This indicates that there must be nests within or near the enclosure
6
7 125 where these animals live and that triatomines are using these animals as a source
8
9 126 of blood meal. The use of 121/122 primers proved to be feasible with blood
10
11 127 samples from wild animals and can be replicated in other studies.
12
13

14 128 The use of primers for the beta-globulin gene used to control DNA quality
15
16 129 were extremely important to ensure that negative animals are, in fact, negative
17
18 130 by PCR to detect *T. cruzi* kDNA minicircles. As a limitation of our study, we report
19
20 131 that the collection and transport of blood samples from the PNH occurred during
21
22 132 the truckers' strike in Brazil in 2018, which resulted in delays in the transportation
23
24 133 of various items, including our material. However, performing PCR to check the
25
26 134 quality of the samples, we are more confident in saying that the other PNH
27
28 135 negative for PCR of *T. cruzi* did not really amplify for the technique, not because
29
30 136 of the low quality of the extracted DNA, but, because we really did not have the
31
32 137 parasite's DNA detected in the blood of these animals.
33
34
35
36
37

38 138

39 139 5 Conclusion

40
41 140 There is an active circulation of *T. cruzi* in wild animals, as indicated in the
42
43 141 PNH of this work, indicating that triatomine vectors are able to install themselves
44
45 142 in zoo environments and use these animals as a source of blood meal and have
46
47 143 the ability to transmit the parasite to these animals. Although there are no human
48
49 144 cases of zoonotic origin, urban expansion can take the population to areas where
50
51 145 these insects live, allowing humans and domestic animals to be susceptible to
52
53 146 transmission. The importance is clear after this study, that zoos and wild animal
54
55 147 conservation centers carry will must actively search for possible nesting points
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

148 for triatomines in all areas, especially close to primate enclosures and island, in
149 order to control the spread of the parasite in the home environment.

150

151 6 Acknowledgements

152 We are grateful for all the help of the staff of the Curitiba Zoo, especially
153 veterinarians Manoel Lucas Javorouski and Oneida Lacerda with the care of the
154 animals and the procedures for collecting the samples. This work received
155 financial support from CAPES.

156

157 7 References

158 Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico: Doença de Chagas
159 Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica,
160 Brasil 2012 a 2016. 2019;50(2):1-10.

161

162 Edvinsoon B. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii*
163 immunocompromised patients [tese]. Estocolmo: Karolinska Institutet; 2006.

164

165 Ferro E Silva AM, Sobral-Souza T, Vancine MH, et al. Spatial prediction of
166 risk areas for vector transmission of *Trypanosoma cruzi* in the State of Paraná,
167 southern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(10):e0006907. Published 2018 Oct
168 26. doi:10.1371/journal.pntd.0006907

169

170 Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L,
171 Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for

- chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79(5):768-770.
- Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. Acta Trop. 1992;52(1):27–38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h
- Monich AG, Dantas TW, Fávero KB, Almeida PTR, Maluf EC, Capeletto CDM, Nisihara, RM. Blood discard rate in a blood center in Curitiba – Brazil. Ten years of study. Transfusion and Apheresis Science. 2017;56(2):130–134.
- Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Neiva M, et al. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. Vet Med Sci. 2019;00:1-9.
- Rodrigues-Dos-Santos Í, Melo MF, de Castro L, et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(11):e0006939. Published 2018 Nov 12. doi:10.1371/journal.pntd.0006939
- WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2019. Accessed in: 05/03/2020. Available in: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

- 1
2
3 197
4
5 198 Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA.
6
7
8 199 Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates,
9
10 200 Ananindeua, State of Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(2):157–159.
11
12 201 doi:10.1590/s0074-02762000000200004
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Research Highlights

- Free-living and captive non-human primates (NHP) are susceptible to infection by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease.
- Despite the low prevalence in humans, we report for the first time the presence of *T. cruzi* among captive NHP in southern Brazil.

For Peer Review

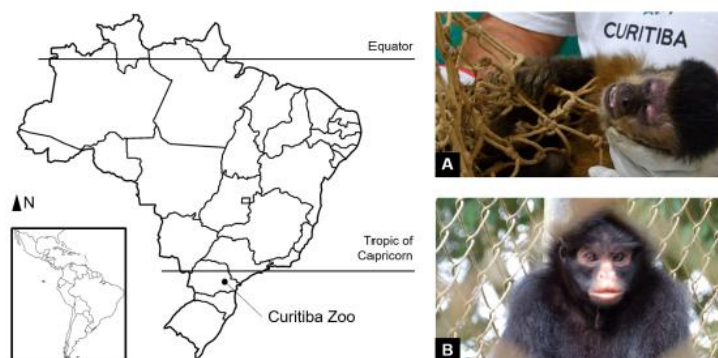


Figure 1: Map of Brazil indicating the location of the Curitiba Zoo. (A) Tufted capuchin (*Sapajus apella*) contained for blood sample collection. (B) black-faced black spider monkey (*Ateles chamek*) in its enclosure at the Zoo.

295x153mm (150 x 150 DPI)



184x128mm (150 x 150 DPI)

Anexos

Anexos

ANEXO A - Protocolo de extração de DNA a partir de amostras de sangue

Para a extração de DNA a partir das amostras de sangue dos PNH, foi utilizado o kit de extração comercial Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit®, da GE Healthcare® e foi seguido o protocolo do fabricante, abaixo.

As amostras de sangue dos primatas foram descongeladas em gelo. Em novos microtubos de 1,5ml livres de DNases e RNases, foram adicionados 20µL de Proteinase K. Em seguida, foram adicionados 300µL do sangue, seguido de uma rápida agitação. Após esse procedimento, foi adicionado 400µL de *buffer* de lise, seguido de uma agitação por 15s. Os microtubos foram incubados em temperatura ambiente por 10min.

Depois da incubação, os microtubos foram submetidos a um rápido *spin*, para que o lisado permanecesse na parte inferior do microtubo.

Após esse procedimento, o lisado foi transferido completamente para uma minicoluna, um pequeno filtro que é inserido dentro de um tubo coletor, fornecido no kit pelo fabricante. Após a transferência do lisado, a minicoluna com o tubo coletor foram submetidos a uma microcentrifugação por 1min à 11 mil rcf.

O líquido filtrado foi descartado do tubo coletor. Em seguida, foram adicionados 500µL de *buffer* de lavagem, seguido de uma nova microcentrifugação por 1min à 11 mil rcf.

Após novo descarte do líquido do tubo coletor, uma nova lavagem com o *buffer* de lavagem foi feita, seguido de uma nova microcentrifugação por 3min à 11 mil rcf.

O tubo coletor foi descartado e a minicoluna foi inserida em um novo microtubo livre de DNase e RNase. Dentro da minicoluna foram adicionados 100µL de *buffer* de eluição, aquecidos 70 °C *a priori*. Esse preparado foi mantido em incubação em temperatura ambiente por 1min, seguido de uma microcentrifugação por 1min à 11 mil rcf.

A minicoluna foi descartada e o DNA extraído foi armazenado em freezer - 18 °C até o momento do uso.

Um resumo das etapas de extração está disponível na FIGURA 6 para rápida consulta.

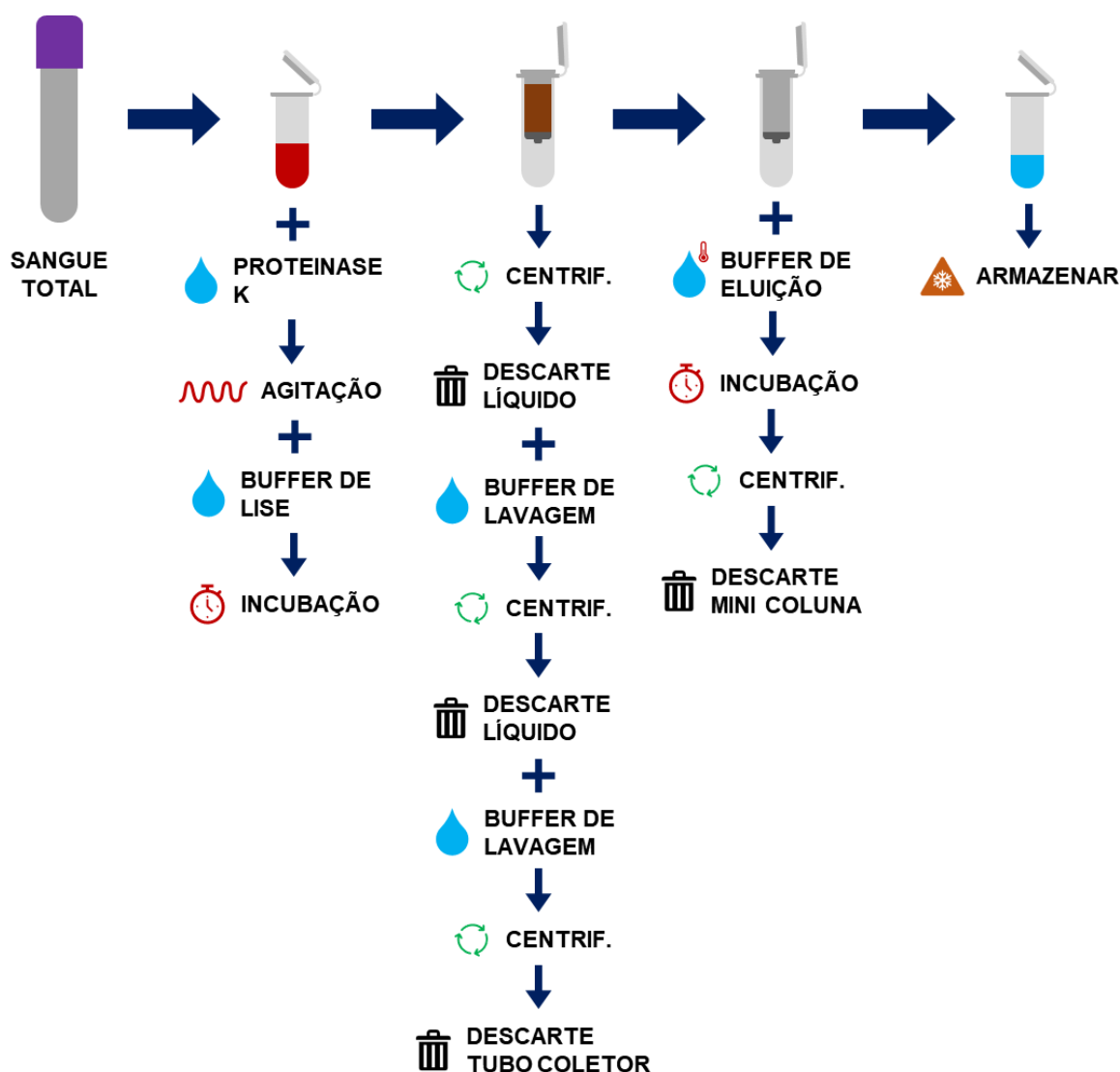


FIGURA 6: Etapas de extração de DNA seguindo o protocolo do fabricante. Os tubos na parte superior indicam que houve troca de tubos ou transferência de líquidos ou parte dele para um novo micrutubo. Os volumes utilizados, tempo de incubação e configuração das centrifugações estão disponíveis ao longo do texto.

ANEXO B - Protocolo de extração de DNA de swab conjuntival pelo método *in house* de *salting out* com *overnight*.

Para a realização da técnica de extração de DNA a partir destas amostras, foi utilizado um segundo protocolo, adaptado a partir de Benassi et al. (2017).

Os swabs estavam armazenadas em microtubos a 4 °C imersas em 300µL de solução salina tamponada (PBS pH 7,2). Nestes microtubos foram adicionados 400µL de solução tampão. Esta solução tampão, mantida em geladeira até o momento do uso, é feita com 3,75mL de NaCl 5M, 12mL de EDTA 0,5M, água ultrapura qsp 50mL.

Os microtubos com o swabs imersos em PBS pH 7,2 e a solução tampão adicionados foram homogeneizados em agitador por 10s e incubados em temperatura ambiente por 20min.

Após a incubação, 200µL das amostras foram transferidos para um novo microtubo. Em seguida, adiciona-se 230µL de solução mix aquecido à 60 °C e homogeneizados em agitador por 10s. A solução mix é feita com 200µL de água ultrapura, 20µL de SDS 10% e 10µL de proteinase K (20mg/mL). Após a agitação no agitador, as amostras são incubadas em banho-seco à 54 °C por três horas, com agitações manuais ocasionais.

Feita a incubação, as amostras são levadas em geladeira por 15min, afim de evitar choque térmico. São adicionados, após este período, 140µL de NaCl 5M gelado, seguido de agitação por 10s. As amostras são centrifugadas por 10min a 13 mil rpm em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, 400µL do sobrenadante é pipetado para um novo microtubo, sendo adicionado em seguida 1mL de álcool etílico absoluto gelado, homogeneizado por inversão cinco vezes. Estas amostras serão mantidas em freezer -20 °C overnight, por aproximadamente 18-20 horas.

Seguido a incubação em freezer das amostras, centrifugar a 12 mil rpm por 20min à 4 °C. Após esta etapa, o sobrenadante é descartado por inversão, mantendo-se o pellet. Os microtubos serão mantidos abertos e invertidos em papel toalha para absorção do excesso de líquido por 5min. Em seguida, serão secos abertos em banho-seco por 15min a 54 °C.

O DNA será ressuspenso adicionando 40µL de água ultrapura à 54 °C nos tubos com as amostras secas, seguido de uma última incubação a 54 °C por 15min. Após este período, as amostras foram armazenadas em freezer para uso na técnica de biologia molecular.

Um resumo das etapas realizadas para este método de extração de DNA está disponível para rápida consulta na FIGURA 7.

Referências (ANEXO B):

Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol.* 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.

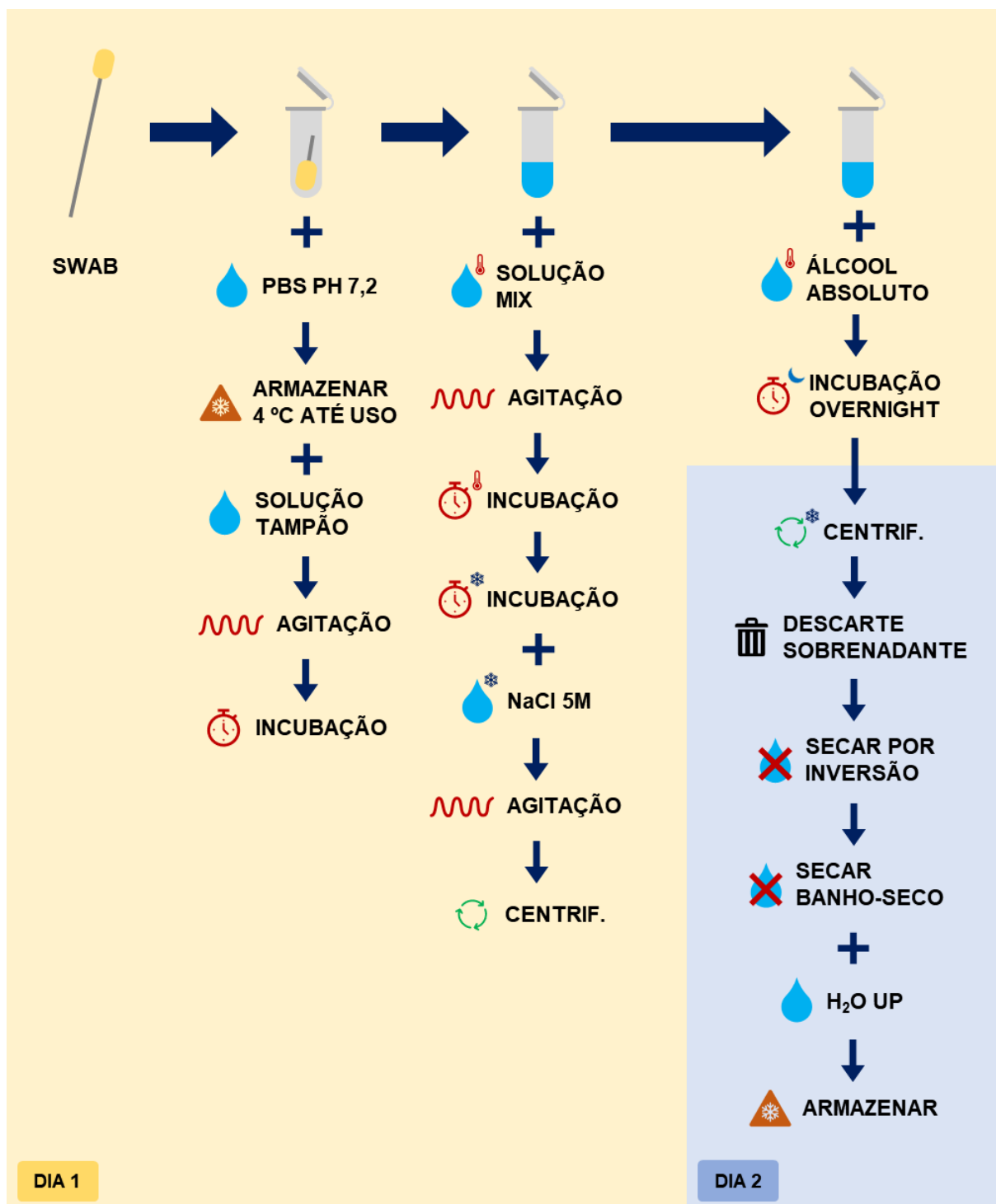


FIGURA 7: Etapas de extração de DNA a partir de amostras de primatas não-humanos em swab conjuntival pelo método de salting out in house com overnight.

ANEXO C - Quantificação de DNA a partir da extração das amostras de sangue total e de swab conjuntival.

O procedimento de quantificação foi realizado com o equipamento disponível no LASAB/APTA Bauru, São Paulo. Para tanto, o aparelho de quantificação foi calibrado previamente utilizando-se 2µL de água ultrapura nas cavidades de leitura indicadas no aparelho. Após calibração, foram utilizados 2µL de cada amostra de DNA para leitura de quantificação. Os dados obtidos da quantificação, bem como a relação 260/280 podem ser vistos nas tabelas disponíveis no APÊNDICE D.

Ácidos nucleicos absorvem luz à 260nm (comprimento de onda eletromagnética), enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa de pureza de DNA na amostra é verificada pela relação de absorbância 260/280. Valores dessa relação entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. Valores abaixo de 1,8 podem indicar excesso de proteínas na amostra.

ANEXO D - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A técnica de PCR é um método de biologia molecular o qual consiste na amplificação *in vitro* de trechos específicos de uma sequência genética de interesse (Saiki et al., 1985; Mullis e Faloona, 1987) gerando, assim, milhares de cópias a partir de um único trecho inicial. Desde seu primeiro uso em meados de 1980, a PCR é um dos métodos mais utilizados em laboratórios no mundo. Os avanços técnicos permitiram uma melhor automação do método, mas a base da PCR pouco mudou desde então.

Para que a amplificação do DNA ocorra, são utilizados os seguintes reagentes juntamente com uma alíquota da amostra: água ultra pura, garantindo o meio da reação; tampão de PCR (KCl e Tris-HCl), que evitam mudanças no pH da solução durante a reação; $MgCl_2$, um cloreto que serve como cofator, catalisando a reação; dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados), são os nucleotídeos livres que irão construir as novas fitas de DNA durante a reação; Taq polimerase (oriunda da bactéria extremófila *Thermus aquaticus*), enzima de DNA polimerase, que permitirá a construção das novas fitas; *primers* (iniciadores), pequenos trechos de fita simples de DNA que servem de iniciadores da reação da construção da nova fita de DNA, ao se ligarem ao trecho correspondente do DNA da amostra.

A reação é feita com os reagentes sendo submetidos a um perfil de ciclagem de temperatura, a qual a atuação das mudanças da temperatura e dos reagentes permitem a amplificação da fita de DNA. O perfil de ciclagem clássico é dividido em três partes: desnaturação, anelamento e extensão. A fase de desnaturação envolve o aumento da temperatura de reação (acima de 90 °C), para que ocorra a desnaturação da fita de DNA, expondo as bases nitrogenadas. Na segunda fase, de anelamento, com a queda da temperatura (geralmente abaixo dos 60 °C) os *primers* e os dNTPs se anelam à fita de DNA aberta, iniciando a construção de novas fitas. A fase final, de extensão (cerca de 70 °C), ocorre a atuação da Taq polimerase, a qual a fita de DNA é construída. Esse processo ocorre algumas vezes, dependendo do tipo de amostras, *primers* e reagentes utilizados. A FIGURA 8 ilustra o perfil de ciclagem tradicional da PCR.

Ao final do processo de ciclagem, os *amplicons*, resultado da reação de PCR, terá milhares de cópias do trecho de interesse que foram amplificados a partir da alíquota da amostra original.

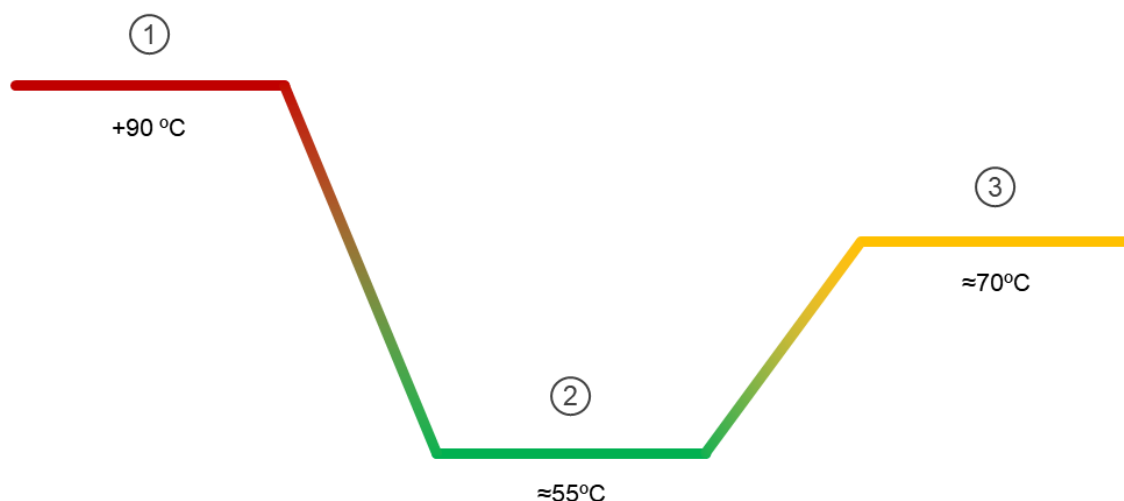


FIGURA 8: Perfil de ciclagem da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em (1), a fase da desnaturação, em que a fita de DNA é aberta, expondo as bases nitrogenadas. (2), a fase de anelamento, a qual os *primers* se ligam à fita de DNA aberta, permitindo que se inicie a síntese da nova fita. (3), fase de extensão, a qual a Taq polimerase age, construindo a nova fita de DNA usando a amostra como base. Esse ciclo se repete várias vezes.

Referências (ANEXO D):

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*. 1987; 115:335-350.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-1354.

ANEXO E - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conhecida sofreu um salto no começo dos anos 1990, com a descoberta de que era possível acompanhar, em tempo real, a amplificação dos trechos de DNA usados nas análises (Higuchi, 1993). A qPCR, também conhecida como PCR quantitativa, permitiu uma maior sensibilidade no diagnóstico molecular e hoje é padrão para a detecção do DNA de causadores de diversas doenças.

O método utiliza o uso de um corante fluorescente repórter, que se liga aos *amplicons* durante a ciclagem da qPCR. À medida que vai passando o tempo da reação, o sinal da fluorescência (SF) do corante aumenta, e essa mudança é detectada pelos sensores disponíveis nos termocicladores compatíveis com qPCR.

Os reagentes utilizados são semelhantes ao utilizado na PCR (mais informações no ANEXO D), com pequenas diferenças nos volumes e na apresentação. O corante usado nesse trabalho, quando livre na solução, emite pouco SF. À medida que a reação ocorre e mais DNA fita dupla resultante da reação aparece, o SF aumenta, gerando as curvas de detecção que são registradas no software.

A curva padrão da qPCR é dividida em quatro fases: a *baseline*, exponencial, linear e platô. Na *baseline*, o SF é baixo demais para ser mensurado, já que a quantidade de *amplicons* ainda é baixa e não há ligação do corante com as fitas de DNA geradas na reação. Já a fase exponencial, é quando o SF atinge os níveis mínimos para a detecção e registro, já que há uma maior quantidade de *amplicons* na reação, o que faz seguir para a fase linear, onde ocorre o máximo de reações e emissão de SF. A última fase, a platô, é quando as reações começam a se esgotar e o SF atinge seu nível máximo.

As curvas geradas pela detecção do SF nas amostras são comparadas com as curvas geradas pelos controles. Assim, é possível mensurar a quantidade aproximada de parasitos/mL da amostra, já que os controles foram previamente quantificados e seus valores são conhecidos de antemão (o método de quantificação dos controles está disponível no ANEXO F).

A posição a qual a fase exponencial inicia na reação também é um indicativo da abundância de material disponível na amostra (chamada de ciclo de

quantificação (Cq)). Quando a amostra é abundante em material genético, o SF aparece com menos ciclos, indicando que a amostra tem Cq baixa. Quando a amostra não é abundante em material, o SF aparece depois de mais ciclos, indicando que a amostra tem Cq alta. Naturalmente isso varia conforme o trabalho e o tipo de amostra que está sendo trabalhada. A FIGURA 9 ilustra as principais etapas da qPCR.

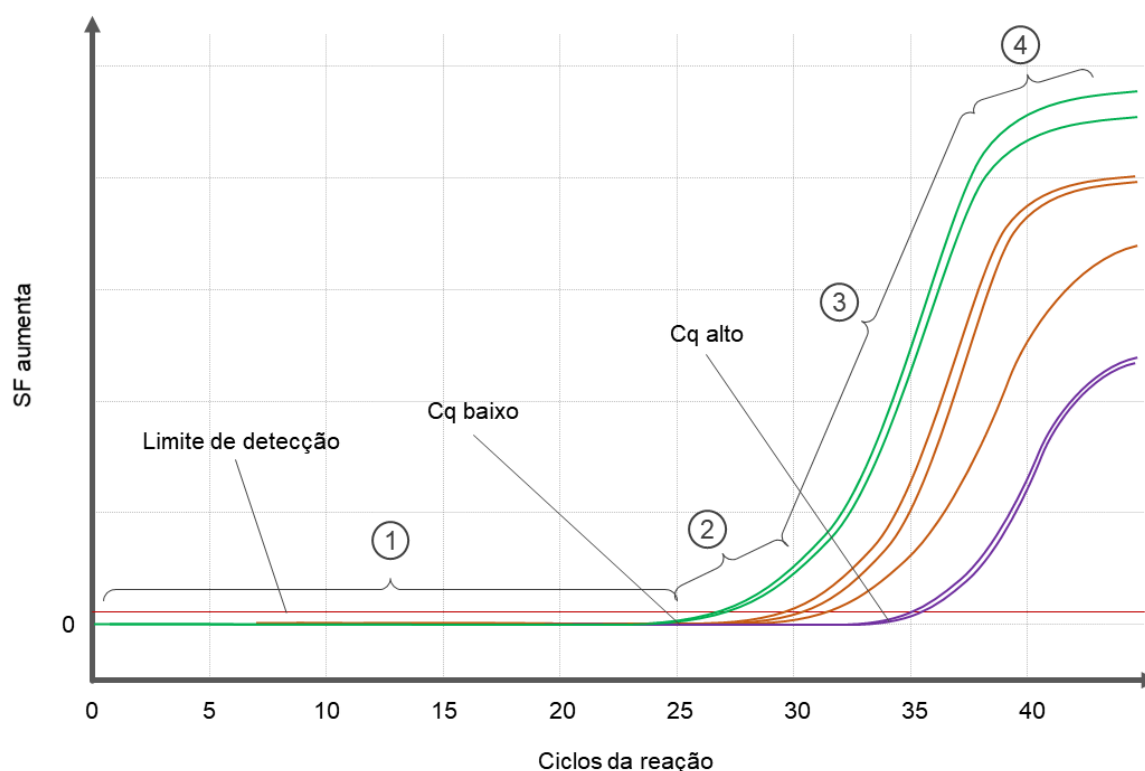


FIGURA 9: Exemplo de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Cerca da primeira metade do ciclo não é possível detectar sinal de fluorescência (SF) sendo emitido pelo corante na reação. Esse início é a *baseline*, indicado pelo número 1. Assim que o SF ultrapassa o limite de detecção, entra a fase exponencial (2). As reações continuam acontecendo durante a fase linear (3), atingindo o máximo de reação na fase platô, próxima ao fim da reação (4). Abundância de material geralmente faz as amostras saírem da *baseline* mais cedo que amostras menos abundantes. Assim, amostras mais abundantes tem menos ciclos de quantificação (Cq), apresentando Cq baixo. Já amostras menos abundantes apresentam Cq alto.

Referências (ANEXO E):

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotech.* 1993; 11:1026-1030.

ANEXO F - Quantificação de controles positivos para qPCR.

Para a quantificação das formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi utilizado uma câmara de Neubauer (CN). Para tanto, uma lamínula própria para uso com a lâmina da CN foi utilizada e colocada no espaço apropriado. Foi pipetado 10µL de cultura contendo *T. cruzi* na borda da lamínula, aguardando um minuto para o líquido preencher completamente a câmara de contagem.

A CN foi levada ao microscópio óptico comum e foi feita a contagem do *T. cruzi* com objetiva em menor aumento (10X). Foi realizada a contagem a partir dos dois lados da CN, em cinco quadrantes de visualização no campo de visão, sendo superior e inferior direitos e esquerdos e uma área central.

Foi feita a média da quantidade observada a partir de cada quadrante de cada lado da CN e uma média das médias ($\bar{x}$) da quantidade a partir dos valores de cada lado da CN.

A estimativa da quantidade de *T. cruzi* por microlitro ($x / \mu\ell$) foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\bar{x}}{1 \times \frac{5}{25} \times h} = x / \mu\ell$$

Onde h é a altura da CN, em centímetros.

O cálculo de diluição da solução foi utilizado a fórmula de diluição:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Onde $C1$ é a quantidade estimada de *T. cruzi*; $V1$ é o volume (em microlitros) da quantidade estimada de *T. cruzi*; $C2$ é a quantidade de concentração inicial para a quantificação dos controles para a qPCR (no caso, 10^5); $V2$ é o volume a ser descoberto (em microlitros).

Foi pipetado, em um microtubo de 1,5mL, o valor correspondente de $V2$ e completado com água ultrapura até o volume de 1mL. Assim, foi obtido o controle positivo para qPCR na concentração de 10^5 parasitos/mL.

Assim, foi realizado o protocolo de diluição seriada dos controles. A partir da concentração de 10^5 parasitos/mL, foi pipetado 100µL desse concentrado para um

novo microtubo contendo 900µL de água ultrapura. Assim, esse segundo microtubo passou a conter 10^4 parasitos/mL. Para obter a concentração de 10^3 parasitos/mL, foi pipetado 100µL da concentração de 10^4 parasitos/mL em um novo microtubo contendo 900µL de água ultrapura. Esse procedimento foi repetido até chegar na concentração de 10 parasitos/mL.

A ilustração disponível na FIGURA 10 resume as etapas da quantificação utilizadas nesse trabalho.

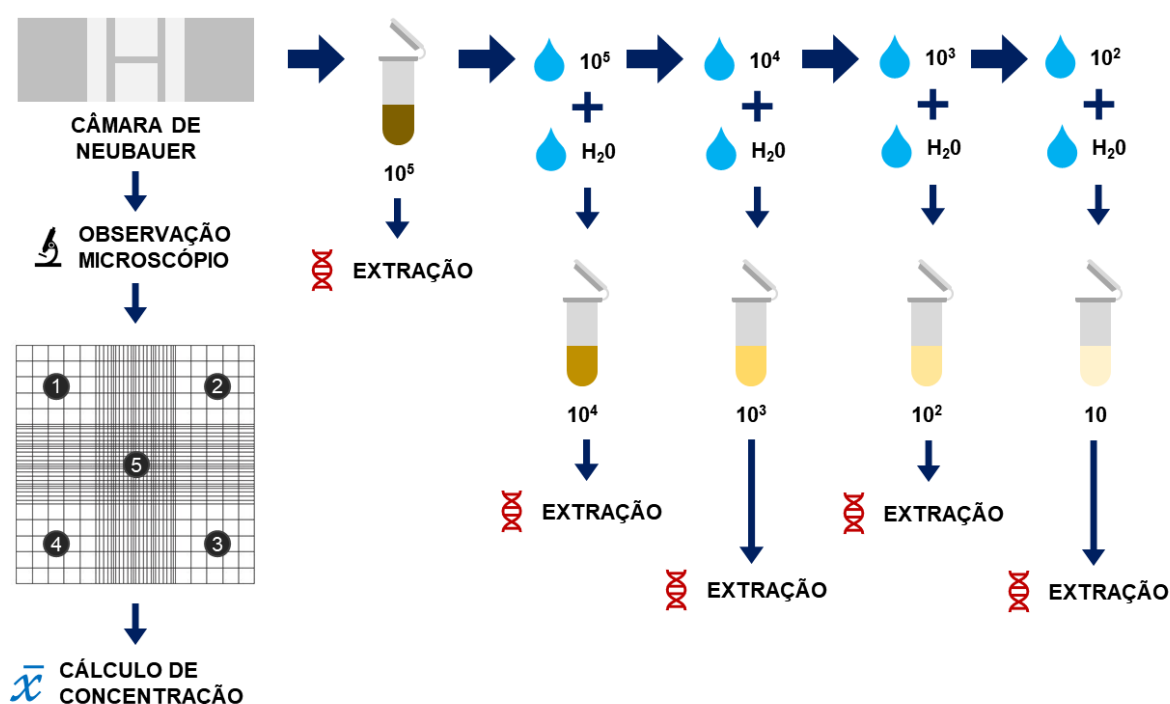


FIGURA 10: Etapas de quantificação de parasitos para a extração de controles da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Os volumes e cálculos utilizados estão disponíveis no texto.

Todos esses preparados de cultura foram enviados para extração do DNA utilizando kit de extração comercial Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit®, da GE Healthcare®, seguindo os protocolos do fabricante. Detalhes da extração podem ser vistos no ANEXO A.

ANEXO G - Sensibilização de lâminas para a técnica sorológica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Para a realização da técnica de RIFI, lâminas próprias para imunofluorescência que estavam previamente armazenadas em álcool 70% foram secas e mantidas protegidas de impurezas por 24 horas. Uma alíquota a partir das culturas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* mantidas em meio LIT-NNN foram observadas em microscópio óptico (400X) para avaliação de quantidade e motilidade dos protozoários. Foram transferidos 5mL da cultura para tubos de centrifugação, os quais foram centrifugados a 3 mil rpm (rotações por minuto) por 10min.

O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspenso com 5mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2, sendo homogeneizado em agitador por 10s. O tubo foi centrifugado a 3 mil rpm por 10min. Após a centrifugação, novamente foi descartado o sobrenadante, completando com 5mL de PBS pH 7,2 e homogeneizando no agitador por 10s. Foi feita mais uma centrifugação a 3 mil rpm por 10min, descartando o sobrenadante e homogeneizando em agitador por 10s.

Em microscopia (400X) foi visualizado a quantidade, em média, de 40 tripomastigotas por campo. Caso essa quantidade estivesse muito acima do ideal, o concentrado foi diluído e homogeneizado em 50µL de PBS pH 7,2, até obtenção da quantidade desejada. As lâminas de RIFI (foscas não lapidadas, Perfecta®, Brasil) são compostas de duas fileiras de seis cavidades. Todas as cavidades da lâmina de RIFI foram preenchidas com 10µL do concentrado de antígeno. Após três minutos de fixação do antígeno, o concentrado foi aspirado e as lâminas deixadas em temperatura ambiente por uma hora. Após sensibilização, foram guardadas em caixas porta-lâmina e armazenadas em freezer a -18 °C até serem utilizadas.

Um resumo ilustrativo do protocolo de sensibilização pode ser visto na FIGURA 11.

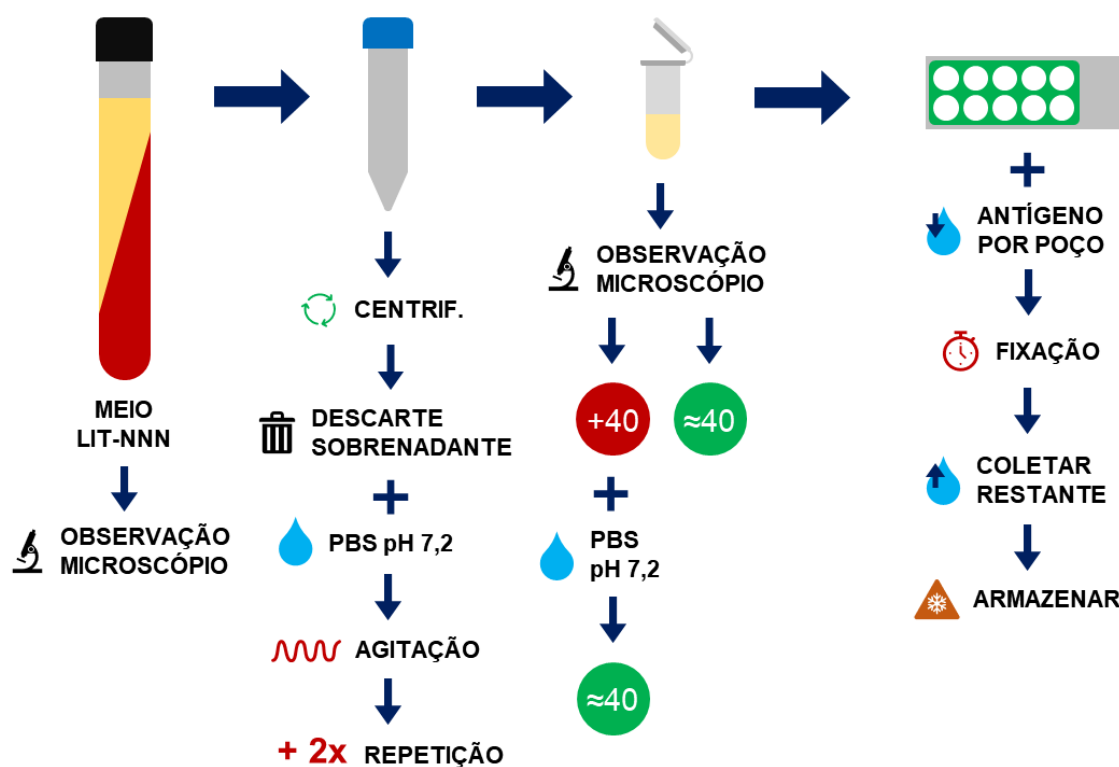


FIGURA 11: Principais etapas para sensibilização de lâminas para a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os volumes, tempo e velocidades de centrifugação estão disponíveis no texto.

ANEXO H - Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Para a realização da técnica de RIFI, foram utilizadas microplacas para a diluição inicial de 190µL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 e 10µL do soro das amostras para a diluição de 1:20 (primeira diluição), que foi utilizada na triagem da reação.

Foram distribuídos 10µL 1:20 nas lâminas já fixadas com o *Trypanosoma cruzi* (o método de sensibilização foi descrito no ANEXO G), sendo incubadas a 37 °C durante 30min em câmara úmida. Foram realizadas duas lavagens das lâminas com PBS pH 7,2 por 10min sendo, em seguida, secas em estufa.

Foram utilizados os conjugados específicos contendo anti-anticorpo IgG de macaco (IgG γ -chain specific, SAB3700765, Sigma-Aldrich®, USA) e anti-anticorpo IgG de humano (FITC) (Ferreira, 2019), diluído em solução de azul de Evans a 20%. Os conjugados foram testados e estabelecido 1:500 como ponto de diluição para IgG de macaco (Leite et al., 2008), o qual o controle positivo brilhou emitindo imunofluorescência no comprimento de onda 520nm (coloração verde), sendo ausente no negativo.

Foi distribuído 10µL do conjugado para cada diluição e incubou-se novamente em câmara úmida a 37 °C por 30min. Lavou-se novamente por duas vezes com PBS pH 7,2 por 10min e secas em estufa. As lâminas foram montadas utilizando-se glicerina tamponada pH 8,5 e cobertas com lamínulas de 24x60mm, sendo observadas em microscópio de imunofluorescência (400X).

Foi considerado positivo as amostras de soro com titulação igual a 20. As amostras de soros positivos nessa diluição foram submetidas a maiores diluições para se determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma* nos primatas.

Uma ilustração simplificando as principais etapas da RIFI está disponível na FIGURA 12.

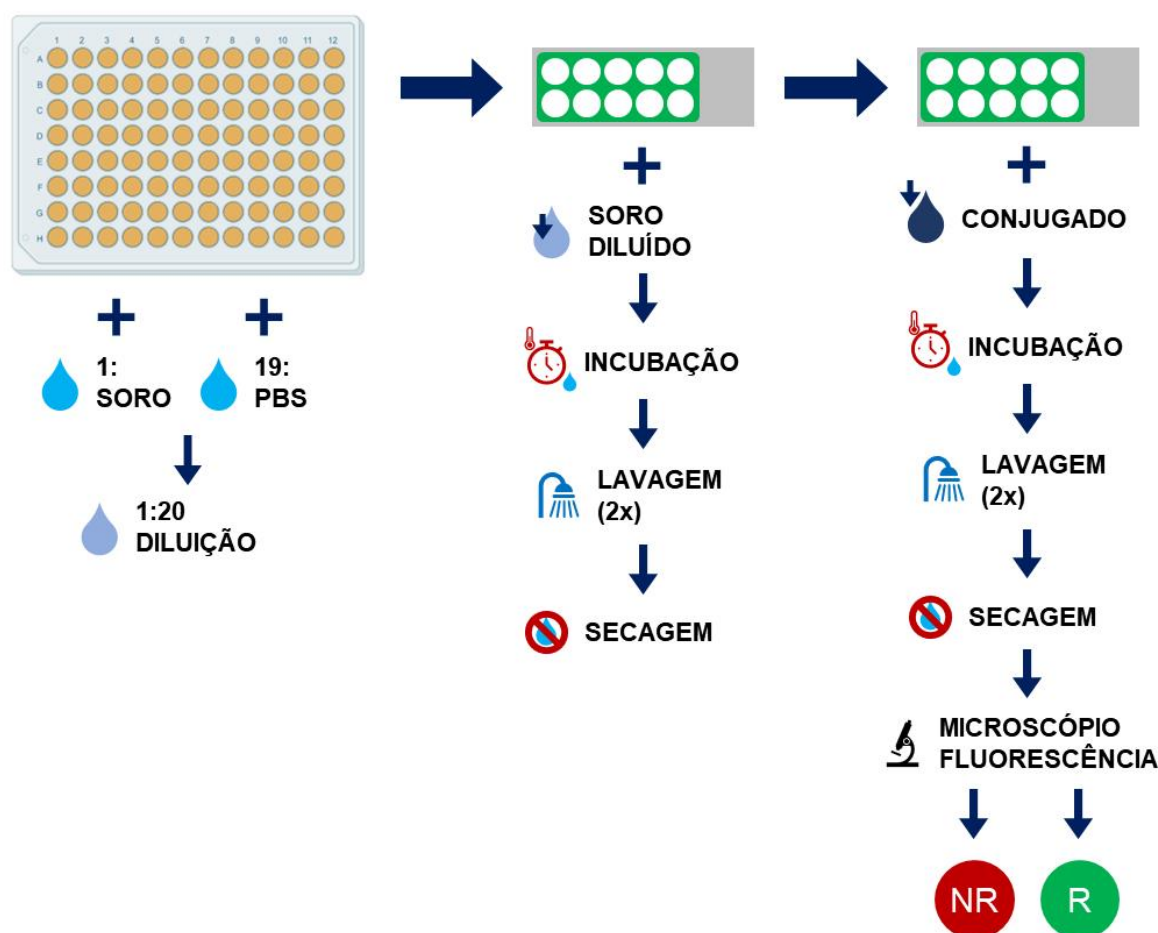


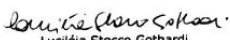
FIGURA 12: Principais etapas da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Ao final do processo, é possível determinar se o animal foi reagente (R) ou não reagente (NR) pela técnica. Volumes, tempo e temperaturas dos procedimentos da técnica estão disponíveis no texto.

Referências (ANEXO H):

Ferreira, SS. Infecção por *Trypanosoma* spp. em mamíferos cativos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, e em triatomíneos e pequenos mamíferos silvestres das áreas de mata do entorno. Dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz. 2019:128f.

Leite TNB, Maja TA, Ovando TM, Cantadori DT, Schimidt LR, Guércio AC, Cavalcanti A, Lopes FMR, Cunha IAL, Navarro IT. Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii* em macacos-prego (*Cebus apella*) de Campo Grande, MS. Rev Bras Parasitol Vet. 2008; 17(1):317-310.

ANEXO I - Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo (CEUA/FMB/Unesp).

unesp	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA	FACULDADE DE MEDICINA FMB BOTUCATU	CEUA ÉTICA
		Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012	
CERTIFICADO Nº 1213/2017-CEUA			
Certificamos que a proposta intitulada: “Pesquisa de Trypanosoma spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões do Brasil.”, registrada com o número 1213/2017, sob a responsabilidade do pesquisador Wesley José dos Santos – sob Orientação da Profa. Simone Baldini Lucheis – Coorientadora Virginia Bodelão Richini Pereira – Colaboradora Livia Maísa Guiraldi – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 05 de junho de 2019.			
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência da autorização	24 de março de 2020		
Espécie/Linhagem/Raça	Primata não-humano		
Nº de animais	02		
Idade/Peso	30-55 kg / adulto		
Sexo	Macho		
Origem	Biotério Central da UNESP - FMB		
 Luciléia Stocco Gotthardt Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		 Prof. Adjunto Guilherme Antônio Moreira de Barros Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br			

ANEXO J - Relatório de aprovação da pesquisa pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio Ambiente, Brasil (SISBIO/ICMBio/MMA).



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57382-3	Data da Emissão: 16/05/2019 10:56:35	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras	03/2017	12/2017
2	Exames moleculares	04/2017	02/2019
3	Exames sorológicos	04/2017	02/2018
4	Exames parasitológicos	04/2017	02/2018
5	Desenvolvimento do projeto	03/2017	07/2019

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Wesley José dos Santos	Realização da metodologia	352.114.338-40	Brasileira

Observações e ressalvas

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

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

Código de autenticação: 0573820320190516

Página 1/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57382-3	Data da Emissão: 16/05/2019 10:56:35	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro Nacional de Primatas	Ananindeua-PA	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
2	Parque Zoológico Getúlio Vargas	Salvador-BA	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Jardim Zoológico de Curitiba	Curitiba-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
4	Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros	Sorocaba-SP	Cerrado	Não	Fora de UC Federal
5	Zoológico de Brasília	Brasília-DF	Cerrado	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus midas	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus imperator	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus fuscicollis	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus bicolor	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saguinus niger	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saimiri sciureus	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saimiri boliviensis	-
9	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta seniculus	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta caraya	-
11	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta guariba	-
12	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aotus nigriceps	-
13	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aotus azarai	-
14	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aotus trivirgatus	-
15	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles paniscus	-
16	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles marginatus	-
17	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles chamek	-
18	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ateles belzebuth	-
19	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Brachyteles arachnoides	-
20	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callimico goeldii	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix penicillata	-
22	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix jacchus	-
23	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix geoffroyi	-
24	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callithrix aurita	-
25	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cebus olivaceus	-

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

Código de autenticação: 0573820320190516

Página 2/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57382-3	Data da Emissão: 16/05/2019 10:56:35	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
26	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cebus albifrons	-
27	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chlorocebus aethiops	-
28	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lagothrix lagotricha	-
29	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lagothrix cana	-
30	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Lemur catta	-
31	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Leontopithecus rosalia	-
32	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Leontopithecus chrysomelas	-
33	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Macaca fuscata	-
34	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mandrillus sphinx	-
35	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Pan troglodytes	-
36	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Papio hamadryas	-
37	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico argentatus	-
38	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico melanurus	-
39	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiropotes utahicki	-
40	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiropotes satanas	-
41	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus barbarabrownae	-
42	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus cupreus	-
43	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus coimbrai	-
44	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Saimiri collinsi	-
45	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico rondoni	-
46	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Chiropotes sagulatus	-
47	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Callicebus vieirai	-
48	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mico chrysoleucus	-
49	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus libidinosus	-
50	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus apella	-
51	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus xanthosternus	-
52	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus nigritus	-
53	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Sapajus flavius	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Primates)	Ectoparasita, Pêlo, Sangue, Outras amostras biológicas (Swab conjuntival), Ectoparasita, Sangue
2	Método de captura/coleta (Primates)	Puçá, Captura manual, Captura manual, Puçá

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

Código de autenticação: 0573820320190516

Página 3/5



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57382-3	Data da Emissão: 16/05/2019 10:56:35	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	Outro

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

Código de autenticação: 0573820320190516

Página 4/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57382-3	Data da Emissão: 16/05/2019 10:56:35	Data da Revalidação*: 16/05/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Nome da Instituição: Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CNCBIO).

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa n.º 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0573820320190516

Página 5/5

ANEXO K - Certificado de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas, vinculado à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, Brasil (CEUA/IEC/SVS/MS).

CEUA



CERTIFICADO nº 20/2019

Certificamos que a proposta intitulada “**Aplicação de diferentes técnicas diagnósticas para *Trypanosoma* spp. em primatas de cativeiro procedentes de cinco regiões do Brasil**”, registrada com o nº 13/2019, sob a responsabilidade de **Wesley José dos Santos**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

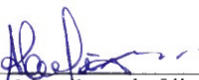
Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março de 2019 a agosto de 2020
Espécie/linhagem	<i>Sapajus</i> e/ou <i>Cebus</i> spp
Nº de animais	10
Peso/Idade	3Kg/adultos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	CENP

De acordo com Orientação Técnica nº 8, de 18 de março de 2016 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 06 de maio de 2019.


 Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
 CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS


 Thiago Vasconcelos dos Santos
 Vice Coordenador da CEUA

ANEXO L - Declaração de autorização de pesquisa pelo Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoo Salvador).

 **ZOO**
zoológico de salvador

GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA
SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS
INEMA - PARQUE ZOOBOTÂNICO GETÚLIO VARGAS

Salvador, 20 de abril de 2017

Declaração

Declaro, para fins e comprovação junto a Universidade Estadual Paulista- UNESP, que o projeto intitulado "**Aplicação de diferentes técnicas diagnósticas *Trypanosoma spp.* Em primatas de cativeiro precedentes de cinco regiões do Brasil**", desenvolvido pelo pesquisador Wesley José dos Santos, portador do CPF 352.114.338-40, foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para o desenvolvimento de projetos de pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito da instituição Parque Zoobotânico Getúlio Vargas PZBGV, autorizando-se, portanto o início das coletas nos animais em questão.

Vinicius Dantas
Coordenador Geral
Município de Salvador
CEM 0018-5
INEMA
Viniereis Dantas
Coordenador Geral
Zoológico de Salvador

1/1

ANEXO M - Declaração de autorização de pesquisa pela Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Zoo Brasília).



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE
FUNDAÇÃO JARDIM ZOOLOGICO DE BRASÍLIA
SUPERINTENDÊNCIA DE CONSERVAÇÃO E PESQUISA
DIRETORIA DE PESQUISA



DECLARAÇÃO

Declaro, para fins de comprovação junto a Universidade Estadual Paulista - UNESP, que o projeto intitulado *"Aplicação de diferentes técnicas diagnósticas Trypanosoma spp. em primatas de cativeiro precedentes de cinco regiões do Brasil"*, desenvolvido pelo pesquisador Wesley José dos Santos, portador do CPF nº352.114.338-40, foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para o desenvolvimento de Projetos de Pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito da Fundação Jardim Zoológico de Brasília – FJZB, autorizando-se, portanto o início das coletas nos animais-alvos a partir de 07 de março de 2017.

Brasília, 27 de outubro de 2015.


FRANCISCO JOSÉ FELJÓ PAIVA
Diretor de Pesquisa da FJZB
Matricula:80.059-7

ANEXO N - Declaração de autorização de pesquisa pelo Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zoo Sorocaba).



Secretaria de Meio Ambiente e Parques - Jardim



Sorocaba, 2 de março de 2017

Declaro que o projeto de doutorado "Pesquisa de *Trypanosoma* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões do Brasil, de Wesley José dos Santos", sob coordenação da Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis, recebeu autorização para ser realizado no Zoo de Sorocaba.

Atenciosamente,

Cecília Pessutti

Chefe de seção de Biologia e Veterinária

Zoo de Sorocaba

ANEXO O - Declaração de autorização de pesquisa pelo Parque Zoobotânico de Curitiba (Zoo Curitiba).



Prefeitura Municipal de Curitiba
Secretaria Municipal do Meio Ambiente
Rua Presidente Faria, s/nº Centro
80020-290 Curitiba PR
Tel 41 3350-9939 / 3350-8933 / 3350-9940
www.curitiba.pr.gov.br

DECLARAÇÃO

Declaro, para fins de comprovação junto a Universidade Estadual Paulista – UNESP, que o projeto intitulado **“Aplicação de diferentes técnicas diagnósticas *Trypanosoma* spp. em primatas de cativeiro precedentes de cinco regiões do Brasil”**, desenvolvido pelo pesquisador Wesley José dos Santos, portador do CPF 353.114.338-40, foi analisado e aprovado de acordo com as normas e diretrizes para desenvolvimento de Projetos de Pesquisa destinados ao aprofundamento do conhecimento científico e tecnológico no âmbito do Zoológico de Curitiba autorizando-se, portanto o início das coletas nos animais-alvos a partir de 07 de março de 2017.

Curitiba, 07 de março de 2017.

Márcia Arzua

Mat. 181.171

Diretora do Dep. de Pesquisa e Conservação da Fauna

Apêndices

Apêndices

APÊNDICE A - Relação dos PNH e a quantidade de animais coletados nos locais do estudo.

TABELA 7: relação dos primatas não-humanos (PNH) do estudo e a quantidade de animais coletados por zoológico ou centro de conservação.

Nome científico do PNH	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
<i>Alouatta belzebul</i>				2		2
<i>Alouatta caraya</i>		6	5	5		16
<i>Alouatta guariba</i>					4	4
<i>Alouatta seniculus</i>			3	3		6
<i>Alouatta sp.</i>			5			5
<i>Aotus nigriceps</i>			9			9
<i>Aotus trivirgatus</i>					2	2
<i>Ateles chamek</i>					3	8
<i>Ateles marginatus</i>	10	3		11		24
<i>Ateles paniscus</i>		4				4
<i>Brachyteles arachnoides</i>					4	4
<i>Callicebus cupreus</i>			2			2
<i>Callicebus vierai</i>					4	4
<i>Callithrix geoffroyi</i>			1			1
<i>Callithrix jacchus</i>					1	1
<i>Callithrix penicillata</i>			2		5	7
<i>Callithrix sp.</i>			1			1
<i>Cebus albifrons</i>			1			1
<i>Cebus olivaceus</i>					1	1
<i>Chiropotes satanas</i>			2			2
<i>Chiropotes utahicki</i>					1	1
<i>Lagothrix cana</i>			2			2
<i>Lagothrix lagotricha</i>		3				3
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>			3	3		6
<i>Leontopithecus rosalia</i>			1			1
<i>Lophocebus aterrimus</i>			1			1
<i>Mico chrysoleucus</i>			1			1
<i>Papio hamadryas</i>					2	2

<i>Saguinus bicolor</i>			2			2
<i>Saguinus imperator</i>			1			1
<i>Saguinus niger</i>			4			4
<i>Saimiri boliviensis</i>			1			1
<i>Saimiri sciureus</i>					1	1
<i>Sapajus apella</i>					3	3
<i>Sapajus flavius</i>		10				10
<i>Sapajus libidinosus</i>			2			2
<i>Sapajus nigritus</i>				2		2
<i>Sapajus xanthosternos</i>		28		2		30
Sem identificação*			8		1	9
Total	10	54	59	48	18	189

*: algumas amostras vieram sem identificação de espécie ou gênero e, devido a mudanças administrativas nos locais ao longo do tempo, não foi possível recuperar parte das informações sobre esses animais.

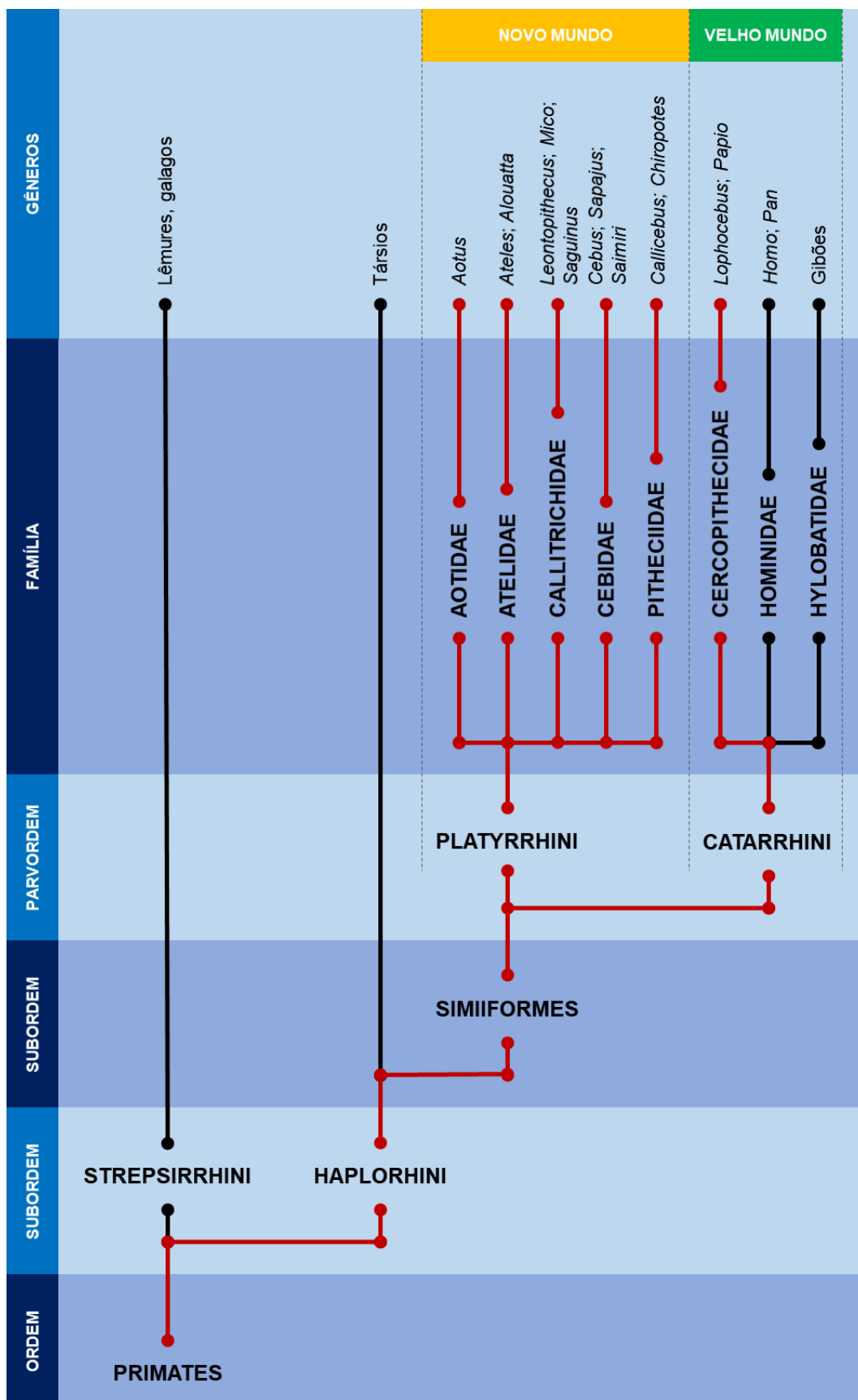


FIGURA 13: Classificação dos primatas. Alguns grupos e gêneros foram desconsiderados para facilitar a compreensão. As linhas em vermelho indicam que alguns animais dentro desses grupos foram amostrados em nosso trabalho.

APÊNDICE B - Registro fotográfico realizado durante visitas técnicas aos zoológicos do estudo entre 2016 a 2018.

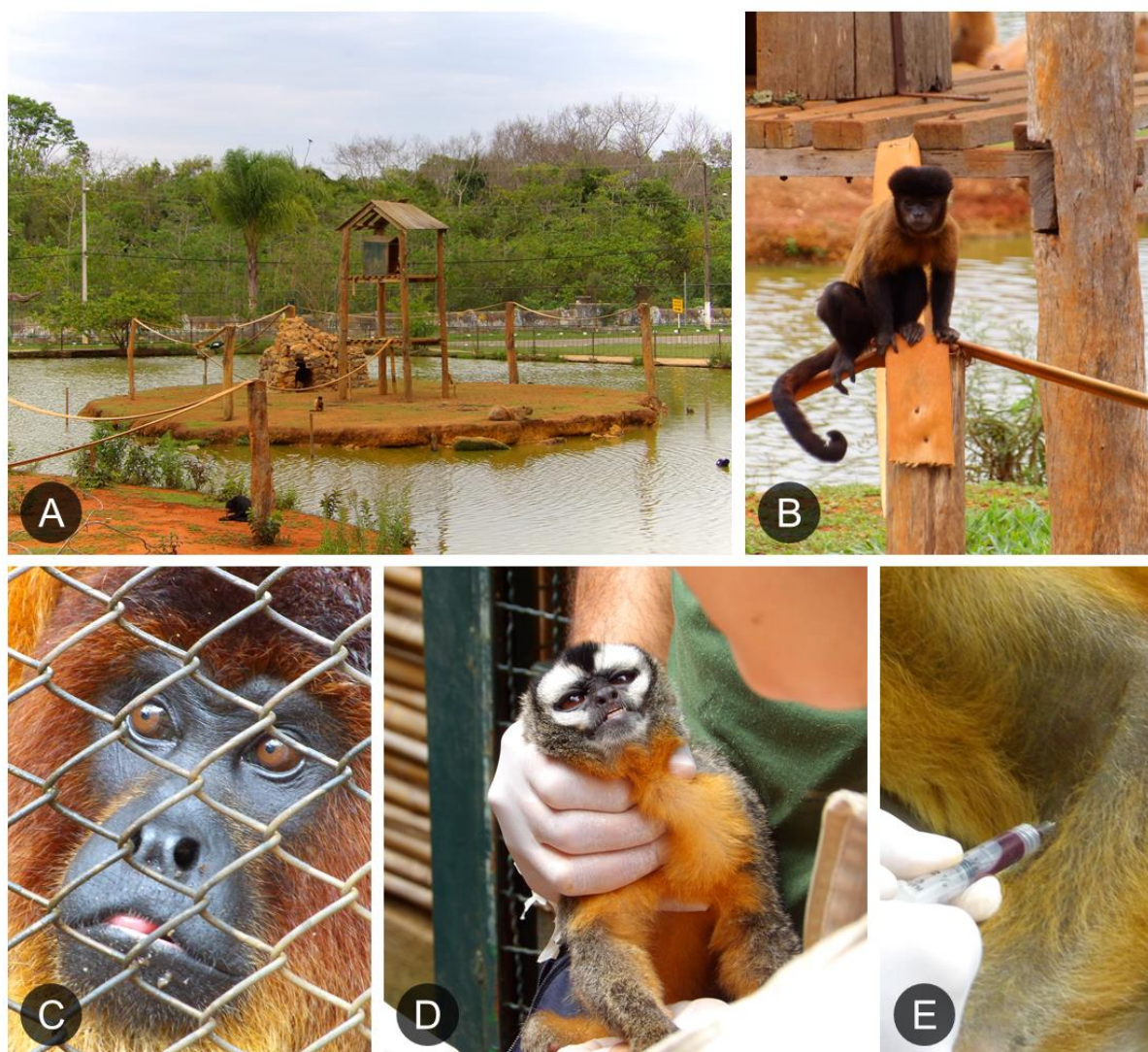


FIGURA 14: Zoo Brasília. (A), vista geral de um dos locais do Zoo Brasília, chamado de Ilha dos Primatas. Nesse espaço, alguns PNH pertencentes ao zoológico vivem livres. (B), *Sapajus libidinosus*, um dos habitantes da Ilha dos Primatas. (C), *Alouatta seniculus* em seu recinto no micário, outro espaço reservado aos PNH. (D), *Aotus nigriceps* durante contenção para coleta de amostra de sangue realizado pelo veterinário do zoológico. (E), coleta de sangue de um PNH por meio de punção venosa femoral.



FIGURA 15: Zoo Salvador. (A), vista geral da Ilha dos Primatas, onde alguns PNH vivem soltos. (B), visão de alguns recintos de PNH, os quais foram construídos 'túneis' a partir de projeções da própria tela que fecha o recinto, permitindo aos PNH ficarem próximos às árvores ao redor. (C) *Sapajus xanthosternus* se alimentando, vivendo na Ilha dos Primatas. (D), *Ateles paniscus* observando através das grades do recinto onde está alojado. (E), *Alouatta caraya* em seu recinto.



FIGURA 16: Zoo Sorocaba. (A), recinto de PNH neotropicais cobertos por tela antimosquito, uma medida adotada pelo zoológico durante o surto de febre amarela que atingiu o estado de São Paulo em 2018, período da visita. (B), *Sapajus nigritus*, observando através de uma abertura da tela antimosquito. (C), *Papio hamadryas*, PNH do Velho Mundo em seu recinto à céu aberto. (D), Ilha dos Primatas, onde os PNH vivem livremente. (E), micário coberto, destinado aos PNH de pequeno porte. (F), *Ateles marginatus* socializando na Ilha dos Primatas. (G), *Leontopithecus chrysomelas* observando os visitantes do micário.

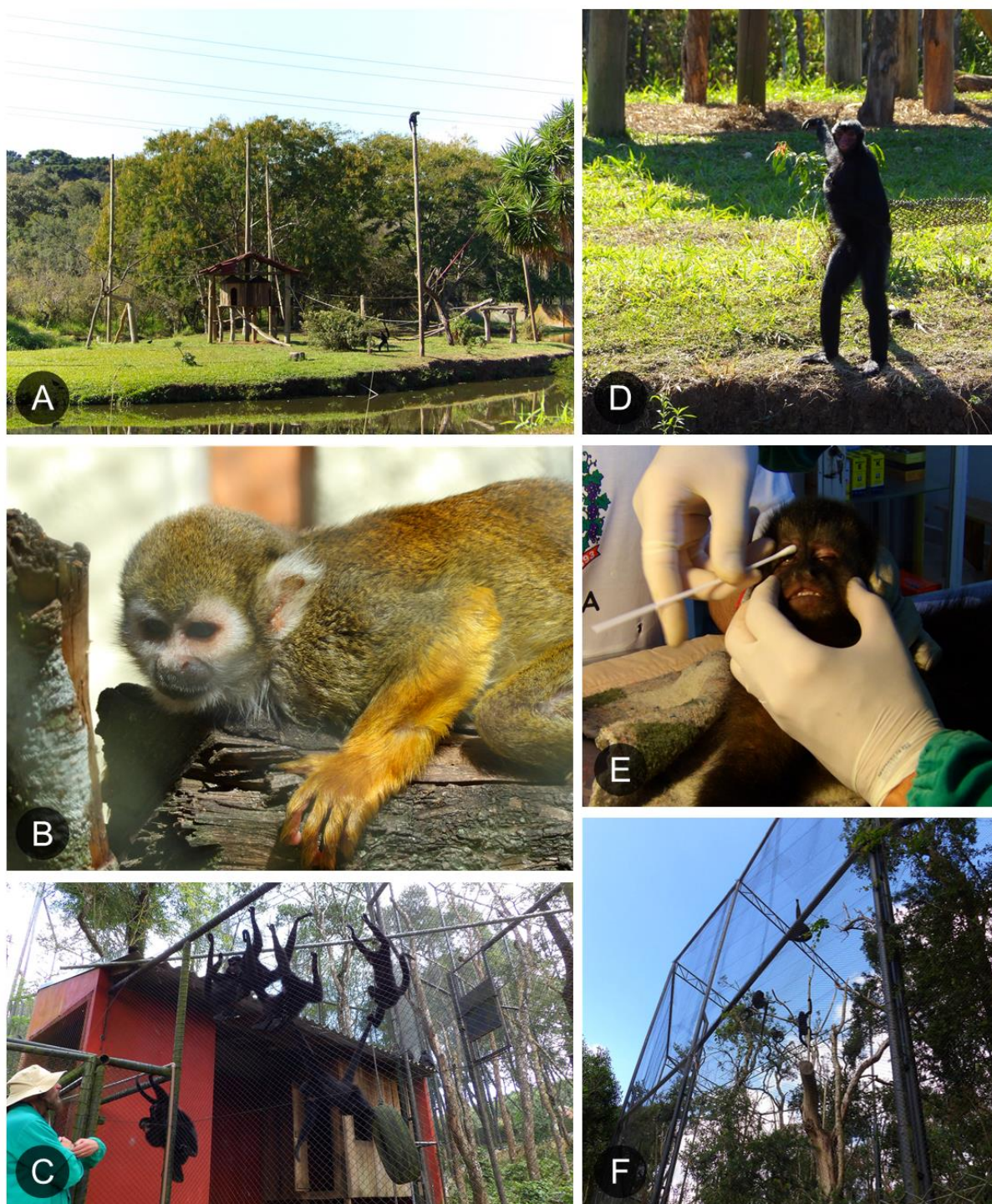


FIGURA 17: Zoo Curitiba. (A), vista da Ilha dos Primatas, local onde alguns PNH vivem livremente. (B) *Saimiri sciureus* em seu recinto em uma área do zoológico destinada aos pequenos PNH. (C), veterinário do Zoo Curitiba observa um grupo de *Ateles paniscus* em seu recinto. (D), *Ateles paniscus* que vive livremente na Ilha dos Primatas. (E), *Sapajus apella* durante procedimento de coleta de mucosa conjuntival por swab. (F), recinto de *Ateles paniscus*, o qual compreende parte de uma vegetação natural dentro do espaço.

APÊNDICE C - Tabelas detalhando os tipos de amostras biológicas recebidas por cada zoológico e centro de conservação do estudo.

TABELA 8: Resumo do número total de primatas não-humanos (PNH) e detalhamento do total de amostras de sangue total, soro, *swab* conjuntival e esfregaço sanguíneo de cada local.

Local	Número de PNH	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total de amostras
CENP	10	10	10	10	10	40
Zoo Salvador	54	53	53	47	53	206
Zoo Brasília	59	20	42	5	14	81
Zoo Sorocaba	48	48	44	47	46	185
Zoo Paraná	18	18	17	12	17	64
Total	189	149	166	121	140	576

TABELA 9: Detalhamento das amostras recebidas pelo Centro Nacional de Primatas (CENP), Ananindeua, Pará, com a descrição do primata não-humano (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.

Espécie	Amostra	Data de coleta	Data de recebimento	Sexo	Idade	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Ateles marginatus</i>										
	PA01	24/10/2019	05/11/2019	F	Juvenil	1	1	1	1	4
	PA02	24/10/2019	05/11/2019	M	Juvenil	1	1	1	1	4
	PA03	24/10/2019	05/11/2019	F	Juvenil	1	1	1	1	4
	PA04	24/10/2019	05/11/2019	F	Sub adulto	1	1	1	1	4
	PA05	24/10/2019	05/11/2019	M	Sub adulto	1	1	1	1	4
	PA06	24/10/2019	05/11/2019	M	Adulto	1	1	1	1	4
	PA07	24/10/2019	05/11/2019	F	Adulto	1	1	1	1	4
	PA08	24/10/2019	05/11/2019	M	Adulto	1	1	1	1	4
	PA09	24/10/2019	05/11/2019	F	Adulto	1	1	1	1	4
	PA10	24/10/2019	05/11/2019	M	Adulto	1	1	1	1	4
Total	10					10	10	10	10	40

Legenda: F = fêmea; M = macho.

TABELA 10: Detalhamento das amostras recebidas pelo Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoo Salvador), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.

Espécie	Amostra	Data de coleta	Data de recebimento	Sexo	Idade	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Alouatta caraya</i>										
	BA38	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	BA39	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
	BA40	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	BA41	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
	BA42	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	BA43	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
<i>Ateles marginatus</i>										
	BA51	09/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	BA52	09/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
	BA53	09/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	0	1	0	2
<i>Ateles paniscus</i>										
	BA47	09/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	BA48	09/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
	BA49	09/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
	BA50	09/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
<i>Lagothrix lagotricha</i>										
	BA44	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	BA45	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4

BA46	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
<i>Sapajus flavius</i>									
BA22	07/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA23	07/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA31	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA32	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA33	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA34	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA35	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA36	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA37	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA54	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	0	1	1	1	3
<i>Sapajus xanthosternos</i>									
BA01	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA02	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA03	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA04	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA05	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA06	08/08/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA07	08/08/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA08	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA09	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4

BA10	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA11	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA12	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA13	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA14	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA15	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA16	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA17	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA18	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA19	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	1	1	4
BA20	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA21	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	1	1	4
BA24	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	0	1	3
BA25	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	0	1	3
BA26	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	0	1	3
BA27	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	0	1	3
BA28	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	0	1	3
BA29	07/07/2017	11/08/2017	M	NI	1	1	0	1	3
BA30	07/07/2017	11/08/2017	F	NI	1	1	0	1	3
Total					53	53	47	53	206

Legenda: M = macho; F = fêmea; NI = não informado.

TABELA 11: Detalhamento das amostras recebidas pela Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Zoo Brasília), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.

Espécie	Amostra	Data de coleta	Data de recebimento	Sexo	Idade	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Alouatta sp</i>										
	DF45	NI	06/05/2019	NI	NI	1	0	0	0	1
	DF46	NI	06/05/2019	F	NI	1	0	0	1	2
	DF47	NI	06/05/2019	NI	NI	1	0	0	1	2
	DF56	27/03/2018	06/05/2019	M	NI	1	0	0	1	2
	DF59	28/03/2018	06/05/2019	NI	NI	1	0	0	1	2
<i>Alouatta belzebul</i>										
	DF17	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
	DF18	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
<i>Alouatta caraya</i>										
	DF22	08/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
	DF23	08/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
	DF24	08/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
	DF25	08/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
	DF35	10/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
<i>Alouatta seniculus</i>										
	DF19	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
	DF20	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
	DF21	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1

Aotus nigriceps

DF04	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
DF06	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF08	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF11	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF36	05/10/2016	21/06/2017	NI	NI	1	1	0	0	2
DF37	05/10/2016	21/06/2017	F	NI	1	0	1	0	2
DF41	05/10/2016	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
DF42	05/10/2016	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF43	05/10/2016	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1

Callicebus cupreus

DF03	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF38	05/10/2016	21/06/2017	F	NI	1	1	1	0	3

Callithrix sp.

DF15	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Callithrix geoffroyi

DF14	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Callithrix penicillata

DF07	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF16	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1

Cebus albifrons

DF30	09/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Chiropotes satanas

DF31	10/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
DF32	10/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1

Lagothrix cana

DF28	09/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
DF29	09/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1

Leontopithecus chrysomelas

DF10	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF12	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
DF40	05/10/2016	21/06/2017	NI	NI	1	1	1	0	3

Leontopithecus rosalia

DF13	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Lophocebus aterrimus

DF29	09/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Mico chrysoleucus

DF09	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Saguinus bicolor

DF53	NI	05/06/2019	NI	NI	1	0	0	1	2
DF54	NI	05/06/2019	F	NI	1	0	0	1	2

Saguinus imperator

DF01	07/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
------	------------	------------	---	----	---	---	---	---	---

Saguinus niger

166

DF02	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF05	07/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
DF39	05/10/2016	21/06/2017	F	NI	1	1	1	0	3
DF44	05/10/2016	21/06/2017	F	NI	0	0	1	0	1
<i>Saimiri boliviensis</i>									
DF26	09/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
<i>Sapajus libidinosus</i>									
DF33	10/03/2017	21/06/2017	M	NI	0	1	0	0	1
DF34	10/03/2017	21/06/2017	F	NI	0	1	0	0	1
Sem identificação									
DF48	27/03/2018	05/06/2019	NI	NI	1	0	0	1	2
DF49	28/03/2018	05/06/2019	M	NI	1	0	0	1	2
DF50	28/03/2018	05/06/2019	F	NI	1	0	0	1	2
DF51	28/03/2018	05/06/2019	M	NI	1	0	0	1	2
DF52	27/03/2018	05/06/2019	NI	NI	1	0	0	1	2
DF55	27/03/2018	05/06/2019	NI	NI	1	0	0	1	2
DF57	27/03/2018	05/06/2019	F	NI	1	0	0	1	2
DF58	28/03/2018	05/06/2019	F	NI	1	0	0	1	2
Total					20	42	5	14	81

Legenda: F = fêmea; M = macho; NI = não identificado.

TABELA 12: Detalhamento das amostras recebidas pelo Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Zoo Sorocaba), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.

Espécie	Amostra	Data de coleta	Data de recebimento	Sexo	Idade	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Alouatta caraya</i>										
	SP01	10/05/2017	30/05/2017	F	Juvenil	1	1	1	1	4
	SP02	10/05/2017	30/05/2017	M	Juvenil	1	1	1	1	4
	SP03	10/05/2017	30/05/2017	M	Juvenil	1	1	1	1	4
	SP04	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
	SP05	NI	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
<i>Alouatta guariba</i>										
	SP06	10/05/2017	30/05/2017	M	Adulto	1	1	1	1	4
	SP07	10/05/2017	31/05/2017	M	Juvenil	1	1	1	1	4
	SP08	10/05/2017	01/06/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
	SP09	10/05/2017	02/06/2017	F	Juvenil	1	1	1	1	4
<i>Alouatta seniculus</i>										
	SP25	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
	SP26	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
	SP45	07/12/2018	15/03/2019	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Aotus trivirgatus</i>										
	SP35	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
	SP36	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Ateles chamek</i>										
	SP10	10/05/2017	30/05/2017	M	Juvenil	1	1	1	1	4

SP11	10/05/2017	30/05/2017	F	Juvenil	1	1	1	1	4
SP27	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Ateles marginatus</i>									
SP12	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP13	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP14	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	0	1	1	3
SP15	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP16	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP17	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP18	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP28	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
SP29	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
SP30	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
SP31	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Brachyteles arachnoides</i>									
SP19	10/05/2017	30/05/2017	F	Juvenil	1	1	1	1	4
SP20	10/05/2017	30/05/2017	M	Adulto	1	1	1	1	4
SP21	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
SP22	10/05/2017	30/05/2017	M	Adulto	1	1	1	1	4
<i>Callicebus viera</i>									
SP34	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
SP46	07/12/2018	15/03/2019	NI	NI	1	1	1	1	4
SP47	07/12/2018	15/03/2019	NI	NI	1	1	1	1	4

SP48	07/12/2018	15/03/2019	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Callithrix jacchus</i>									
SP42	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Cebus olivaceus</i>									
SP24	10/05/2017	30/05/2017	F	Adulto	1	1	1	1	4
<i>Chiropotes utahicki</i>									
SP44	07/12/2018	15/03/2019	NI	NI	1	1	1	0	3
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>									
SP37	NI	11/04/2018	NI	NI	1	0	1	1	3
SP38	NI	11/04/2018	NI	NI	1	0	1	1	3
SP39	NI	11/04/2018	NI	NI	1	0	1	1	3
<i>Papio hamadryas</i>									
SP40	09/01/2018	11/04/2018	NI	NI	1	1	0	0	2
SP41	11/01/2018	11/04/2018	M	NI	1	1	1	1	4
<i>Sapajus nigritus</i>									
SP23	10/05/2017	30/05/2017	M	Sub adulto	1	1	1	1	4
SP43	07/12/2018	15/03/2019	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Sapajus xanthosternos</i>									
SP32	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
SP33	NI	11/04/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
Total	48				48	44	47	46	185

Legenda: M = macho; F = fêmea; NI = não identificado.

TABELA 13: Detalhamento das amostras recebidas pelo Parque Zoobotânico de Curitiba (Zoo Curitiba), com a descrição dos primatas não-humanos (PNH) e os tipos de amostras coletadas por primata.

Espécie	Amostra	Data de coleta	Data de recebimento	Sexo	Idade	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Ateles chamek</i>										
	PR01	08/02/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	0	1	3
	PR02	08/02/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	0	1	3
	PR03	08/02/2017	18/05/2017	F	NI	1	1	0	1	3
	PR04	08/02/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	0	1	3
	PR05	08/02/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	0	1	3
	PR06	08/02/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	0	1	3
	PR07	20/04/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	1	1	4
	PR08	20/04/2017	18/05/2017	M	NI	1	1	1	1	4
<i>Callithrix penicillata</i>										
	PR13	20/11/2017	04/06/2018	M	NI	1	0	1	0	2
	PR15	20/11/2017	04/06/2018	F	NI	1	1	1	1	4
	PR16	20/11/2017	04/06/2018	M	NI	1	1	1	1	4
	PR17	20/11/2017	04/06/2018	F	NI	1	1	1	1	4
	PR18	20/11/2017	04/06/2018	F	NI	1	1	1	1	4
<i>Saimiri sciureus</i>										
	PR12	23/05/2018	04/06/2018	NI	NI	1	1	1	1	4
<i>Sapajus apella</i>										
	PR09	23/05/2018	04/06/2018	NI	NI	1	1	1	1	4

										171	
	PR10	23/05/2018	04/06/2018		NI	NI	1	1	1	1	4
	PR11	23/05/2018	04/06/2018		NI	NI	1	1	1	1	4
Sem identificação											
	PR14	31/05/2017	04/06/2018		F	NI	1	1	1	1	4
Total	18						18	17	12	17	64

Legenda: F = fêmea; M = macho; NI = não identificado.

APÊNDICE D - Resultados de quantificação do DNA.

TABELA 14: Resumo dos resultados de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue dos primatas não-humanos (PNH), detalhando os valores obtidos, por local de estudo (em µg/mL).

Local	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba
Valor mínimo	7,4	29,5	11,3	-3,6	0,3
1º quartil	9,1	47,0	16,8	24,1	35,9
Mediana	11,2	61,0	22,5	43,3	41,8
3º quartil	12,5	83,5	39,6	63,6	58,6
Valor máximo	17,5	218,5	119,5	128,0	135,5
Média	11,3	71,7	35,4	45,6	48,1

Nota: a média refere-se aos valores totais de quantificação e não a partir do cálculo de quartis.

TABELA 15: Resumo dos resultados de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de *swab* conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) a partir de extração por kit comercial, detalhando os valores obtidos, por local de estudo (em µg/mL).

Local	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Paraná
Valor mínimo	-2,2	-2,3	-2,3	-4,8	-1,9
1º quartil	0,4	1,6	-1,6	-1,2	-1,3
Mediana	1,5	3,4	-1,6	6,8	0,3
3º quartil	5,7	5,7	-1,4	12,4	2,2
Valor máximo	15,0	18,0	-0,9	90,5	12,9
Média	4,1	4,1	-1,6	8,4	1,3

Nota: a média refere-se aos valores totais de quantificação e não a partir do cálculo de quartis.

TABELA 16: Resumo dos resultados de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de *swab* conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) a partir de extração por *salting out*, detalhando os valores obtidos, por local de estudo (em µg/mL).

Local	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Paraná
Valor mínimo	2,2	4	2,1	2	4,3
1º quartil	6,525	7,625	2,8	5,6	4,775
Mediana	8,4	12,2	5,6	6,8	6,55
3º quartil	9,4	17,5	5,7	9,6	12,475
Valor máximo	13,4	78	6,6	59,5	83
Média	8	14,9	4,5	10,1	14,6

Nota: a média refere-se aos valores totais de quantificação e não a partir do cálculo de quartis.

TABELA 17: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e *swab* conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Centro Nacional de Primatas (CENP). Os valores de DNA estão em µg/mL.

Espécie	Amostra	Sangue		Swab			
		Kit comercial		Kit comercial		<i>Salting out</i>	
		DNA	260/280*	DNA	260/280	DNA	260/280
<i>Ateles marginatus</i>							
	PA01	7,4	2,349	4	1,455	9,1	2,351
	PA02	8,2	1,874	1,2	1,211	2,2	5,375
	PA03	12	1,784	0,4	-0,583	9,1	3,291
	PA04	14,3	2,15	-2,2	1,229	7,2	3,405
	PA05	10,9	2,396	0,4	0,467	9,5	3,15
	PA06	12,7	1,801	15	1,429	9,5	2,676
	PA07	9	1,593	1,8	2,25	6	2,727
	PA08	17,5	1,331	14,1	1,584	6,3	2,203
	PA09	9,4	2,226	6,2	1,078	13,4	2,086
	PA10	11,4	1,629	0,5	1,286	7,7	2,369

Legenda: *: resultado do cálculo da relação 260/280 registrada pelo quantificador.

TABELA 18: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e *swab* conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador. Os valores de DNA estão em µg/mL.

Espécie	Amostra	Sangue		Swab			
		Kit comercial		Kit comercial		Salting out	
		DNA	260/280*	DNA	260/280	DNA	260/280
<i>Alouatta caraya</i>							
	BA38	124	1,81	1,3	-5,2	7	1,13
	BA39	29,5	1,439	0,6	-3	13,6	1,807
	BA40	116,5	1,688	1,2	0,321	5	2,041
	BA41	162	1,636	4,2	0,512	4	5,267
	BA42	218,5	1,836	4,7	0,939	15,8	1,909
	BA43	69,5	1,878	6,2	0,854	4,7	3,1
<i>Ateles marginatus</i>							
	BA51	45	1,957	3,3	0,844	10	2,031
	BA52	85	1,771	5,8	2,212	10,9	2,466
	BA53	69,5	1,829	7,7	1,262	30,5	1,694
<i>Ateles paniscus</i>							
	BA47	83,5	1,796	-2,3	10,8	18,5	1,602
	BA48	76,5	1,739	2,4	1,469	17,5	2,174
	BA49	54	1,662	2,9	2,478	17	2,222
	BA50	136,5	1,761	1,4	2,7	18,5	2,298
<i>Lagothrix lagotricha</i>							
	BA44	124	1,837	3,4	3,526	5,6	3,294
	BA45	64	1,753	6,4	5,292	5	3,448
	BA46	61	1,848	2,3	-46	6,9	4,152
<i>Sapajus flavius</i>							
	BA22	45	1,875	9,7	2,443	27	1,915
	BA23	38	1,81	3,4	1,214	23,5	1,709
	BA31	92,5	1,832	12,8	1,855	7,1	1,578
	BA32	41,5	1,976	3,5	2,029	7,7	1,692
	BA33	35,5	1,919	3,1	1,722	11,4	1,541
	BA34	88,5	1,806	2,2	1,406	14,3	2,072
	BA35	72,5	1,883	2,2	0,936	16,1	1,789
	BA36	47	1,918	4,7	1,08	7,6	1,434
	BA37	54,5	1,758	1,5	-2,417	26,5	1,97

Sapajus xanthosternos

BA01	69	1,704	0,1	0,2	25,5	1,214
BA02	42	1,826	-1,4	0,872	14,1	1,5
BA03	66,5	1,797	13,6	1,462	10,6	1,185
BA04	41	1,864	1,8	1,094	32,5	1,477
BA05	78,5	1,826	-1,4	1,556	6,6	1,65
BA06	60	1,846	0,9	0,548	7,9	1,411
BA07	38,5	1,833	3,6	2	17	2,048
BA08	45	1,875	-2,2	1,265	18	1,429
BA09	68,5	1,827	4,4	1,725	7,2	1,644
BA10	50,5	1,87	5,4	3,857	11,4	1,916
BA11	53,5	1,597	1,9	-9,25	13,5	1,582
BA12	94,5	1,75	0,4	-0,267	17,5	1,832
BA13	48	1,811	4,7	0,93	24,5	1,441
BA14	44,5	1,816	3,7	0,602	9,8	1,97
BA15	59,5	1,75	7	0,69	9,4	1,908
BA16	51	1,789	2,4	3	9,2	1,634
BA17	33,5	1,811	6,1	2,542	78	1,857
BA18	109,5	1,776	5,5	1,803	6,9	1,671
BA19	66,5	1,727	18	2,118	8,9	1,825
BA20	129,5	1,786	8,5	2,224	13	1,494
BA21	100,5	1,779	10,9	2,247	13,7	1,702
BA24	53	1,86				
BA25	47	1,774				
BA26	67,5	1,8				
BA27	81,5	1,753				
BA28	59,5	1,831				
BA29	48	1,882				
BA30	61	1,649				

Legenda: *: resultado do cálculo da relação 260/280 registrada pelo quantificador; | = amostra inexistente.

TABELA 19: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília. Os valores de DNA estão em µg/mL.

Espécie	Amostra	Sangue		Swab			
		Kit comercial		Kit comercial		Salting out	
		DNA	260/280*	DNA	260/280	DNA	260/280
<i>Alouatta</i> sp							
	DF45	31	1,944				
	DF46	39,5	1,681				
	DF47	48,5	1,796				
	DF56	17,5	1,768				
	DF59	22	1,76				
<i>Aotus nigriceps</i>							
	DF36	119,5	1,583				
	DF37	113,5	1,72	-0,9	-0,9	5,6	2,643
<i>Callicebus cupreus</i>							
	DF38	13,3	1,28	-1,4	5,4	6,6	2,4
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>							
	DF40	18,5	1,44	-2,3	1,586	2,8	7
<i>Saguinus bicolor</i>							
	DF53	13,7	1,877				
	DF54	23	1,909				
<i>Saguinus niger</i>							
	DF39	61	1,718	-1,6	3,556	5,7	8,071
	DF44			-1,6	2,667	2,1	3,818
Sem identificação							
	DF48	16,2	1,879				
	DF49	32	2,019				
	DF50	20	1,826				
	DF51	34	1,889				
	DF52	40	1,905				
	DF55	15,8	1,23				
	DF57	17	1,868				
	DF58	11,3	1,487				

Legenda: *: resultado do cálculo da relação 260/280 registrada pelo quantificador; | = amostra inexistente.

TABELA 20: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba. Os valores de DNA estão em µg/mL.

Espécie	Amostra	Sangue		Swab			
		Kit comercial		Kit comercial		Salting out	
		DNA	260/280*	DNA	260/280	DNA	260/280
<i>Alouatta caraya</i>							
	SP01	39	1,773	20	0,976	I	I
	SP02	-3,6	1,756	7,5	0,962	I	I
	SP03	47	1,808	8,3	1,122	11	1,667
	SP04	14,9	2,055	7,8	0,912	10,6	2,12
	SP05	54,5	1,817	11,3	1,766	5,6	2,113
<i>Alouatta guariba</i>							
	SP06	21,5	1,777	16,3	1,884	10	2,427
	SP07	27,5	1,792	7,5	2,709	6,3	3,405
	SP08	26,5	1,86	10,2	2,4	9,2	2,033
	SP09	36,5	1,872	6,8	2,894	6,7	2,078
<i>Alouatta seniculus</i>							
	SP25	86,5	1,73	1,4	-0,444	7,1	2,679
	SP26	95,5	1,819	13,4	2,327	8,3	2,306
	SP45	28	1,755	-1,4	1,556	6,6	1,871
<i>Aotus trivirgatus</i>							
	SP35	70,5	1,699	-2,7	0,9	2	5
	SP36	43,5	1,93	7,3	1,33	2,9	2,231
<i>Ateles chamek</i>							
	SP10	20	1,786	11,5	1,924	9,1	2,235
	SP11	4,4	1,706	8,7	3,053	6,2	3,049
	SP27	103	1,776	2,9	-2	12,8	1,969
<i>Ateles marginatus</i>							
	SP12	53	1,893	5,9	2,145	4,7	5,167
	SP13	25	1,724	3,6	-1,176	59,5	1,526
	SP14	31	1,676	13,7	1,07	3,3	9,286
	SP15	6,5	1,743	3,8	-3,304	4,6	5,75
	SP16	89	1,78	9,2	3,172	3,3	5,417
	SP17	14,9	1,923	22	1,991	8,9	2,419
	SP18	67,5	1,753	32,5	1,657	4,1	6,833

SP28	70	1,842	-2	1,323	6,1	2,75
SP29	128	1,829	-4,8	1,234	9,2	2,453
SP30	71,5	1,882	-2	1,147	5,6	2,435
SP31	64	1,91	-2,4	1	30,5	8,714
<i>Brachyteles arachnoides</i>						
SP19	63,5	1,693	21,5	2,15	6,7	1,956
SP20	53	1,86	90,5	1,645	7,8	3,229
SP21	63	1,853	13,2	1,796	6,2	4,731
SP22	34	1,889	18	2,293	7,7	2,081
<i>Callicebus viera</i>						
SP34	76,5	1,889	-1,5	0,64	13,7	1,864
SP46	19,5	1,45	0,7	0,636	5,7	1,852
SP47	55,5	1,79	-1	1,538	8,3	2,213
SP48	28,5	1,583	18	1,538	16,5	1,602
<i>Callithrix jacchus</i>						
SP42	59	1,873	-0,6	0,688	7,6	1,949
<i>Cebus olivaceus</i>						
SP24	20	1,81	16	1,641	10,6	2,304
<i>Chiropotes utahicki</i>						
SP44	3	1,176	-1,4	1,421	5,7	1,839
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>						
SP37	38	1,949	1,3	0,703	6,8	1,943
SP38	44	1,913	0,3	1,667	57,5	1,456
SP39	35,5	1,919	-2,2	1,387	5,8	2,578
<i>Papio hamadryas</i>						
SP40	19,5	2,203	I	I	I	I
SP41	52	1,819	-1,2	3,286	12,2	1,794
<i>Sapajus nigrus</i>						
SP23	89	1,798	10,8	2,455	4,6	3,957
SP43	1,4	0,692	-1,8	1,667	9,6	2,011
<i>Sapajus xanthosternos</i>						
SP32	43	1,81	-1,2	2,273	3,9	3,208
SP33	56	1,867	-1,6	2,667	5	2,152

Legenda: *: resultado do cálculo da relação 260/280 registrada pelo quantificador; I = amostra inexistente.

TABELA 21: Resultado de quantificação da extração de DNA a partir das amostras de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba. Os valores de DNA estão em µg/mL.

Espécie	Amostra	Sangue		Swab			
		Kit comercial		Kit comercial		Salting out	
		DNA	260/280*	DNA	260/280	DNA	260/280
<i>Ateles chamek</i>							
	PR01	17	1,417	I	I	I	I
	PR02	0,3	6	I	I	I	I
	PR03	60	1,791	I	I	I	I
	PR04	49	1,75	I	I	I	I
	PR05	59	1,844	I	I	I	I
	PR06	53	1,683	I	I	I	I
	PR07	135,5	1,673	-1,1	-5,25	7,9	2,093
	PR08	80	1,72	-1,7	0,872	17,5	1,628
<i>Callithrix penicillata</i>							
	PR13	67,5	1,534	2,6	0,911	4,7	2,089
	PR15	41,5	1,804	2	0,414	9,8	1,434
	PR16	57,5	1,797	-0,2	-0,8	4,8	2,824
	PR17	22,5	2,064	-1,5	2	4,6	2,022
	PR18	38,5	1,925	1,5	1,706	5,2	2,08
<i>Saimiri sciureus</i>							
	PR12	42	1,68	0,7	0,394	4,3	3,44
<i>Sapajus apella</i>							
	PR09	35,5	1,69	-1,2	3	10,8	2,028
	PR10	39,5	1,756	3,4	0,944	83	1,785
	PR11	37	1,574	-1,9	9,25	22	1,913
Sem identificação							
	PR14	31	1,722	12,9	1,107	4,9	3,031

Legenda: *: resultado do cálculo da relação 260/280 registrada pelo quantificador; I = amostra inexistente.

APÊNDICE E - Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir da extração de DNA de sangue total.

TABELA 22: Total de primatas não-humanos (PNH) amostrados no estudo e número de animais que apresentaram amostras biológicas amplificadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

	Amostras	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/ TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos	Relação (em %)*
CENP	10	10	0	10	6	4	30	20	10	100,0
Zoo Salvador	53	53	0	2	1	7	63	10	7	13,2
Zoo Brasília	20	20	0	14	5	3	42	22	15	75,0
Zoo Sorocaba	48	48	0	3	8	0	59	11	9	18,8
Zoo Curitiba	18	18	0	7	1	0	26	8	8	44,4
Total	149	149	0	36	21	14	220***	71	49	
Relação (em %)**		100,0	0,0	24,2	14,1	9,4			32,9	

Nota: afim de esclarecer a quantidade de animais cujas amostras biológicas amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração. Os PNH positivos únicos, cujas amostras amplificaram para um ou mais *primers* do estudo (exceto $\beta 1/\beta 2$) estão descritos na tabela na penúltima coluna (ao lado dos valores totais, excetuando $\beta 1/\beta 2$). Legenda: *: relação (em %), da quantidade de PNH únicos positivos por qualquer uma dos *primers* utilizados (exceto $\beta 1/\beta 2$) pelo total de PNH coletados no zoológico ou centro de conservação; **: relação (em %), do total de PNH positivos por *primer* pelo total de PNH coletados de todos os zoológicos e centro de conservação; ***: total de amostras positivas por todas os *primers* utilizados, em todas as rodadas de reações. Assim, são 220 de 745 reações que amplificaram (29,5%).

TABELA 23: Resumo dos resultados comparando a amplificação por mais de um alvo de interesse. Os números apontam para amplificação de amostras biológicas para o mesmo primata não-humano (PNH) em dois ou três conjuntos de *primers*. Os demais PNH apresentaram amplificação de amostras apenas para um conjunto de *primers*.

Local	Primers em comparação (Nº de amplificações de ambos)			
	121/122+hsp70 (57)	121/122+SSU561 (50)	hsp70+SSU561 (35)	121/122+hsp70+ SSU561 (71)
CENP	6	4	3	3
Zoo Salvador	0	2	1	0
Zoo Brasília	4	3	1	1
Zoo Sorocaba	2	0	0	0
Zoo Curitiba	0	0	0	0
Total	12	9	5	4
Relação (em %)*	21,1	18,0	14,3	5,6

Legenda: *: relação, em porcentagem, em relação ao total de amostras positivas para o mesmo conjunto em análise. Assim, dos 57 PNH que amplificaram usando os *primers* 121/122 e gene hsp70, 12 refere-se ao mesmo PNH, ou 21,1%.

TABELA 24: Relação de todos os primatas não-humanos (PNH) positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase a partir de amostras de sangue extraídas. Foram excluídos todos os demais PNH que, ou não continham sangue total para a técnica ou cujas amostras biológicas não amplificaram para nenhum conjunto de *primers* (exceto $\beta 1/\beta 2$).

Nome científico do PNH	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
<i>Alouatta caraya</i>		1		3		4
<i>Alouatta guariba</i>				3		3
<i>Alouatta sp.</i>			3			3
<i>Aotus nigriceps</i>			2			2
<i>Ateles chamek</i>				2	7	9
<i>Ateles marginatus</i>	10	0		0		10
<i>Ateles paniscus</i>		1				1
<i>Brachyteles arachnoides</i>				1		1
<i>Callicebus cupreus</i>			1			1
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>			1	0		1
<i>Saguinus bicolor</i>			2			2
<i>Saguinus niger</i>			1			1
<i>Sapajus apella</i>					1	1
<i>Sapajus flavius</i>		1				1
<i>Sapajus xanthosternos</i>		4				4
Sem identificação			5		0	5
Total	10	7	15	9	8	49

TABELA 25: Total de primatas não-humanos (PNH) do Centro de Conservação de Primatas (CENP) amostrados e número de amostras de sangue de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Ateles marginatus</i>									
	PA01	1	0	1	0	0	2	1	1
	PA02	1	0	1	1	1	4	3	1
	PA03	1	0	1	1	1	4	3	1
	PA04	1	0	1	1	1	4	3	1
	PA05	1	0	1	0	1	3	2	1
	PA06	1	0	1	1	0	3	2	1
	PA07	1	0	1	0	0	2	1	1
	PA08	1	0	1	1	0	3	2	1
	PA09	1	0	1	0	0	2	1	1
	PA10	1	0	1	1	0	3	2	1
Total	10	10	0	10	6	4			10

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras de sangue que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 26: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Alouatta caraya</i>									
	BA38	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA39	1	0	0	0	1	2	1	1
	BA40	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA41	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA42	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA43	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ateles marginatus</i>									
	BA51	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA52	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA53	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ateles paniscus</i>									
	BA47	1	0	0	0	1	2	1	1
	BA48	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA49	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA50	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Lagothrix lagotricha</i>									
	BA44	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA45	1	0	0	0	0	1	0	0

BA46	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Sapajus flavius</i>								
BA22	1	0	0	0	0	1	0	0
BA23	1	0	0	0	0	1	0	0
BA31	1	0	0	0	0	1	0	0
BA32	1	0	0	0	0	1	0	0
BA33	1	0	0	0	0	1	0	0
BA34	1	0	0	0	0	1	0	0
BA35	1	0	0	0	0	1	0	0
BA36	1	0	0	0	0	1	0	0
BA37	1	0	0	1	1	3	2	1
<i>Sapajus xanthosternos</i>								
BA01	1	0	0	0	0	1	0	0
BA02	1	0	0	0	0	1	0	0
BA03	1	0	0	0	0	1	0	0
BA04	1	0	0	0	0	1	0	0
BA05	1	0	0	0	0	1	0	0
BA06	1	0	0	0	0	1	0	0
BA07	1	0	1	0	1	3	2	1
BA08	1	0	0	0	0	1	0	0
BA09	1	0	0	0	0	1	0	0
BA10	1	0	0	0	0	1	0	0

BA11	1	0	0	0	1	2	1	1
BA12	1	0	0	0	0	1	0	0
BA13	1	0	0	0	0	1	0	0
BA14	1	0	0	0	1	2	1	1
BA15	1	0	1	0	1	3	2	1
BA16	1	0	0	0	0	1	0	0
BA17	1	0	0	0	0	1	0	0
BA18	1	0	0	0	0	1	0	0
BA19	1	0	0	0	0	1	0	0
BA20	1	0	0	0	0	1	0	0
BA21	1	0	0	0	0	1	0	0
BA24	1	0	0	0	0	1	0	0
BA25	1	0	0	0	0	1	0	0
BA26	1	0	0	0	0	1	0	0
BA27	1	0	0	0	0	1	0	0
BA28	1	0	0	0	0	1	0	0
BA29	1	0	0	0	0	1	0	0
BA30	1	0	0	0	0	1	0	0
Total	53	53	0	2	1	7		7

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras de sangue que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

Espécie	Amostra	β1/β2	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto β1/β2)	PNH positivos
<i>Alouatta sp</i>									
	DF45	1	0	1	0	1	3	2	1
	DF46	1	0	0	1	0	2	1	1
	DF47	1	0	0	0	0	1	0	0
	DF56	1	0	1	0	0	2	1	1
	DF59	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Aotus nigriceps</i>									
	DF36	1	0	1	1	0	3	2	1
	DF37	1	0	1	0	0	2	1	1
<i>Callicebus cupreus</i>									
	DF38	1	0	1	1	0	3	2	1
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>									
	DF40	1	0	1	0	0	2	1	1
<i>Saguinus bicolor</i>									
	DF53	1	0	1	0	1	3	2	1
	DF54	1	0	1	1	1	4	3	1
<i>Saguinus niger</i>									
	DF39	1	0	1	1	0	3	2	1
Sem identificação									

188

DF48	1	0	1	0	0	2	1	1
DF49	1	0	0	0	0	1	0	0
DF50	1	0	0	0	0	1	0	0
DF51	1	0	1	0	0	2	1	1
DF52	1	0	1	0	0	2	1	1
DF55	1	0	1	0	0	2	1	1
DF57	1	0	0	0	0	1	0	0
DF58	1	0	1	0	0	2	1	1
Total	20	20	0	14	5	3		15

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras de sangue que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 28: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Alouatta caraya</i>									
	SP01	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP02	1	0	1	0	0	2	1	1
	SP03	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP04	1	0	0	1	0	2	1	1
	SP05	1	0	0	1	0	2	1	1
<i>Alouatta guariba</i>									
	SP06	1	0	0	1	0	2	1	1
	SP07	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP08	1	0	0	1	0	2	1	1
	SP09	1	0	1	1	0	3	2	1
<i>Alouatta seniculus</i>									
	SP25	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP26	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP45	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Aotus trivirgatus</i>									
	SP35	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP36	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ateles chamek</i>									
	SP10	1	0	1	1	0	3	2	1

SP11	1	0	0	1	0	2	1	1
SP27	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ateles marginatus</i>								
SP12	1	0	0	0	0	1	0	0
SP13	1	0	0	0	0	1	0	0
SP14	1	0	0	0	0	1	0	0
SP15	1	0	0	0	0	1	0	0
SP16	1	0	0	0	0	1	0	0
SP17	1	0	0	0	0	1	0	0
SP18	1	0	0	0	0	1	0	0
SP28	1	0	0	0	0	1	0	0
SP29	1	0	0	0	0	1	0	0
SP30	1	0	0	0	0	1	0	0
SP31	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>								
SP19	1	0	0	0	0	1	0	0
SP20	1	0	0	0	0	1	0	0
SP21	1	0	0	1	0	2	1	1
SP22	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Callicebus vierai</i>								
SP34	1	0	0	0	0	1	0	0
SP46	1	0	0	0	0	1	0	0
SP47	1	0	0	0	0	1	0	0

									191
	SP48	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Callithrix jacchus</i>									
	SP42	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Cebus olivaceus</i>									
	SP24	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Chiropotes utahicki</i>									
	SP44	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>									
	SP37	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP38	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP39	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Papio hamadryas</i>									
	SP40	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP41	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Sapajus nigritus</i>									
	SP23	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP43	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Sapajus xanthosternos</i>									
	SP32	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP33	1	0	0	0	0	1	0	0
Total	48	48	0	3	8	0			9

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras de sangue que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 29: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba amostrados e número de amostras de sangue dos animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Ateles chamek</i>									
	PR01	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR02	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR03	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR04	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR05	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR06	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR07	1	0	1	0	0	2	1	1
	PR08	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Callithrix penicillata</i>									
	PR13	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR15	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR16	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR17	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR18	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Saimiri sciureus</i>									
	PR12	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Sapajus apella</i>									
	PR09	1	0	0	0	0	1	0	0

									193
	PR10	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR11	1	0	0	1	0	2	1	1
Sem identificação									
	PR14	1	0	0	0	0	1	0	0
Total	18	18	0	7	1	0			8

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras de sangue que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

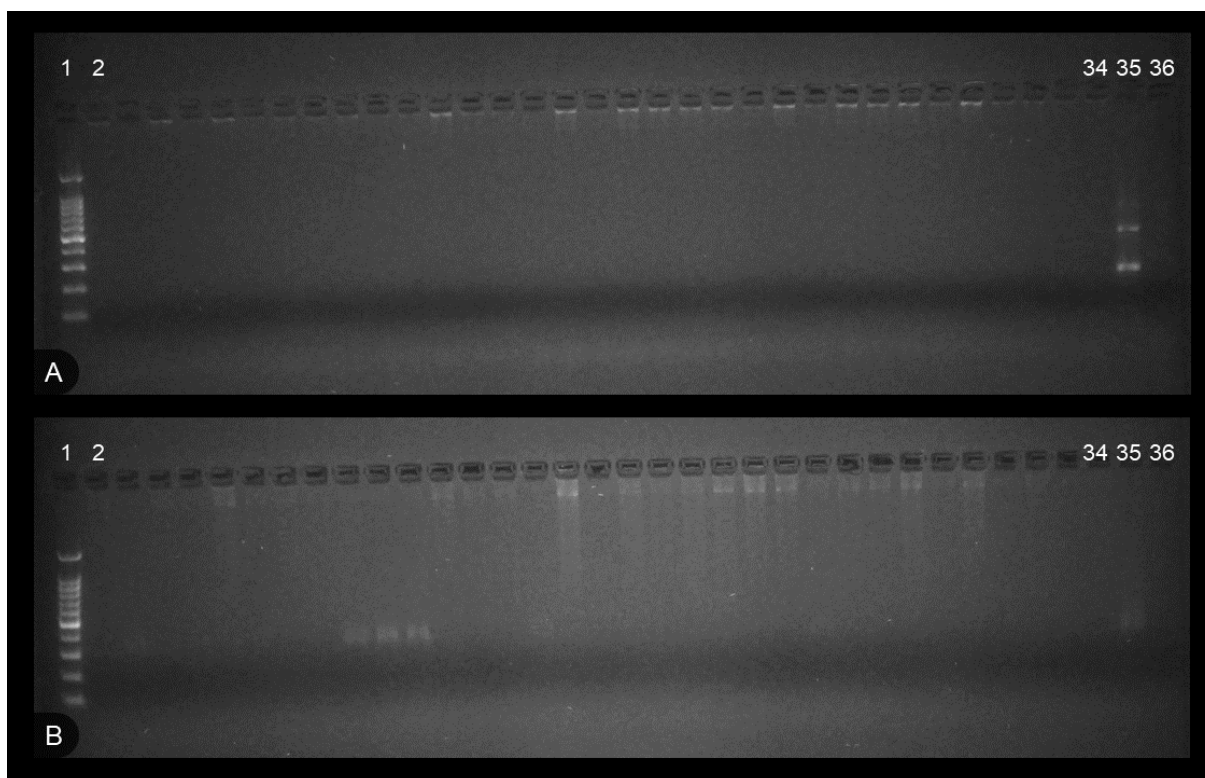


FIGURA 18: Géis com corrida eletroforética comparando *primers* que amplificam minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi*. (1), marcador de peso molecular de 100pb; (2-34), amostras do Zoo Sorocaba, de SP01 até SP33; (35), controle positivo contendo *amplicons* de *T. cruzi*; (36), controle negativo com água ultrapura. (A), resultado da corrida eletroforética para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2. (B), utilizando *primers* 121/122.



FIGURA 19: Géis com corrida eletroforética comparando *primers* que amplificam genes conservados em tripanosomatídeos (1), marcador de peso molecular de 100pb; (2-22), amostras do Zoo Sorocaba e Zoo Brasília; (23-24), controles positivos contendo *amplicons* de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente; (25), controle negativo com água ultrapura; (26), linha vazia. (A), resultado da corrida eletroforética para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* hsp70. (B), utilizando *primers* SSU561.

APÊNDICE F - Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir da extração de DNA de *swab* conjuntival.

TABELA 30: Total de primatas não-humanos (PNH) amostrados no estudo e número de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

	Amostras	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/ TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos	Relação (em %)*
CENP	10	9	0	10	0	6	25	16	10	100,0
Zoo Salvador	46	33	0	11	5	1	50	17	15	32,6
Zoo Brasília	5	5	1	1	0	0	7	2	2	40,0
Zoo Sorocaba	45	37	0	9	1	0	47	10	10	22,2
Zoo Curitiba	12	7	0	2	1	1	11	4	4	33,3
Total	118	91	1	33	7	8	140***	49	41	
Relação (em %)**		77,1	0,8	28,0	5,9	6,8			34,7	

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração. Os PNH positivos únicos que amplificaram para um ou mais *primers* do estudo (exceto $\beta 1/\beta 2$) estão descritos na tabela na penúltima coluna (ao lado dos valores totais, excetuando $\beta 1/\beta 2$). Legenda: *: relação (em %), da quantidade de PNH únicos positivos por qualquer uma dos *primers* utilizados (exceto $\beta 1/\beta 2$) pelo total de PNH coletados no zoológico ou centro de conservação; **: relação (em %), do total de PNH positivos por *primer* pelo total de PNH coletados de todos os zoológicos e centro de conservação; ***: total de amostras positivas por todos os *primers* utilizados, em todas as rodadas de reações. Assim, são 140 de 590 reações que amplificaram (23,7%).

TABELA 31: Relação de todos os primatas não-humanos (PNH) positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase a partir de amostras de *swabs* conjuntivais extraídas pelo método de *salting out*. Foram excluídos todos os demais PNH que, ou não continham *swab* conjuntival coletado para a técnica ou cujas amostras não amplificaram para nenhum conjunto de *primers* (exceto $\beta 1/\beta 2$).

Nome científico do PNH	CENP	Zoo Salvador	Zoo Brasília	Zoo Sorocaba	Zoo Curitiba	Total
<i>Alouatta caraya</i>		1		2		3
<i>Alouatta seniculus</i>				1		1
<i>Ateles chamek</i>				1	1	2
<i>Ateles marginatus</i>	10			4		14
<i>Brachyteles arachnoides</i>				2		2
<i>Callithrix penicillata</i>					1	1
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>			1			1
<i>Saguinus niger</i>			1			1
<i>Sapajus apella</i>					1	1
<i>Sapajus flavius</i>		5				5
<i>Sapajus xanthosternos</i>		9				9
Sem identificação					1	1
Total	10	15	2	10	4	41

TABELA 32: Total de primatas não-humanos (PNH) do Centro de Conservação de Primatas (CENP) amostrados e número de amostras de *swab* conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Ateles marginatus</i>									
	PA01	1	0	1	0	0	2	1	1
	PA02	1	0	1	0	1	3	2	1
	PA03	1	0	1	0	1	3	2	1
	PA04	1	0	1	0	1	3	2	1
	PA05	1	0	1	0	1	3	2	1
	PA06	1	0	1	0	0	2	1	1
	PA07	1	0	1	0	0	2	1	1
	PA08	0	0	1	0	1	2	2	1
	PA09	1	0	1	0	1	3	2	1
	PA10	1	0	1	0	0	2	1	1
Total	10	9	0	10	0	6			10

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 33: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador amostrados e número de amostras de *swab* conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Alouatta caraya</i>									
	BA38	0	0	0	0	0	0	0	0
	BA39	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA40	0	0	1	0	0	1	1	1
	BA41	0	0	0	0	0	0	0	0
	BA42	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA43	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ateles marginatus</i>									
	BA51	0	0	0	0	0	0	0	0
	BA52	0	0	0	0	0	0	0	0
	BA53	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ateles paniscus</i>									
	BA47	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA48	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA49	0	0	0	0	0	0	0	0
	BA50	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Lagothrix lagotricha</i>									
	BA44	1	0	0	0	0	1	0	0
	BA45	0	0	0	0	0	0	0	0

BA46	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sapajus flavius</i>								
BA22	1	0	0	0	0	1	0	0
BA23	1	0	0	0	0	1	0	0
BA31	1	0	0	1	0	2	1	1
BA32	1	0	1	0	0	2	1	1
BA33	1	0	1	1	0	3	2	1
BA34	1	0	0	0	0	1	0	0
BA35	1	0	1	1	0	3	2	1
BA36	1	0	0	0	0	1	0	0
BA37	1	0	0	1	0	2	1	1
<i>Sapajus xanthosternos</i>								
BA01	1	0	0	0	0	1	0	0
BA02	1	0	0	0	0	1	0	0
BA03	0	0	0	0	0	0	0	0
BA04	1	0	1	0	0	2	1	1
BA05	1	0	0	0	0	1	0	0
BA06	0	0	0	0	0	0	0	0
BA07	1	0	0	0	1	2	1	1
BA08	1	0	1	0	0	2	1	1
BA09	1	0	1	0	0	2	1	1
BA10	1	0	0	0	0	1	0	0

BA11	1	0	0	0	0	1	0	0
BA12	1	0	0	0	0	1	0	0
BA13	1	0	0	0	0	1	0	0
BA14	1	0	0	0	0	1	0	0
BA15	0	0	0	1	0	1	1	1
BA16	1	0	1	0	0	2	1	1
BA17	1	0	0	0	0	1	0	0
BA18	0	0	1	0	0	1	1	1
BA19	1	0	1	0	0	2	1	1
BA20	1	0	0	0	0	1	0	0
BA21	1	0	1	0	0	2	1	1
Total	46	33	0	11	5	1		15

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 34: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília amostrados e número de amostras de *swab* conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Aotus nigriceps</i>									
	DF37	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Callicebus cupreus</i>									
	DF38	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>									
	DF40	1	0	1	0	0	2	1	1
<i>Saguinus niger</i>									
	DF39	1	1	0	0	0	2	1	1
	DF44	1	0	0	0	0	1	0	0
Total	5	5	1	1	0	0			2

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 35: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba amostrados e número de amostras de *swab* conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Alouatta caraya</i>									
	SP03	1	0	1	0	0	2	1	1
	SP04	1	0	1	0	0	2	1	1
	SP05	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alouatta guariba</i>									
	SP06	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP07	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP08	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP09	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Alouatta seniculus</i>									
	SP25	1	0	1	0	0	2	1	1
	SP26	1	0	0	0	0	1	0	0
	SP45	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aotus trivirgatus</i>									
	SP35	0	0	0	0	0	0	0	0
	SP36	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ateles chamek</i>									
	SP10	1	0	1	0	0	2	1	1
	SP11	1	0	0	0	0	1	0	0

SP27	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ateles marginatus</i>								
SP12	1	0	0	0	0	1	0	0
SP13	1	0	0	0	0	1	0	0
SP14	1	0	0	0	0	1	0	0
SP15	1	0	1	0	0	2	1	1
SP16	1	0	0	0	0	1	0	0
SP17	0	0	1	0	0	1	1	1
SP18	1	0	1	0	0	2	1	1
SP28	1	0	0	0	0	1	0	0
SP29	1	0	1	0	0	2	1	1
SP30	1	0	0	0	0	1	0	0
SP31	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>								
SP19	1	0	0	0	0	1	0	0
SP20	1	0	0	0	0	1	0	0
SP21	1	0	0	1	0	2	1	1
SP22	1	0	1	0	0	2	1	1
<i>Callicebus viera</i>								
SP34	1	0	0	0	0	1	0	0
SP46	1	0	0	0	0	1	0	0
SP47	1	0	0	0	0	1	0	0

									205
SP48	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Callithrix jacchus</i>							0	0	
SP42	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Cebus olivaceus</i>									
SP24	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Chiropotes utahicki</i>									
SP44	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>									
SP37	1	0	0	0	0	1	0	0	
SP38	0	0	0	0	0	0	0	0	
SP39	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Papio hamadryas</i>									
SP41	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Sapajus nigritus</i>									
SP23	1	0	0	0	0	1	0	0	
SP43	1	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Sapajus xanthosternos</i>									
SP32	1	0	0	0	0	1	0	0	
SP33	1	0	0	0	0	1	0	0	
Total	45	37	0	9	1	0		10	

Nota: afim de esclarecer a quantidade de amostras que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

TABELA 36: Total de primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba amostrados e número de amostras de *swab* conjuntival de animais que amplificaram pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os *primers* do estudo.

Espécie	Amostra	$\beta 1/\beta 2$	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561	Total	Total (exceto $\beta 1/\beta 2$)	PNH positivos
<i>Ateles chamek</i>									
	PR07	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR08	1	0	0	1	0	2	1	1
<i>Callithrix penicillata</i>									
	PR13	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR15	0	0	0	0	0	0	0	0
	PR16	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR17	0	0	1	0	0	1	1	1
	PR18	1	0	0	0	0	1	0	0
<i>Saimiri sciureus</i>									
	PR12	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sapajus apella</i>									
	PR09	1	0	0	0	0	1	0	0
	PR10	0	0	0	0	0	0	0	0
	PR11	1	0	1	0	0	2	1	1
Sem identificação									
	PR14	0	0	0	0	1	1	1	1
Total	12	7	0	2	1	1			4

Nota: afim de esclarecer a quantidade de animais que amplificaram pelos *primers* de interesse, a tabela descreve o total de amostras positivas, exceto os valores para os *primers* $\beta 1/\beta 2$, já que foram utilizados apenas como controle da qualidade da extração.

APÊNDICE G - Comparação dos resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir das amostras extraídas de sangue total e de swab conjuntival.

TABELA 37: Resultados de biologia molecular para todos os primatas não-humanos (PNH) de todos os locais de estudo, discriminando por tipo de amostra extraída (sangue total e swab conjuntival).

Nome científico do PNH	CENP		Zoo Salvador		Zoo Brasília		Zoo Sorocaba		Zoo Curitiba		Total	
	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab
<i>Alouatta caraya</i>			1	1			3	2			4	3
<i>Alouatta guariba</i>							3				3	0
<i>Alouatta seniculus</i>								1			0	1
<i>Alouatta</i> sp.					3						3	0
<i>Aotus nigriceps</i>					2						2	0
<i>Ateles chamek</i>							2	1	7	1	9	2
<i>Ateles marginatus</i>	10	10						4			10	14
<i>Ateles paniscus</i>			1								1	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>							1	2			1	2
<i>Callicebus cupreus</i>					1						1	0
<i>Callithrix penicillata</i>										1	0	1
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>					1	1					1	1
<i>Saguinus bicolor</i>					2						2	0
<i>Saguinus niger</i>					1	1					1	1
<i>Sapajus apella</i>									1	1	1	1
<i>Sapajus flavius</i>			1	5							1	5

<i>Sapajus xanthosternos</i>			4	9							4	9
Sem identificação					5				1		5	1
Total	10	10	7	15	15	2	9	10	8	4	49	41
Relação (em %) ¹	100,0	100,0	13,2	32,6	75,0	40,0	18,8	22,2	44,4	33,3	32,8	33,8
PNH positivos ²		10		19		15		16		11		71
PNH positivos ambos ³		10		2		1		2		0		15
Concordância (em %) ⁴		100		10,5		6,7		12,5		0,0		21,1

Nota: as colunas sombreadas estão apenas com função de facilitar a leitura dos dados por zoológico ou centro de conservação, e não tem função de destacar um dado em relação a outro. Legenda: 1: relação, em porcentagem, do total de PNH que amplificaram em relação ao total de amostras. Ou seja, a porcentagem reflete em relação à quantidade de amostras de sangue ou de *swab* processadas; 2: número de PNH únicos positivos para ambas as técnicas, sendo excluído os resultados com os *primers* $\beta 1/\beta 2$ (nos casos de PNH amostrados com resultados positivos tanto para sangue total como para *swab* conjuntival, ele foi considerado como apenas um); 3: número de PNH que apresentaram resultados positivos para ambas as amostras e com o mesmo conjunto de *primers*, ou seja, o mesmo PNH apresentou a amostra de sangue total e *swab* conjuntival positivos para a mesma técnica molecular; 4: concordância, em porcentagem, do número de PNH positivos para ambas as amostras extraídas (sangue total e *swab* conjuntival) para o mesmo *primer* com o total de PNH positivos únicos.

TABELA 38: Resultados de biologia molecular para as amostras de sangue total e *swab* conjuntival de primatas não-humanos (PNH) do Centro Nacional de Primatas (CENP).

Espécie	Amostra	β1/β2		TCZ1/TCZ2		121/122		HSP70		SSU561		PNH pos*	Concordância**				
		Sangue Swab		Sangue Swab		Sangue Swab		Sangue Swab		Sangue Swab			β1/β1	TCZ1/TCZ1	121/121	HSP70	SSU561
<i>Ateles marginatus</i>	PA01	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	PA02	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
	PA03	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
	PA04	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
	PA05	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
	PA06	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	PA07	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	PA08	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
	PA09	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
	PA10	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Total	10	10	9	0	0	10	10	6	0	4	6	10	9	0	10	0	4

Nota: as colunas sombreadas estão apenas com função de facilitar a leitura dos dados por zoológico ou centro de conservação, e não tem função de destacar um dado em relação a outro. Legenda: *: número de PNH positivos únicos positivos para, ao menos, um dos *primers* utilizados no estudo, tanto por sangue total como por *swab* conjuntival; **: concordância entre os resultados obtidos entre as amostras extraídas de sangue total com as amostras de *swab* conjuntival para o mesmo *primer*. Assim, o número 1 (um) indica que o mesmo PNH foi positivo para o mesmo *primer* em ambos os tipos de amostras, enquanto que o número 0 (zero) indica que, ou não houve concordância (uma amostra positiva enquanto outra negativa no mesmo *primer*) ou que o PNH foi negativo para ambas as amostras na técnica molecular.

[illegible]

BA22	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA23	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA31	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
BA32	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BA33	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
BA34	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA35	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
BA36	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA37	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
<i>Sapajus xanthosternos</i>																
BA01	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA02	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BA04	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BA05	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA06	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BA07	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
BA08	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BA09	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
BA10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA11	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
BA12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
BA14	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
BA15	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0

	BA16	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	BA17	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	BA18	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	BA19	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	BA20	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	BA21	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	BA24	1		0		0		0		0		0					
	BA25	1		0		0		0		0		0					
	BA26	1		0		0		0		0		0					
	BA27	1		0		0		0		0		0					
	BA28	1		0		0		0		0		0					
	BA29	1		0		0		0		0		0					
	BA30	1		0		0		0		0		0					
Total	53	53	33	0	0	2	11	1	5	7	1	19	33	0	0	1	1

Nota: as colunas sombreadas estão apenas com função de facilitar a leitura dos dados por zoológico ou centro de conservação, e não tem função de destacar um dado em relação a outro. Os campos vazios indicam ausência de amostra. Legenda: *: número de PNH positivos únicos positivos para, ao menos, um dos *primers* utilizados no estudo, tanto por sangue total como por *swab* conjuntival; **: concordância entre os resultados obtidos entre as amostras extraídas de sangue total com as amostras de *swab* conjuntival para o mesmo *primer*. Assim, o número 1 (um) indica que o mesmo PNH foi positivo para o mesmo *primer* em ambos os tipos de amostras, enquanto que o número 0 (zero) indica que, ou não houve concordância (uma amostra positiva enquanto outra negativa no mesmo *primer*) ou que o PNH foi negativo para ambas as amostras na técnica molecular.

[illegible]

DF39	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
DF44		1		0		0		0		0	0						
Sem identificação																	
DF48	1		0		1		0		0		1						
DF49	1		0		0		0		0		0						
DF50	1		0		0		0		0		0						
DF51	1		0		1		0		0		1						
DF52	1		0		1		0		0		1						
DF55	1		0		1		0		0		1						
DF57	1		0		0		0		0		0						
DF58	1		0		1		0		0		1						
Total	21	20	5	0	1	14	1	5	0	3	0	15	4	0	1	0	0

Nota: as colunas sombreadas estão apenas com função de facilitar a leitura dos dados por zoológico ou centro de conservação, e não tem função de destacar um dado em relação a outro. Os campos vazios indicam ausência de amostra. Legenda: *: número de PNH positivos únicos positivos para, ao menos, um dos *primers* utilizados no estudo, tanto por sangue total como por *swab* conjuntival; **: concordância entre os resultados obtidos entre as amostras extraídas de sangue total com as amostras de *swab* conjuntival para o mesmo *primer*. Assim, o número 1 (um) indica que o mesmo PNH foi positivo para o mesmo *primer* em ambos os tipos de amostras, enquanto que o número 0 (zero) indica que, ou não houve concordância (uma amostra positiva enquanto outra negativa no mesmo *primer*) ou que o PNH foi negativo para ambas as amostras na técnica molecular.

[illegible]

Ateles marginatus

SP12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP15	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
SP16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP17	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SP18	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
SP28	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP29	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
SP30	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Brachyteles arachnoides

SP19	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP20	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP21	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
SP22	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

Callicebus vierai

SP34	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP46	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP47	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
SP48	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Callithrix jacchus

SP42	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cebus olivaceus

SP24	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

<i>Chiropotes utahicki</i>																	
SP44	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>																	
SP37	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SP38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SP39	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Papio hamadryas</i>																	
SP40	1		0		0		0		0		0						
SP41	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Sapajus nigritus</i>																	
SP23	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SP32	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SP33	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SP43	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	48	48	37	0	0	3	9	8	1	0	0	16	37	0	1	1	0

Nota: as colunas sombreadas estão apenas com função de facilitar a leitura dos dados por zoológico ou centro de conservação, e não tem função de destacar um dado em relação a outro. Os campos vazios indicam ausência de amostra. Legenda: *: número de PNH positivos únicos positivos para, ao menos, um dos *primers* utilizados no estudo, tanto por sangue total como por *swab* conjuntival; **: concordância entre os resultados obtidos entre as amostras extraídas de sangue total com as amostras de *swab* conjuntival para o mesmo *primer*. Assim, o número 1 (um) indica que o mesmo PNH foi positivo para o mesmo *primer* em ambos os tipos de amostras, enquanto que o número 0 (zero) indica que, ou não houve concordância (uma amostra positiva enquanto outra negativa no mesmo *primer*) ou que o PNH foi negativo para ambas as amostras na técnica molecular.

[illegible]

PR09	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
PR10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PR11	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Sem identificação															
PR14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Total	18	18	7	0	0	7	2	1	1	0	1	11	7	0	0

Nota: as colunas sombreadas estão apenas com função de facilitar a leitura dos dados por zoológico ou centro de conservação, e não tem função de destacar um dado em relação a outro. Os campos vazios indicam ausência de amostra. Legenda: *: número de PNH positivos únicos positivos para, ao menos, um dos *primers* utilizados no estudo, tanto por sangue total como por *swab* conjuntival; **: concordância entre os resultados obtidos entre as amostras extraídas de sangue total com as amostras de *swab* conjuntival para o mesmo *primer*. Assim, o número 1 (um) indica que o mesmo PNH foi positivo para o mesmo *primer* em ambos os tipos de amostras, enquanto que o número 0 (zero) indica que, ou não houve concordância (uma amostra positiva enquanto outra negativa no mesmo *primer*) ou que o PNH foi negativo para ambas as amostras na técnica molecular.

APÊNDICE H - Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) a partir da extração de DNA de sangue total.

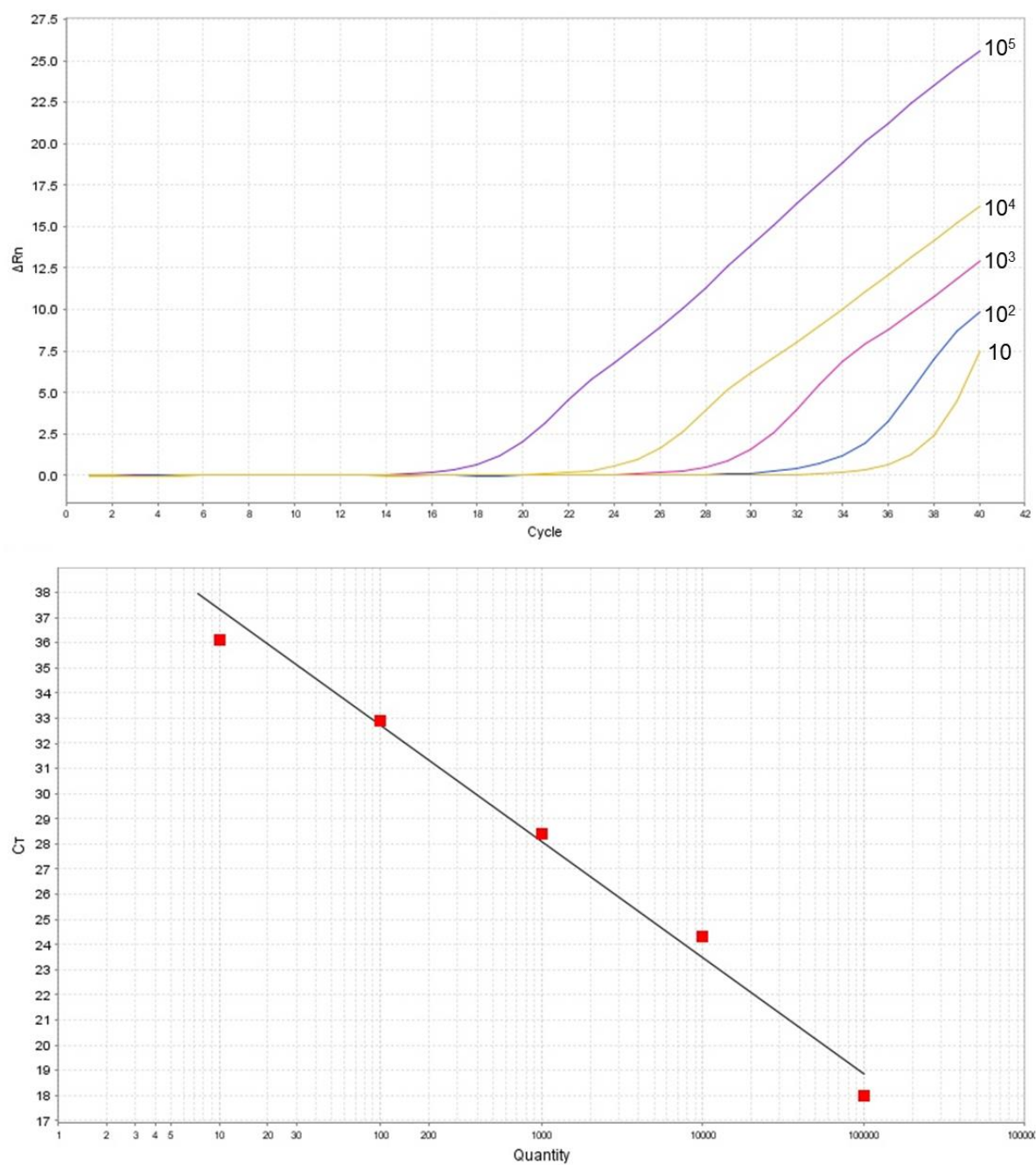


FIGURA 20: Amplificação e curvas de amplificação (acima e abaixo, respectivamente) dos controles quantificados de *T. cruzi* (na ordem de 10⁵ a 10 parasitos/mL) utilizados na pesquisa.

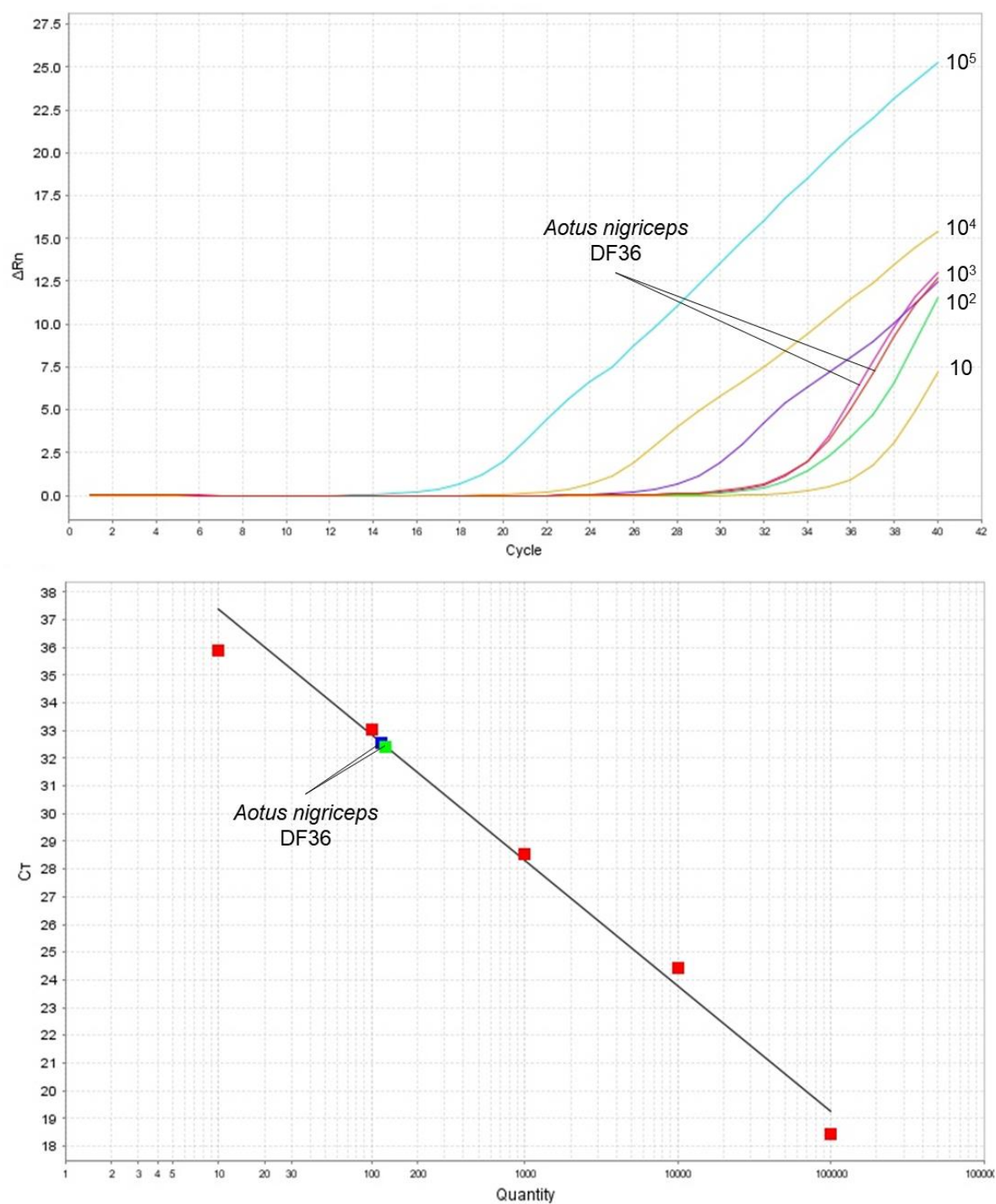


FIGURA 21: Amplificação e curvas de amplificação (acima e abaixo, respectivamente) exemplificando a quantificação da amostra DF36 do Zoo Brasília, que também amplificou à PCR utilizando os mesmos *primers*, obtendo uma média de 120,01 parasitos/mL.

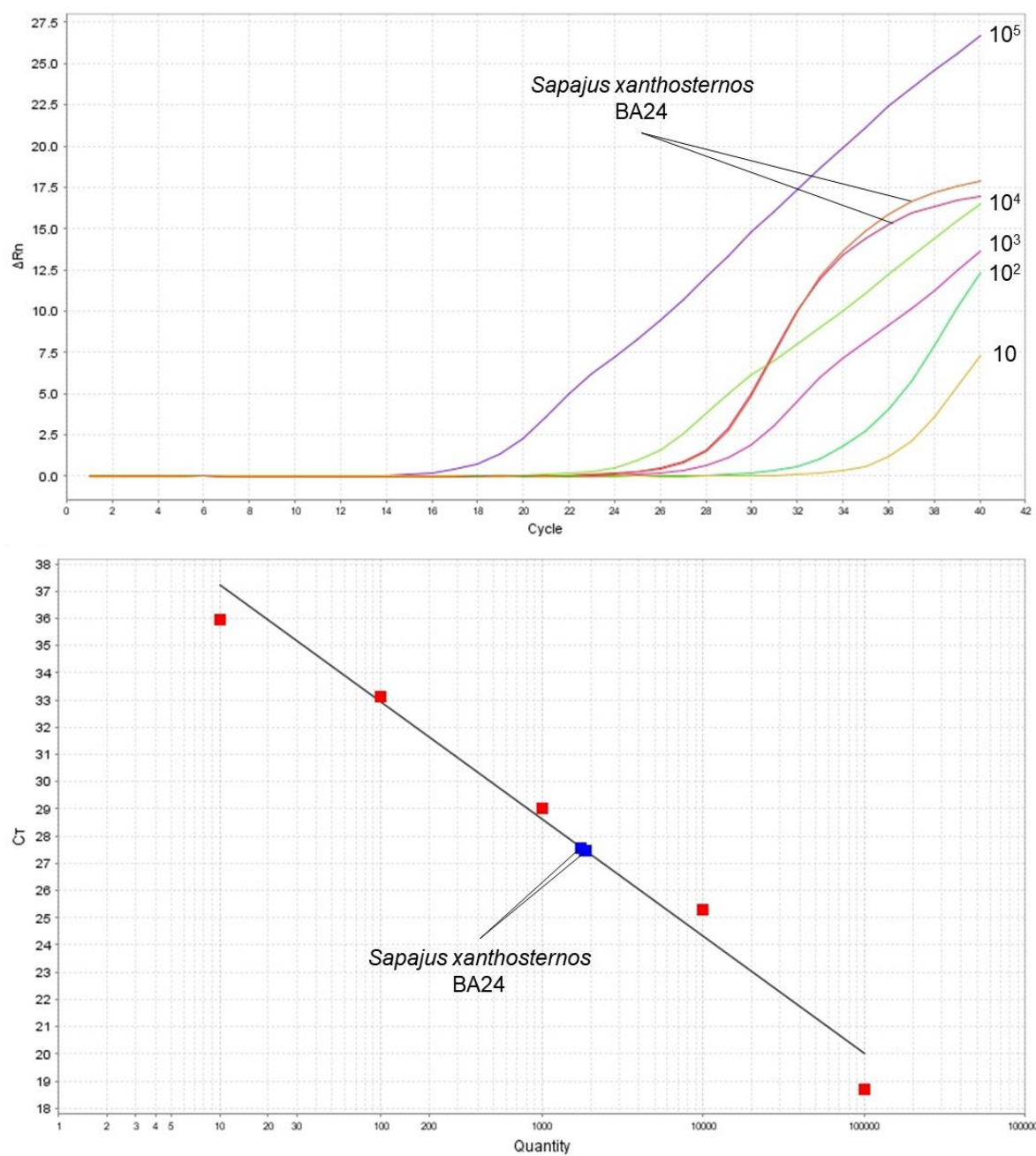


FIGURA 22: Amplificação e curvas de amplificação (acima e abaixo, respectivamente) exemplificando a quantificação da amostra BA24 do Zoo Salvador, que não amplificou à PCR utilizando os mesmos *primers*, obtendo uma média de $1,81 \times 10^3$ parasitos/mL.

TABELA 43: Dados de quantificação de amostras que amplificaram na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) utilizando *primers* para gene hsp70. As amostras com campos sombreados indicam que elas também amplificaram à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os mesmos *primers*.

Espécie	Amostra	Quantidade 1*	Quantidade 2*	Média das quantidades*	Cq** (média)
CENP					
<i>Ateles marginatus</i>					
	PA01	49,8	78,7	64,25	33,7
	PA02	46,3	66,53	56,415	33,9
	PA03	31,75	23,7	27,725	35,07
	PA04	50,77	27,57	39,17	34,55
	PA05	28,04	44,42	36,23	34,65
	PA06	24,97	41,42	33,195	34,8
	PA07	36,9	54,61	45,755	34,38
	PA08	16,53	55,5	36,015	34,9
	PA09	88,75	127,84	108,295	32,81
	PA10	57,87	8,67	33,27	35,4
Zoo Salvador					
<i>Alouatta caraya</i>					
	BA38	1,13E+03	982,69	1,06E+03	26,77
	BA39	976,25	885,85	931,05	27,33
	BA43	875,32	956,04	915,68	27,29
<i>Ateles paniscus</i>					
	BA47	1,29E+03	1,24E+03	1,27E+03	26,64
<i>Sapajus flavius</i>					
	BA22	331,27	408,81	370,04	30,5
	BA23	2,82E+03	2,79E+03	2,81E+03	26,7
	BA32	522,73	585,11	553,92	28,18
	BA33	1,34E+03	1,40E+03	1,37E+03	26,45
	BA36	487,98	368,61	428,295	28,57
	BA37	244,47	238,19	241,33	29,9
<i>Sapajus xanthosternos</i>					
	BA01	431,65	359,85	395,75	30,37
	BA02	377,39	364,86	371,125	30,48
	BA03	934,26	0	467,13	28,76

BA04	565,74	541,39	553,565	29,74
BA07	660,51	695,38	677,945	29,36
BA08	421,18	407,08	414,13	30,28
BA11	584,3	405,61	494,955	29,97
BA15	795,37	820,15	807,76	29,03
BA17	551,3	405,61	478,455	29,74
BA19	608,8	516,48	562,64	29,71
BA20	536,86	520,9	528,88	29,82
BA24	1,86E+03	1,75E+03	1,81E+03	27,53
BA25	406,71	369,32	388,015	30,4
BA28	377,27	432,87	405,07	30,32
BA30	479,96	481,23	480,595	30

Zoo Brasília
Alouatta sp

DF46	44,82	57,45	51,135	34,06
------	-------	-------	--------	-------

Aotus nigriceps

DF36	115,61	124,41	120,01	32,35
------	--------	--------	--------	-------

Callicebus cupreus

DF38	125,76	122,9	124,33	32,29
------	--------	-------	--------	-------

Saguinus bicolor

DF54	36,04	44,68	40,36	34,49
------	-------	-------	-------	-------

Saguinus niger

DF39	68,65	113,29	90,97	32,94
------	-------	--------	-------	-------

Zoo Sorocaba
Alouatta caraya

SP04	110,45	227,41	168,93	31,42
SP05	305,17	281,13	293,15	30,21

Alouatta guariba

SP06	231,61	212,46	222,035	30,89
SP08	181,06	156,14	168,6	31,4
SP09	312,79	362,7	337,745	30,11

Ateles chamek

SP10	198,08	281,42	239,75	30,77
SP11	309,54	237,69	273,615	30,51

Brachyteles arachnoides

SP21	253,61	225,5	239,555	30,75
Zoo Curitiba				
<i>Sapajus apella</i>				
PR11	125,97	123,2	124,585	32,3
Total	49			

Legenda: *: quantidade de parasitos/mL; **: ciclo de quantificação (Cq). Mais informações sobre o Cq na qPCR no ANEXO E.

APÊNDICE I – Relatório de atividades e recomendações enviadas aos zoológicos e centro de conservação do estudo.

Este apêndice traz uma síntese dos principais resultados e discussão obtidos nesta tese que foram encaminhados aos zoológicos e centro de conservação que colaboraram com nossa pesquisa, afim de compartilhar os dados obtidos em nossas análises em laboratório. O intuito foi de tornar os veterinários, equipe técnica e demais responsáveis pelo manejo dos PNH cientes da positividade de amostras destes animais para tripanosomas.

Assim, montamos um breve relatório que apresenta detalhes de nossa pesquisa para cada local de estudo, seguido de recomendações as quais dirigimos para os veterinários e membros dos espaços onde estes PNH estão alocados, bem como para as secretarias de meio ambiente e centro de controle de vetores e zoonoses dos municípios.

As páginas a seguir trazem os fac-símile (condensados em duas páginas do relatório por página nesta tese) dos relatórios enviados aos zoológicos e centro de conservação, na seguinte ordem: CENP; Zoo Salvador; Zoo Brasília; Zoo Sorocaba e Zoo Curitiba.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE DOENÇAS TROPICAIS

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL DE BAURU

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
LABORATÓRIO REGIONAL DE BAURU

Relatório de atividades e recomendações

Pesquisa com primatas não-humanos do Centro
Nacional de Primatas (CENP)

Baseado em dados de pesquisa de doutorado
de Me. Wesley J Santos, sob orientação de Dra.
Simone B Lucheis e co-orientação de Dra.
Virginia B R Pereira e Dra. Maria I M Medeiros.

Outubro de 2020

SUMÁRIO

1. A quem se destina	3
2. Resumo	3
3. Introdução e objetivos	3
4. Metodologia	4
4.1. Questões de ética	4
4.2. Amostras	4
4.3. Biologia molecular	5
5. Resultados	5
6. Discussão	6
7. Recomendações	7
8. Agradecimentos	8
9. Referências	8

1. A QUEM SE DESTINA

Este documento é destinado à equipe técnica responsável pelo manejo de animais, em especial aos primatas não-humanos, alvos deste relatório, do Centro Nacional de Primatas, bem como para a Secretaria de Meio Ambiente e o Centro de Controle de Vetores da cidade de Ananindeua, PA.

Apresentamos dados ainda não publicados e sua divulgação não deve ser realizada sem a anuência dos autores deste relatório, vedada apenas à circulação interna. Todos os detalhes da pesquisa podem ser lidos na íntegra na tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP, a qual estará disponível no Repositório da UNESP.

2. RESUMO

A emergência e reemergência de doenças afetam não somente os humanos, mas também os animais, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro. Em parceria com o CENP, investigamos a presença de tripanosomas, entre os quais os causadores da doença de Chagas, a partir de amostras de primatas não-humanos pertencentes ao plantel do centro. Nossos achados apontam para uma ampla circulação de tripanosomas entre os primatas estudados, além de sustentar a hipótese da presença de insetos vetores (triatomíneos) que estariam usando estes animais como fonte de sangue, transmitindo os parasitos para estes animais. Nosso intuito é recomendar ações de busca ativa de triatomíneos nos recintos e espaços próximos aos locais onde os primatas estão alocados, já que outras espécies animais do centro podem estar suscetíveis à infecção, além de que ninhos de nidificação destes insetos nestes espaços podem oferecer riscos à saúde da população humana que reside próximo ao centro.

3. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os tripanosomas são protozoários de grande interesse médico e veterinário. O mais conhecido deles, *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, enfermidade de atinge cerca de 5 milhões de pessoas apenas no Brasil (Ministério da Saúde, 2019).

Os animais silvestres, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro, também são suscetíveis à infecção por tripanosomas, sendo expostos principalmente ao entrarem em contato com triatomíneos, insetos que utilizam de mamíferos para obtenção de sangue (Ministério da Saúde, 2019). Dezenas de espécies de triatomíneos já foram identificadas no país, muitas das quais conseguem transmitir o parasito (Fiocruz, 2014).

Os primatas não-humanos (PNH) são naturalmente suscetíveis à infecção por tripanosomas (Ziccardi et al., 2000; Philipp e Purcell, 2005) e a busca nestes animais serve como um indicativo da circulação do parasito no ambiente e, de forma indireta, pode indicar a presença de insetos vetores nestes espaços.

Assim, conduzimos pesquisa na busca por tripanosomas em amostras de PNH em parceria com o Centro Nacional de Primatas (CENP), na finalidade de identificar os animais positivos e suscetíveis, além de criar recomendações para a equipe do centro e demais responsáveis.

4. METODOLOGIA

4.1. Questões de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina (FMB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Botucatu, São Paulo, sob número 1213/2017, além de ter sido aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob número 57382-3. A pesquisa também teve aprovação do Instituto Evandro Chagas, sob número 20/2019 exclusivamente para trabalhos com os PNH do CENP.

4.2. Amostras

Recebemos, entre novembro de 2019, amostras de sangue total, swab conjuntival, soro e lâminas de esfregaço por extensão, de 10 PNH de uma única espécie, como descrito na TABELA 1.

TABELA 1: relação de amostras por espécie de primata não-humano (PNH) recebidas do CENP.

Espécie	Amostra	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Ateles marginatus</i>		10	10	10	10	40
Total	46	10	10	10	10	40

4.3. Biologia molecular

Extraímos o DNA das amostras de sangue total, a partir de um kit comercial, e *swab* conjuntival, a partir de adaptações de Benassi et al. (2017). Submetemos as amostras extraídas na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na busca de DNA de tripanosomatídeos utilizando os *primers* HSP70 (Hernandez et al., 2014) e SSU561 (Noyes et al., 1996), bem como na busca por DNA de *T. cruzi* utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2 (Virreira et al., 2003; Moser et al., 1989) e 121/122 (Fitzwater et al., 2008). Todas as amostras foram submetidas à eletroforese para a identificação das amostras positivas.

5. RESULTADOS

Dos 10 PNH do estudo, extraiu-se o DNA de todas as amostras de sangue total e de *swab* conjuntival e, após, submetidas à PCR. Todos os PNH apresentaram positividade para, ao menos, uma das técnicas moleculares. Todos os detalhes estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2: Resultado da PCR a partir das amostras extraídas de sangue total e *swab* conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do CENP. As amostras foram identificadas seguindo os dados recebidos nos tubos e dados de coleta enviados pelo centro durante a coleta. Os campos sombreados apenas servem para facilitar a visualização dos resultados.

Espécie	Amostra*	TCZ1/TCZ2		121/122		HSP70		SSU561	
		Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab
<i>Ateles marginatus</i>									
	484066	0	0	1	1	0	0	0	0
	484083	0	0	1	1	1	0	1	1
	484396	0	0	1	1	1	0	1	1
	483563	0	0	1	1	1	0	1	1
	483562	0	0	1	1	0	0	1	1

	483997	0	0	1	1	1	0	0	0
	483568	0	0	1	1	0	0	0	0
	483567	0	0	1	1	1	0	0	1
	484358	0	0	1	1	0	0	0	1
	483561	0	0	1	1	1	0	0	0
Total	10	0	0	10	10	6	0	4	0

*: os números de identificação referem-se aos seis últimos dígitos dos dados recebidos por nós.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho revela a presença de tripanosomas nos PNH do CENP. O fato de termos encontrado trechos de DNA de tripanosomas em todas as amostras de sangue e *swab* conjuntival, aponta para a circulação do parasito no animal. Apesar de haver a possibilidade de uma reagudização em alguns casos, também é um indicativo de uma provável infecção recente nestes animais, o que remete para a possibilidade de que triatomíneos tenham construído ninhos próximos ou dentro destes recintos.

É sabido que o Pará é um dos estados com maior número de casos de doença de Chagas entre humanos registrados no país, com mais de 86% dos casos registrados. Ananindeua, local onde o CENP está localizado, apresentou um crescente de casos nos últimos anos (Ministério da Saúde, 2019). Entre os PNH, Bahia et al. (2017) já apontou para uma alta prevalência de amostras positivas para *T. cruzi* nestes animais no estado, indicando uma ampla circulação do parasito na região Norte do Brasil.

Apesar de nossos trabalhos terem sido conduzidos em tão poucos PNH, devido principalmente a entraves burocráticos e de logística, o fato de todos os animais mostrados terem sido positivos em nosso trabalho pode indicar a presença de triatomíneos de forma ampla em diversos espaços onde estes e outros PNH estão alojados no CENP, tornando estes animais suscetíveis a serem fonte sanguínea para estes insetos. É sabido que estes insetos tendem a viajar longe de seus ninhos de nidificação para alimentação (Lehane et al., 1992) e podem estar usufruindo da facilidade de acesso a estes animais para obter sangue.

Apontamos que, mesmo que estes animais não apresentem sinais clínicos e outros problemas de saúde associado à doença de Chagas e outros

tripanosomas, eles podem ocorrer nestes animais (Sathler-Avelar et al., 2017) e que a doença de Chagas aguda e crônica nestes animais podem trazer consequências negativas para pesquisas biomédicas que podem ser conduzidas nestes animais (Hodo et al., 2018).

Conduzimos também buscas parasitológicas nas lâminas de esfregaço por extensão e sorologia pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com as amostras de soro. Contudo, para estas técnicas diagnósticas, os animais foram negativos. Os dados completos podem ser vistos na tese apresentada à FMB/Unesp.

7. RECOMENDAÇÕES

Nossas recomendações visam construir um elo entre os achados laboratoriais conduzidos por nós e a manutenção da saúde e bem-estar dos animais envolvidos na pesquisa – os PNH –, bem como dos demais animais do centro que podem ser suscetíveis à infecção, e, possivelmente, servir de reservatório da doença. Além disso, nossas recomendações são pensadas devido à atividade humana próximo a estes espaços onde os animais estão alojados, tanto de moradia como de comércio, bem como da circulação de animais domésticos, como os cães, que também são suscetíveis à infecção por tripanosomas.

À equipe do centro: recomendamos reforçar a limpeza e manutenção tanto dentro como fora dos recintos e locais onde os PNH vivem e dormem, afim de restringir os possíveis locais de nidificação destes insetos. Apesar destes insetos serem, em sua maioria, de hábitos noturnos, eles tendem a se esconder em locais sombreados e protegidos do sol durante o dia. Recomendamos a constante limpeza e observação em locais que apresentam estas características. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, estes devem ser encaminhados ao centro de controle de vetores.

Ao centro de controle de vetores: recomendamos realizar buscas ativas em recintos (dentro e fora destes espaços), bem como por prováveis pontos de nidificação, como serrapilheira, pequenas construções cercadas de vegetação ao entorno e na própria vegetação. É sabido que triatomíneos constroem ninhos em palmeiras e demais árvores de porte semelhante. É necessário

monitoramento constante destas plantas, visto que elas são constantemente utilizadas como ornamentação. Isso inclui a busca ativa por triatomíneos em espaços ao redor do centro, visto que os insetos podem construir ninhos em outros espaços e voar durante a noite para dentro do centro para se alimentar dos animais. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, recomendamos realizar uma busca por tripanosomas para verificar se há manutenção dos parasitos no ambiente.

À secretaria de meio ambiente: construir um plano de busca constante no município, em parceria com outros órgãos municipais e estadual, visando a busca dos triatomíneos por toda a extensão do município.

Sabemos que poderá haver limitações quanto a aplicabilidade destas recomendações. Contudo, a simples manutenção da limpeza e atenção nos recintos dos animais do centro irão colaborar enormemente para reduzir a transmissão de tripanosomas aos PNH, bem como para os demais animais do centro, o que indiretamente contribuirá também para a prevenção de doenças aos seres humanos que co-habitam com estes animais durante suas atividades laborais e à população circulante dentro e ao entorno do local.

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda a equipe do CENP pela colaboração e disponibilidade pela coleta das amostras para nossa pesquisa, em especial à Liliane Almeida Carneiro e Rafael Furtado dos Santos.

9. REFERÊNCIAS

- Bahia M, de Nazaré Leite Barros F, Magalhães-Matos PC, et al. Trypanosoma cruzi infection in captive Neotropical primates in the Brazilian Amazon. Am J Primatol. 2017;79(2):1–6. doi:10.1002/ajp.22590
- Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. Exp Parasitol. 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.

Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(5):768-770.

Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors.* 2014; 7(501):1-7.

Hodo CL, Wilkerson GK, Birkner EC, Gray SB, Hamer SA. *Trypanosoma cruzi* Transmission Among Captive Nonhuman Primates, Wildlife, and Vectors. *Ecohealth.* 2018;15(2):426-436. doi:10.1007/s10393-018-1318-5.

Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 1992;52(1):27-38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h

Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. 2019;50(36):1-7.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989b; 27(7):1477-1482.

Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania heneri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1996; 80:119-123.

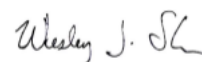
Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malaria, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, (ed). *The laboratory primate: handbook of experimental animals.* 2005;Elsevier.

Sathler-Avelar R, Mattoso-Barbosa AM, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Vitelli-Avelar DM, VandeBerg JL, VandeBerg JF. *Trypanosoma cruzi* Infection in Non-Human Primates. *Primates.* Burke M, Pito M, IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.71652. Acessado em: 04/03/2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/primates/trypanosoma-cruzi-infection-in-non-human-primates>

Virreira M, Torrico F, Truysens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 5:574-583.

Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(2):157-159. doi:10.1590/s0074-02762000000200004

Botucatu, outubro de 2020.



Me. Wesley J Santos



Profa. Dra. Simone B Lucheis

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE DOENÇAS TROPICAIS

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL DE BAURU

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
LABORATÓRIO REGIONAL DE BAURU

Relatório de atividades e recomendações

Pesquisa com primatas não-humanos do Parque
Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoo Salvador)

Baseado em dados de pesquisa de doutorado
de Me. Wesley J Santos, sob orientação de Dra.
Simone B Lucheis e co-orientação de Dra.
Virgínia B R Pereira e Dra. Maria I M Medeiros.

Outubro de 2020

SUMÁRIO

1. A quem se destina	3
2. Resumo	3
3. Introdução e objetivos	3
4. Metodologia	4
4.1. Questões de ética	4
4.2. Amostras	4
4.3. Biologia molecular	5
5. Resultados	5
6. Discussão	6
7. Recomendações	7
8. Agradecimentos	8
9. Referências	9

1. A QUEM SE DESTINA

Este documento é destinado à equipe técnica responsável pelo manejo de animais, em especial aos primatas não-humanos, alvos deste relatório, do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, bem como para a Secretaria de Meio Ambiente e o Centro de Controle de Vetores da cidade de Salvador, BA.

Apresentamos dados ainda não publicados e sua divulgação não deve ser realizada sem a anuência dos autores deste relatório, vedada apenas à circulação interna. Todos os detalhes da pesquisa podem ser lidos na íntegra na tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP, a qual estará disponível no Repositório da UNESP.

2. RESUMO

A emergência e reemergência de doenças afetam não somente os humanos, mas também os animais, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro. Em parceria com o Zoo Salvador, investigamos a presença de tripanosomas, entre os quais os causadores da doença de Chagas, a partir de amostras de primatas não-humanos pertencentes ao plantel do zoológico. Nossos achados apontam para uma ampla circulação de tripanosomas entre os primatas estudados, além de sustentar a hipótese da presença de insetos vetores (triatomíneos) que estariam usando estes animais como fonte de sangue, transmitindo os parasitos para estes animais. Nosso intuito é recomendar ações de busca ativa de triatomíneos nos recintos e espaços próximos aos locais onde os primatas estão alocados, já que outras espécies animais do zoológico podem estar suscetíveis à infecção, além de que ninhos de nidificação destes insetos nestes espaços podem oferecer riscos à saúde da população humana que reside próximo ao zoológico.

3. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os tripanosomas são protozoários de grande interesse médico e veterinário. O mais conhecido deles, *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, enfermidade de atinge cerca de 5 milhões de pessoas apenas no Brasil (Ministério da Saúde, 2019).

Os animais silvestres, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro, também são suscetíveis à infecção por tripanosomas, sendo expostos principalmente ao entrarem em contato com triatomíneos, insetos que utilizam de mamíferos para obtenção de sangue (Ministério da Saúde, 2019). Dezenas de espécies de triatomíneos já foram identificadas no país, muitas das quais conseguem transmitir o parasito (Fiocruz, 2014).

Os primatas não-humanos (PNH) são naturalmente suscetíveis à infecção por tripanosomas (Ziccardi et al., 2000; Philipp e Purcell, 2005) e a busca nestes animais serve como um indicativo da circulação do parasito no ambiente e, de forma indireta, pode indicar a presença de insetos vetores nestes espaços.

Assim, conduzimos pesquisa na busca por tripanosomas em amostras de PNH em parceria com o Parque Zoobotânico Getúlio Vargas (Zoo Salvador), na finalidade de identificar os animais positivos e suscetíveis, além de criar recomendações para a equipe do zoológico e demais responsáveis.

4. METODOLOGIA

4.1. Questões de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina (FMB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Botucatu, São Paulo, sob número 1213/2017, além de ter sido aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob número 57382-3. A pesquisa também teve aprovação do Zoo Salvador, seguindo os trâmites internos da instituição.

4.2. Amostras

Recebemos, entre maio de 2017 a maio de 2019, amostras de sangue total, swab conjuntival, soro e lâminas de esfregaço por extensão, de 48 PNH, como descrito na TABELA 1.

TABELA 1: relação de amostras por espécie de primata não-humano (PNH) recebidas do Zoo Salvador.

Espécie	Amostra	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Alouatta caraya</i>		6	6	6	6	24
<i>Ateles marginatus</i>		3	2	3	2	10
<i>Ateles paniscus</i>		4	4	4	4	16
<i>Lagothrix lagotricha</i>		3	3	3	3	12
<i>Sapajus flavius</i>		9	10	10	10	39
<i>Sapajus xanthosternos</i>		28	28	21	28	105
Total	54	53	53	47	53	206

4.3. Biologia molecular

Extraímos o DNA das amostras de sangue total, a partir de um kit comercial, e swab conjuntival, a partir de adaptações de Benassi et al. (2017). Submetemos as amostras extraídas na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na busca de DNA de tripanosomatídeos utilizando os *primers* HSP70 (Hernandez et al., 2014) e SSU561 (Noyes et al., 1996), bem como na busca por DNA de *T. cruzi* utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2 (Virreira et al., 2003; Moser et al., 1989) e 121/122 (Fitzwater et al., 2008). Todas as amostras foram submetidas à eletroforese para a identificação das amostras positivas.

5. RESULTADOS

Dos 54 PNH do estudo, extraiu-se o DNA de 53 amostras de sangue total e 46 amostras de swab conjuntival e, após, submetidas à PCR. Destas, 19 PNH apresentaram positividade para, ao menos, uma das técnicas moleculares. Todos os detalhes estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2: Resultado da PCR a partir das amostras extraídas de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Salvador. As amostras foram identificadas seguindo os dados recebidos nos tubos e dados de coleta enviados pelo zoológico durante a coleta. Os campos sombreados apenas servem para facilitar a visualização dos resultados.

Espécie	Amostra	TCZ1/TCZ2	121/122	HSP70	SSU561
		Sangue Swab	Sangue Swab	Sangue Swab	Sangue Swab
<i>Alouatta caraya</i>					

213111	0	0	0	0	0	0	1	0
010184	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Ateles paniscus</i>								
189606	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Sapajus flavius</i>								
011007	0	0	0	0	0	1	0	0
010993	0	0	0	1	0	0	0	0
014171	0	0	0	1	0	1	0	0
011103	0	0	0	1	0	1	0	0
014072	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Sapajus xanthosternos</i>								
010945	0	0	0	1	0	0	0	0
010857	0	0	1	0	0	0	1	1
238154	0	0	0	1	0	0	0	0
014001	0	0	0	1	0	0	0	0
014312	0	0	0	0	0	0	1	0
237841	0	0	0	0	0	0	1	0
014062	0	0	1	0	0	1	1	0
014446	0	0	0	1	0	0	0	0
014685	0	0	0	1	0	0	0	0
010149	0	0	0	1	0	0	0	0
212595	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	19	0	0	2	11	1	5	7

Nas lâminas de esfregaço por extensão, um *S. xanthosternos* (amostra 010945) apresentou formas sugestivas de tripanosomas durante observação em microscopia.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho revela a presença de tripanosomas nos PNH do Zoo Salvador. O fato de termos encontrado trechos de DNA de tripanosomas nas amostras de sangue e swab conjuntival, aponta para a circulação do parasito no animal. Apesar de haver a possibilidade de uma reagudização em alguns casos, também é um indicativo de uma provável infecção recente nestes animais, o que remete para a possibilidade de que triatomíneos tenham construído ninhos próximos ou dentro destes recintos.

O estado da Bahia possui diversas espécies de triatomíneos de relevância para a doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2019) e, em 2011, Santana et al. relataram a captura de cerca de 480 triatomíneos em Salvador, sendo 44% deles dentro de residências, sendo que quase metade de todos os triatomíneos capturados foram positivos para *T. cruzi*.

Apesar de nossos trabalhos terem sido conduzidos em PNH, o fato de termos encontrado estes animais positivos pode indicar que a possível presença de triatomíneos pode colocar outros animais do Zoo Salvador em situação suscetível a serem fonte sanguínea para estes insetos, já que estes animais tendem a viajar longe de seus ninhos de nidificação para alimentação (Lehane et al., 1992). Isto naturalmente inclui as habitações ao entorno, já que o Zoo Salvador se encontra completamente inserido em ambiente urbano e humanos, bem como animais domésticos como os cães, podem ser alvos para os insetos, já que eles podem sair de regiões de mata durante a noite e voar para regiões peridomiciliares apenas para alimentação (Dumonteil et al., 2002).

Conduzimos também sorologia pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com as amostras de soro. Contudo, para esta técnica diagnóstica, os animais foram negativos. Os dados completos podem ser vistos na tese apresentada à FMB/Unesp.

7. RECOMENDAÇÕES

Nossas recomendações visam construir um elo entre os achados laboratoriais conduzidos por nós e a manutenção da saúde e bem-estar dos animais envolvidos na pesquisa – os PNH –, bem como dos demais animais do zoológico que podem ser suscetíveis à infecção, e, possivelmente, servir de reservatório da doença. Além disso, nossas recomendações são pensadas devido à intensa atividade humana próximo ao zoológico, tanto de moradia como de comércio, bem como da circulação de animais domésticos, como os cães, que também são suscetíveis à infecção por tripanosomas.

À equipe do zoológico: recomendamos reforçar a limpeza e manutenção tanto dentro como fora dos recintos e locais onde os PNH vivem e dormem, afim de restringir os possíveis locais de nidificação destes insetos. Apesar destes insetos

serem, em sua maioria, de hábitos noturnos, eles tendem a se esconder em locais sombreados e protegidos do sol durante o dia. Recomendamos a constante limpeza e observação em locais que apresentam estas características. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, estes devem ser encaminhados ao centro de controle de vetores.

Ao centro de controle de vetores: recomendamos realizar buscas ativas em recintos (dentro e fora destes espaços), bem como por prováveis pontos de nidificação, como serrapilheira, pequenas construções cercadas de vegetação ao entorno e na própria vegetação. É sabido que triatomíneos constroem ninhos em palmeiras e demais árvores de porte semelhante. É necessário monitoramento constante destas plantas, visto que elas são constantemente utilizadas como ornamentação. Isso inclui a busca ativa por triatomíneos em espaços ao redor do zoológico, visto que os insetos podem construir ninhos em outros espaços e voar durante a noite para dentro do zoológico para se alimentar dos animais. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, recomendamos realizar uma busca por tripanosomas para verificar se há manutenção dos parasitos no ambiente.

À secretaria de meio ambiente: construir um plano de busca constante no município, em parceria com outros órgãos municipais e estadual, visando a busca dos triatomíneos por toda a extensão do município.

Sabemos que poderá haver limitações quanto a aplicabilidade destas recomendações. Contudo, a simples manutenção da limpeza e atenção nos recintos dos animais do zoológico irão colaborar enormemente para reduzir a transmissão de tripanosomas aos PNH, bem como para os demais animais do zoológico, o que indiretamente contribuirá também para a prevenção de doenças aos seres humanos que co-habitam com estes animais durante suas atividades laborais e à população circulante dentro e ao entorno do Zoo.

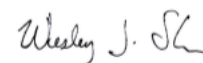
8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda a equipe do Zoo Salvador pela colaboração pela coleta das amostras para nossa pesquisa, em especial ao Vinícius Dantas, por sua disponibilidade e colaboração.

9. REFERÊNCIAS

- Benassi JC, Benvença GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol.* 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.
- Dumontell E, Gourbière S, Barrera-Pérez M, et al. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(2):176–183. doi:10.4269/ajtmh.2002.67.176
- Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(5):768-770.
- Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors.* 2014; 7(501):1-7.
- Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 1992;52(1):27–38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h
- Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. 2019;50(36);1-7.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989b; 27(7):1477-1482.
- Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania heneri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1996; 80:119-123.
- Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malaria, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, (ed). *The laboratory primate: handbook of experimental animals.* 2005;Elsevier.
- Santana Kde S, Bavia ME, Lima AD, et al. Spatial distribution of triatomines (Reduviidae: Triatominae) in urban areas of the city of Salvador, Bahia, Brazil. *Geospat Health.* 2011;5(2):199–203. doi:10.4081/gh.2011.172.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 5:574-583.
- Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(2):157–159. doi:10.1590/s0074-02762000000200004

Botucatu, outubro de 2020.



Me. Wesley J Santos



Profa. Dra. Simone B Lucheis

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE DOENÇAS TROPICAIS

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL DE BAURU

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
LABORATÓRIO REGIONAL DE BAURU

Relatório de atividades e recomendações

Pesquisa com primatas não-humanos da Fundação
Jardim Zoológico de Brasília (Zoo Brasília)

Baseado em dados de pesquisa de doutorado
de Me. Wesley J Santos, sob orientação de Dra.
Simone B Lucheis e co-orientação de Dra.
Virgínia B R Pereira e Dra. Maria I M Medeiros.

Outubro de 2020

SUMÁRIO

1. A quem se destina	3
2. Resumo	3
3. Introdução e objetivos	3
4. Metodologia.....	4
4.1. Questões de ética	4
4.2. Amostras	4
4.3. Biologia molecular	5
5. Resultados	6
6. Discussão	7
7. Recomendações	8
8. Agradecimentos	9
9. Referências	9

1. A QUEM SE DESTINA

Este documento é destinado à equipe técnica responsável pelo manejo de animais, em especial aos primatas não-humanos, alvos deste relatório, da **Fundação Jardim Zoológico de Brasília**, bem como para a Secretaria de Meio Ambiente e o Centro de Controle de Vetores da cidade de **Brasília, DF**.

Apresentamos dados ainda não publicados e sua divulgação não deve ser realizada sem a anuência dos autores deste relatório, vedada apenas à circulação interna. Todos os detalhes da pesquisa podem ser lidos na íntegra na tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP, a qual estará disponível no Repositório da UNESP.

2. RESUMO

A emergência e reemergência de doenças afetam não somente os humanos, mas também os animais, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro. Em parceria com o Zoo Brasília, investigamos a presença de tripanosomas, entre os quais os causadores da doença de Chagas, a partir de amostras de primatas não-humanos pertencentes ao plantel do zoológico. Nossos achados apontam para uma ampla circulação de tripanosomas entre os primatas estudados, além de sustentar a hipótese da presença de insetos vetores (triatomíneos) que estariam usando estes animais como fonte de sangue, transmitindo os parasitos para estes animais. Nosso intuito é recomendar ações de busca ativa de triatomíneos nos recintos e espaços próximos aos locais onde os primatas estão alocados, já que outras espécies animais do zoológico podem estar suscetíveis à infecção, além de que ninhos de nidificação destes insetos nestes espaços podem oferecer riscos à saúde da população humana que reside próximo ao zoológico.

3. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os tripanosomas são protozoários de grande interesse médico e veterinário. O mais conhecido deles, *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, enfermidade de atinge cerca de 5 milhões de pessoas apenas no Brasil (Ministério da Saúde, 2019).

Os animais silvestres, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro, também são suscetíveis à infecção por tripanosomas, sendo expostos principalmente ao entrarem em contato com triatomíneos, insetos que utilizam de mamíferos para obtenção de sangue (Ministério da Saúde, 2019). Dezenas de espécies de triatomíneos já foram identificadas no país, muitas das quais conseguem transmitir o parasito (Fiocruz, 2014).

Os primatas não-humanos (PNH) são naturalmente suscetíveis à infecção por tripanosomas (Ziccardi et al., 2000; Philipp e Purcell, 2005) e a busca nestes animais serve como um indicativo da circulação do parasito no ambiente e, de forma indireta, pode indicar a presença de insetos vetores nestes espaços.

Assim, conduzimos pesquisa na busca por tripanosomas em amostras de PNH em parceria com a Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Zoo Brasília), na finalidade de identificar os animais positivos e suscetíveis, além de criar recomendações para a equipe do zoológico e demais responsáveis.

4. METODOLOGIA

4.1. Questões de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina (FMB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Botucatu, São Paulo, sob número 1213/2017, além de ter sido aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob número 57382-3. A pesquisa também teve aprovação do Zoo Brasília, seguindo os trâmites internos da instituição.

4.2. Amostras

Recebemos, entre maio de 2017 a maio de 2019, amostras de sangue total, swab conjuntival, soro e lâminas de esfregaço por extensão, de 48 PNH, como descrito na TABELA 1.

TABELA 1: relação de amostras por espécie de primata não-humano (PNH) recebidas do Zoo Brasília.

Espécie	Amostra	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Alouatta</i> sp		5	0	0	4	9
<i>Alouatta belzebul</i>		0	2	0	0	2
<i>Alouatta caraya</i>		0	5	0	0	5
<i>Alouatta seniculus</i>		0	3	0	0	3
<i>Aotus nigriceps</i>		2	8	1	0	11
<i>Callicebus cupreus</i>		1	2	1	0	4
<i>Callithrix</i> sp.		0	1	0	0	1
<i>Callithrix geoffroyi</i>		0	1	0	0	1
<i>Callithrix penicillata</i>		0	2	0	0	2
<i>Cebus albifrons</i>		0	1	0	0	1
<i>Chiropotes satanas</i>		0	2	0	0	2
<i>Lagothrix cana</i>		0	2	0	0	2
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>		1	3	1	0	5
<i>Leontopithecus rosalia</i>		0	1	0	0	1
<i>Lophocebus aterrimus</i>		0	1	0	0	1
<i>Mico chrysoleucus</i>		0	1	0	0	1
<i>Saguinus bicolor</i>		2	0	0	2	4
<i>Saguinus imperator</i>		0	1	0	0	1
<i>Saguinus niger</i>		1	3	2	0	6
<i>Saimiri boliviensis</i>		0	1	0	0	1
<i>Sapajus libidinosus</i>		0	2	0	0	2
Sem identificação		8	0	0	8	16
Total	59	20	42	5	14	81

4.3. Biologia molecular

Extraímos o DNA das amostras de sangue total, a partir de um kit comercial, e swab conjuntival, a partir de adaptações de Benassi et al. (2017). Submetemos as amostras extraídas na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na busca de DNA de tripanosomatídeos utilizando os *primers* HSP70 (Hernandez et al., 2014) e SSU561 (Noyes et al., 1996), bem como na busca por DNA de *T. cruzi* utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2 (Virreira et al., 2003; Moser et

al., 1989) e 121/122 (Fitzwater et al., 2008). Todas as amostras foram submetidas à eletroforese para a identificação das amostras positivas.

5. RESULTADOS

Dos 59 PNH do estudo, extraiu-se o DNA de 20 amostras de sangue total e 5 amostras de swab conjuntival e, após, submetidas à PCR. Destas, 15 PNH apresentaram positividade para, ao menos, uma das técnicas moleculares. Todos os detalhes estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2: Resultado da PCR a partir das amostras extraídas de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Brasília. As amostras foram identificadas seguindo os dados recebidos nos tubos e dados de coleta enviados pelo zoológico durante a coleta. Os campos sombreados apenas servem para facilitar a visualização dos resultados. Campos vazios representam ausência de amostra.

Espécie	Amostra*	TCZ1/TCZ2		121/122		HSP70		SSU561	
		Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab
<i>Alouatta</i> sp									
	6616 Michael	0		1		0		1	
	6205 Bel	0		0		1		0	
	Negão	0		1		0		0	
<i>Aotus nigriceps</i>									
	Bracinho	0		1		1		0	0
	Cris	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Callicebus cupreus</i>									
	-	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>									
	Sol	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Saguinus bicolor</i>									
	0636	0		1		0		1	
	-	0		1		1		1	
<i>Saguinus niger</i>									
	Princesa	0	1	1	0	1	0	0	0
Sem identificação									
	Fenix	0		1		0		0	
	Bingo	0		1		0		0	

	Joy	0	1	0	0
	-	0	1	0	0
	Lilica	0	1	0	0
Total	21	0	1	5	0

*: identificação como recebida por nós. Apesar de solicitado, alguns registros ou vieram com dados informais de registro ou não foram informados pela equipe do Zoo Brasília.

Para as lâminas de esfregaço por extensão, um *Alouatta* sp. (amostra 'Negão') apresentou formas sugestivas de tripanosomas na microscopia.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho revela a presença de tripanosomas nos PNH do Zoo Brasília. O fato de termos encontrado trechos de DNA de tripanosomas nas amostras de sangue e swab conjuntival, aponta para a circulação do parasito no animal. Apesar de haver a possibilidade de uma reagudização em alguns casos, também é um indicativo de uma provável infecção recente nestes animais, o que remete para a possibilidade de que triatomíneos tenham construído ninhos próximos ou dentro destes recintos.

Nosso trabalho se soma a outros já conduzidos no Zoo Brasília, que já apontaram para a circulação de tripanosomas neste espaço, além da presença de triatomíneos já capturados em interiores de recintos de mamíferos (Minuzzi-Souza et al., 2016; Reis et al., 2019), reforçando a ampla circulação tanto de insetos vetores como dos parasitos entre esses animais.

Apesar de nossos trabalhos terem sido conduzidos em PNH, o fato de termos encontrado estes animais positivos pode indicar que a possível presença de triatomíneos pode colocar outros animais do Zoo Brasília em situação suscetível a serem fonte sanguínea para estes insetos, já que estes animais tendem a viajar longe de seus ninhos de nidificação para alimentação (Lehane et al., 1992).

Conduzimos também sorologia pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com as amostras de soro. Contudo, para esta técnica diagnóstica, os animais foram negativos. Os dados completos podem ser vistos na tese apresentada à FMB/Unesp.

7. RECOMENDAÇÕES

Nossas recomendações visam construir um elo entre os achados laboratoriais conduzidos por nós e a manutenção da saúde e bem-estar dos animais envolvidos na pesquisa – os PNH –, bem como dos demais animais do zoológico que podem ser suscetíveis à infecção, e, possivelmente, servir de reservatório da doença. Além disso, nossas recomendações são pensadas devido à intensa atividade humana próximo ao zoológico, tanto de moradia como de comércio, bem como da circulação de animais domésticos, como os cães, que também são suscetíveis à infecção por tripanosomas.

À equipe do zoológico: recomendamos reforçar a limpeza e manutenção tanto dentro como fora dos recintos e locais onde os PNH vivem e dormem, afim de restringir os possíveis locais de nidificação destes insetos. Apesar destes insetos serem, em sua maioria, de hábitos noturnos, eles tendem a se esconder em locais sombreados e protegidos do sol durante o dia. Recomendamos a constante limpeza e observação em locais que apresentam estas características. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, estes devem ser encaminhados ao centro de controle de vetores.

Ao centro de controle de vetores: recomendamos realizar buscas ativas em recintos (dentro e fora destes espaços), bem como por prováveis pontos de nidificação, como serrapilheira, pequenas construções cercadas de vegetação ao entorno e na própria vegetação. É sabido que triatomíneos constroem ninhos em palmeiras e demais árvores de porte semelhante. É necessário monitoramento constante destas plantas, visto que elas são constantemente utilizadas como ornamentação. Isso inclui a busca ativa por triatomíneos em espaços ao redor do zoológico, visto que os insetos podem construir ninhos em outros espaços e voar durante a noite para dentro do zoológico para se alimentar dos animais. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, recomendamos realizar uma busca por tripanosomas para verificar se há manutenção dos parasitos no ambiente.

À secretaria de meio ambiente: construir um plano de busca constante no município, em parceria com outros órgãos municipais e estadual, visando a busca dos triatomíneos por toda a extensão do município.

Sabemos que poderá haver limitações quanto a aplicabilidade destas recomendações. Contudo, a simples manutenção da limpeza e atenção nos recintos dos animais do zoológico irão colaborar enormemente para reduzir a transmissão de tripanosomas aos PNH, bem como para os demais animais do zoológico, o que indiretamente contribuirá também para a prevenção de doenças aos seres humanos que co-habitam com estes animais durante suas atividades laborais e à população circulante dentro e ao entorno do Zoo.

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda a equipe do Zoo Brasília pela colaboração pela coleta das amostras para nossa pesquisa, em especial ao Francisco Feijó Paiva, Fernanda Fontoura e Felipe Reis, por sua disponibilidade, receptividade e colaboração.

9. REFERÊNCIAS

- Benassi JC, Benvenga GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Exp Parasitol.* 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.
- Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(5):768-770.
- Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors.* 2014; 7(501):1-7.
- Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 1992;52(1):27-38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h

Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. 2019;50(36):1-7.

Minuzzi-Souza TT, Nitz N, Knox MB, et al. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. *Parasit Vectors.* 2016;9:39. Published 2016 Jan 26. doi:10.1186/s13071-016-1334-7

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989b; 27(7):1477-1482.

Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herreni* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1996; 80:119-123.

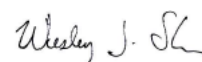
Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malaria, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, (ed). The laboratory primate: handbook of experimental animals. 2005;Elsevier.

Reis FC, Minuzzi-Souza TTC, Neiva M, et al. Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasília Zoo, Federal District, Brazil. *Vet Med Sci.* 2019;00:1-9.

Vireira M, Torrico F, Truysen C, Alonso-Veja C, Solano M, Cartier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 5:574-583.

Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(2):157-159. doi:10.1590/s0074-02762000000200004

Botucatu, outubro de 2020.



Me. Wesley J Santos



Profa. Dra. Simone B Lucheis

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE DOENÇAS TROPICAIS

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL DE BAURU

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
LABORATÓRIO REGIONAL DE BAURU

Relatório de atividades e recomendações

**Pesquisa com primatas não-humanos do Parque
Municipal Quinzinho de Barros (Zoo Sorocaba)**

Baseado em dados de pesquisa de doutorado
de Me. Wesley J Santos, sob orientação de Dra.
Simone B Lucheis e co-orientação de Dra.
Virgínia B R Pereira e Dra. Maria I M Medeiros.

Outubro de 2020

SUMÁRIO

1. A quem se destina	3
2. Resumo	3
3. Introdução e objetivos	3
4. Metodologia.....	4
4.1. Questões de ética.....	4
4.2. Amostras	4
4.3. Biologia molecular	5
5. Resultados	5
6. Discussão	7
7. Recomendações	7
8. Agradecimentos	9
9. Referências.....	9

1. A QUEM SE DESTINA

Este documento é destinado à equipe técnica responsável pelo manejo de animais, em especial aos primatas não-humanos, alvos deste relatório, do **Parque Municipal Quinzinho de Barros**, bem como para a Secretaria de Meio Ambiente e o Centro de Controle de Vetores da cidade de **Sorocaba, SP**.

Apresentamos dados ainda não publicados e sua divulgação não deve ser realizada sem a anuência dos autores deste relatório, vedada apenas à circulação interna. Todos os detalhes da pesquisa podem ser lidos na íntegra na tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP, a qual estará disponível no Repositório da UNESP.

2. RESUMO

A emergência e reemergência de doenças afetam não somente os humanos, mas também os animais, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro. Em parceria com o Zoo Sorocaba, investigamos a presença de tripanosomas, entre os quais os causadores da doença de Chagas, a partir de amostras de primatas não-humanos pertencentes ao plantel do zoológico. Nossos achados apontam para uma ampla circulação de tripanosomas entre os primatas estudados, além de sustentar a hipótese da presença de insetos vetores (triatomíneos) que estariam usando estes animais como fonte de sangue, transmitindo os parasitos para estes animais. Nosso intuito é recomendar ações de busca ativa de triatomíneos nos recintos e espaços próximos aos locais onde os primatas estão alocados, já que outras espécies animais do zoológico podem estar suscetíveis à infecção, além de que ninhos de nidificação destes insetos nestes espaços podem oferecer riscos à saúde da população humana que reside próximo ao zoológico.

3. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os tripanosomas são protozoários de grande interesse médico e veterinário. O mais conhecido deles, *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, enfermidade de atinge cerca de 5 milhões de pessoas apenas no Brasil (Ministério da Saúde, 2019).

Os animais silvestres, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro, também são suscetíveis à infecção por tripanosomas, sendo expostos principalmente ao entrarem em contato com triatomíneos, insetos que utilizam de mamíferos para obtenção de sangue (Ministério da Saúde, 2019). Dezenas de espécies de triatomíneos já foram identificadas no país, muitas das quais conseguem transmitir o parasito (Fiocruz, 2014).

Os primatas não-humanos (PNH) são naturalmente suscetíveis à infecção por tripanosomas (Ziccardi et al., 2000; Philipp e Purcell, 2005) e a busca nestes animais serve como um indicativo da circulação do parasito no ambiente e, de forma indireta, pode indicar a presença de insetos vetores nestes espaços.

Assim, conduzimos pesquisa na busca por tripanosomas em amostras de PNH em parceria com o Parque Municipal Quinzinho de Barros (Zoo Sorocaba), na finalidade de identificar os animais positivos e suscetíveis, além de criar recomendações para a equipe do zoológico e demais responsáveis.

4. METODOLOGIA

4.1. Questões de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina (FMB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Botucatu, São Paulo, sob número 1213/2017, além de ter sido aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob número 57382-3. A pesquisa também teve aprovação do Zoo Sorocaba, seguindo os trâmites internos da instituição.

4.2. Amostras

Recebemos, entre maio de 2017 a maio de 2019, amostras de sangue total, swab conjuntival, soro e lâminas de esfregaço por extensão, de 48 PNH, como descrito na TABELA 1.

TABELA 1: relação de amostras por espécie de primata não-humano (PNH) recebidas do Zoo Sorocaba.

Espécie	Amostra	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Alouatta caraya</i>		5	5	5	5	20
<i>Alouatta guariba</i>		4	4	4	4	16
<i>Alouatta seniculus</i>		3	3	3	3	12
<i>Aotus trivirgatus</i>		2	2	2	2	8
<i>Ateles chamek</i>		3	3	3	3	12
<i>Ateles marginatus</i>		11	10	11	11	43
<i>Brachyteles arachnoides</i>		4	4	4	4	16
<i>Callicebus vieri</i>		4	4	4	4	16
<i>Callithrix jacchus</i>		1	1	1	1	4
<i>Cebus olivaceus</i>		1	1	1	1	4
<i>Chiropotes utahicki</i>		1	1	1	0	3
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>		3	0	3	3	9
<i>Papio hamadryas</i>		2	2	1	1	6
<i>Sapajus nigratus</i>		2	2	2	2	8
<i>Sapajus xanthosternus</i>		2	2	2	2	8
Total		48	48	44	47	185

4.3. Biologia molecular

Extraímos o DNA das amostras de sangue total, a partir de um kit comercial, e swab conjuntival, a partir de adaptações de Benassi et al. (2017). Submetemos as amostras extraídas na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na busca de DNA de tripanosomatídeos utilizando os *primers* HSP70 (Hernandez et al., 2014) e SSU561 (Noyes et al., 1996), bem como na busca por DNA de *T. cruzi* utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2 (Virreira et al., 2003; Moser et al., 1989) e 121/122 (Fitzwater et al., 2008). Todas as amostras foram submetidas à eletroforese para a identificação das amostras positivas.

5. RESULTADOS

Dos 48 PNH do estudo, extraiu-se o DNA de 48 amostras de sangue total e 44 amostras de swab conjuntival (três amostras foram perdidas durante o trabalho) e, após, submetidas à PCR. Destas, 16 PNH apresentaram positividade para, ao

menos, uma das técnicas moleculares. Todos os detalhes estão descritos na

TABELA 2.

TABELA 2: Resultado da PCR a partir das amostras extraídas de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Sorocaba. As amostras foram identificadas seguindo os dados recebidos nos tubos e dados de coleta enviados pelo zoológico durante a coleta. Os campos sombreados apenas servem para facilitar a visualização dos resultados.

Espécie	Amostra	TCZ1/TCZ2		121/122		HSP70		SSU561	
		Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab
<i>Alouatta caraya</i>									
	3072	0		1		0		0	
	3720	0	0	0	1	0	0	0	0
	3782	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Alouatta guariba</i>	1E32	0	0	0	0	1	0	0	0
	2694	0	0	0	0	1	0	0	0
	3498	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Alouatta seniculus</i>	3941	0	0	1	0	1	0	0	0
	2397	0		0	1	0	0	0	0
<i>Ateles chamek</i>									
	2283	0	0	1	1	1	0	0	0
	2790	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Ateles marginatus</i>									
	3958	0		0	1	0	0	0	0
	F9CF	0		0	1	0	0	0	0
	FC1D	0		0	1	0	0	0	0
<i>Brachyteles arachnoides</i>	2FB8	0		0	1	0	0	0	0
	2CFC	0		0	0	1	1	0	0
	3607	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	16	0	0	3	9	8	1	0	0

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho revela a presença de tripanosomas nos PNH do Zoo Sorocaba. O fato de termos encontrado trechos de DNA de tripanosomas nas amostras de sangue e *swab* conjuntival, aponta para a circulação do parasito no animal. Apesar de haver a possibilidade de uma reagudização em alguns casos, também é um indicativo de uma provável infecção recente nestes animais, o que remete para a possibilidade de que triatomíneos tenham construído ninhos próximos ou dentro destes recintos.

A Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) já recebeu mais de 200 notificações de triatomíneos feitas em Sorocaba entre 2014 a 2015 (SUCEN, 2016), reforçando a ideia da presença de triatomíneos dentro do zoológico que, no caso do Zoo Sorocaba, está completamente inserido em ambiente urbano. É sabido que triatomíneos tendem a migrar para mais próximo de habitações humanas em condições adversas (Garrido et al., 2019), principalmente na busca por novas fontes de alimentação, como animais domésticos e até mesmo o humano (Lazzari et al., 2013).

Apesar de nossos trabalhos terem sido conduzidos em PNH, o fato de termos encontrado estes animais positivos pode indicar que a possível presença de triatomíneos pode colocar outros animais do Zoo Sorocaba em situação suscetível a serem fonte sanguínea para estes insetos, já que estes animais tendem a viajar longe de seus ninhos de nidificação para alimentação (Lehane et al., 1992).

Conduzimos também buscas parasitológicas nas lâminas de esfregaço por extensão e sorologia pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com as amostras de soro. Contudo, para estas técnicas diagnósticas, os animais foram negativos. Os dados completos podem ser vistos na tese apresentada à FMB/Unesp.

7. RECOMENDAÇÕES

Nossas recomendações visam construir um elo entre os achados laboratoriais conduzidos por nós e a manutenção da saúde e bem-estar dos animais envolvidos na pesquisa – os PNH –, bem como dos demais animais do zoológico

que podem ser suscetíveis à infecção, e, possivelmente, servir de reservatório da doença. Além disso, nossas recomendações são pensadas devido à intensa atividade humana próximo ao zoológico, tanto de moradia como de comércio, bem como da circulação de animais domésticos, como os cães, que também são suscetíveis à infecção por tripanosomas.

À equipe do zoológico: recomendamos reforçar a limpeza e manutenção tanto dentro como fora dos recintos e locais onde os PNH vivem e dormem, afim de restringir os possíveis locais de nidificação destes insetos. Apesar destes insetos serem, em sua maioria, de hábitos noturnos, eles tendem a se esconder em locais sombreados e protegidos do sol durante o dia. Recomendamos a constante limpeza e observação em locais que apresentam estas características. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, estes devem ser encaminhados ao centro de controle de vetores.

Ao centro de controle de vetores: recomendamos realizar buscas ativas em recintos (dentro e fora destes espaços), bem como por prováveis pontos de nidificação, como serrapilheira, pequenas construções cercadas de vegetação ao entorno e na própria vegetação. É sabido que triatomíneos constroem ninhos em palmeiras e demais árvores de porte semelhante. É necessário monitoramento constante destas plantas, visto que elas são constantemente utilizadas como ornamentação. Isso inclui a busca ativa por triatomíneos em espaços ao redor do zoológico, visto que os insetos podem construir ninhos em outros espaços e voar durante a noite para dentro do zoológico para se alimentar dos animais. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, recomendamos realizar uma busca por tripanosomas para verificar se há manutenção dos parasitos no ambiente.

À secretaria de meio ambiente: construir um plano de busca constante no município, em parceria com outros órgãos municipais e estadual, visando a busca dos triatomíneos por toda a extensão do município.

Sabemos que poderá haver limitações quanto a aplicabilidade destas recomendações. Contudo, a simples manutenção da limpeza e atenção nos recintos dos animais do zoológico irão colaborar enormemente para reduzir a transmissão de tripanosomas aos PNH, bem como para os demais animais do

zoológico, o que indiretamente contribuirá também para a prevenção de doenças aos seres humanos que co-habitam com estes animais durante suas atividades laborais e à população circulante dentro e ao entorno do Zoo.

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda a equipe do Zoo Sorocaba pela colaboração pela coleta das amostras para nossa pesquisa, em especial ao veterinário responsável Dr. Marcos Tokuda, por sua disponibilidade e colaboração.

9. REFERÊNCIAS

- Benassi JC, Benvença GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. Exp Parasitol. 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.
- Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79(5):768-770.
- Garrido R, Bacigalupo A, Peña-Gómez F. et al. Potential impact of climate change on the geographical distribution of two wild vectors of Chagas disease in Chile: Mepraia spinolai and Mepraia gajardoi. Parasites Vectors 2019;12(478).
- Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasites & Vectors. 2014; 7(501):1-7.
- Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. Behavioural biology of Chagas disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108 Suppl 1(Suppl 1):34-47. doi:10.1590/0074-0276130409
- Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. Acta Trop. 1992;52(1):27-38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h
- Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. 2019;50(36):1-7.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989b; 27(7):1477-1482.

Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herrerii* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1996; 80:119-123.

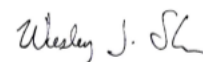
Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malaria, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, (ed). The laboratory primate: handbook of experimental animals. 2005;Elsevier.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. Vigilância entomológica de vetores. Situação atual. Secretaria do Estado da Saúde. Governo do Estado de São Paulo. 2016. Internet. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/doenca-de-chagas/situacao-atual>. Acessado em: 03/03/2020.

Virreira M, Torrico F, Truysen C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003; 5:574-583.

Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(2):157-159. doi:10.1590/s0074-02762000000200004

Botucatu, outubro de 2020.



Me. Wesley J Santos



Profa. Dra. Simone B Lucheis

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE DOENÇAS TROPICAIS

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL DE BAURU

INSTITUTO ADOLFO LUTZ
LABORATÓRIO REGIONAL DE BAURU

Relatório de atividades e recomendações

Pesquisa com primatas não-humanos do Zoológico
Municipal de Curitiba (Zoo Curitiba)

Baseado em dados de pesquisa de doutorado
de Me. Wesley J Santos, sob orientação de Dra.
Simone B Lucheis e co-orientação de Dra.
Virgínia B R Pereira e Dra. Maria I M Medeiros.

Outubro de 2020

SUMÁRIO

1. A quem se destina	3
2. Resumo	3
3. Introdução e objetivos	3
4. Metodologia	4
4.1. Questões de ética	4
4.2. Amostras	4
4.3. Biologia molecular	5
5. Resultados	5
6. Discussão	6
7. Recomendações	7
8. Agradecimentos	8
9. Referências	8

1. A QUEM SE DESTINA

Este documento é destinado à equipe técnica responsável pelo manejo de animais, em especial aos primatas não-humanos, alvos deste relatório, do Zoológico Municipal de Curitiba, bem como para a Secretaria de Meio Ambiente e o Centro de Controle de Vetores da cidade de Curitiba, PR.

Apresentamos dados ainda não publicados e sua divulgação não deve ser realizada sem a anuência dos autores deste relatório, vedada apenas à circulação interna. Todos os detalhes da pesquisa podem ser lidos na íntegra na tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB - UNESP, a qual estará disponível no Repositório da UNESP.

2. RESUMO

A emergência e reemergência de doenças afetam não somente os humanos, mas também os animais, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro. Em parceria com o Zoo Curitiba, investigamos a presença de tripanosomas, entre os quais os causadores da doença de Chagas, a partir de amostras de primatas não-humanos pertencentes ao plantel do zoológico. Nossos achados apontam para uma ampla circulação de tripanosomas entre os primatas estudados, além de sustentar a hipótese da presença de insetos vetores (triatomíneos) que estariam usando estes animais como fonte de sangue, transmitindo os parasitos para estes animais. Nosso intuito é recomendar ações de busca ativa de triatomíneos nos recintos e espaços próximos aos locais onde os primatas estão alocados, já que outras espécies animais do zoológico podem estar suscetíveis à infecção, além de que ninhos de nidificação destes insetos nestes espaços podem oferecer riscos à saúde da população humana que reside próximo ao zoológico.

3. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os tripanosomas são protozoários de grande interesse médico e veterinário. O mais conhecido deles, *Trypanosoma cruzi* é o causador da doença de Chagas, enfermidade de atinge cerca de 5 milhões de pessoas apenas no Brasil (Ministério da Saúde, 2019).

Os animais silvestres, tanto os de vida livre como os mantidos em cativeiro, também são suscetíveis à infecção por tripanosomas, sendo expostos principalmente ao entrarem em contato com triatomíneos, insetos que utilizam de mamíferos para obtenção de sangue (Ministério da Saúde, 2019). Dezenas de espécies de triatomíneos já foram identificadas no país, muitas das quais conseguem transmitir o parasito (Fiocruz, 2014).

Os primatas não-humanos (PNH) são naturalmente suscetíveis à infecção por tripanosomas (Ziccardi et al., 2000; Philipp e Purcell, 2005) e a busca nestes animais serve como um indicativo da circulação do parasito no ambiente e, de forma indireta, pode indicar a presença de insetos vetores nestes espaços.

Assim, conduzimos pesquisa na busca por tripanosomas em amostras de PNH em parceria com o Zoológico Municipal de Curitiba (Zoo Curitiba), na finalidade de identificar os animais positivos e suscetíveis, além de criar recomendações para a equipe do zoológico e demais responsáveis.

4. METODOLOGIA

4.1. Questões de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina (FMB) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Botucatu, São Paulo, sob número 1213/2017, além de ter sido aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), sob número 57382-3. A pesquisa também teve aprovação do Zoo Curitiba, seguindo os trâmites internos da instituição.

4.2. Amostras

Recebemos, entre maio de 2017 a maio de 2019, amostras de sangue total, swab conjuntival, soro e lâminas de esfregaço por extensão, de 48 PNH, como descrito na TABELA 1.

TABELA 1: relação de amostras por espécie de primata não-humano (PNH) recebidas do Zoo Curitiba.

Espécie	Amostra	Sangue	Soro	Swab	Esfregaço	Total
<i>Ateles chamek</i>		8	8	2	8	26
<i>Callithrix penicillata</i>		5	4	5	4	18
<i>Saimiri sciureus</i>		1	1	1	1	4
<i>Sapajus apella</i>		3	3	3	3	12
Sem identificação		1	1	1	1	4
Total	18	18	17	12	17	64

4.3. Biologia molecular

Extraímos o DNA das amostras de sangue total, a partir de um kit comercial, e swab conjuntival, a partir de adaptações de Benassi et al. (2017). Submetemos as amostras extraídas na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na busca de DNA de tripanosomatídeos utilizando os *primers* HSP70 (Hernandez et al., 2014) e SSU561 (Noyes et al., 1996), bem como na busca por DNA de *T. cruzi* utilizando os *primers* TCZ1/TCZ2 (Virreira et al., 2003; Moser et al., 1989) e 121/122 (Fitzwater et al., 2008). Todas as amostras foram submetidas à eletroforese para a identificação das amostras positivas.

5. RESULTADOS

Dos 18 PNH do estudo, extraiu-se o DNA de 18 amostras de sangue total e 12 amostras de swab conjuntival (três amostras foram perdidas durante o trabalho) e, após, submetidas à PCR. Destas, 11 PNH apresentaram positividade para, ao menos, uma das técnicas moleculares. Todos os detalhes estão descritos na TABELA 2.

TABELA 2: Resultado da PCR a partir das amostras extraídas de sangue total e swab conjuntival dos primatas não-humanos (PNH) do Zoo Curitiba. As amostras foram identificadas seguindo os dados recebidos nos tubos e dados de coleta enviados pelo zoológico durante a coleta. Os campos sombreados apenas servem para facilitar a visualização dos resultados.

Espécie	Amostra*	TCZ1/TCZ2		121/122		HSP70		SSU561	
		Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab	Sangue	Swab
<i>Ateles chamek</i>									

267433	0		1		0		0		
289626	0		1		0		0		
208968	0		1		0		0		
168072	0		1		0		0		
284776	0		1		0		0		
203935	0		1		0		0		
287039	0	0	1	0	0	0	0	0	0
290566	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Callithrix penicillata</i>									
030027	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Sapajus apella</i>									
427872	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Sem identificação									
052567	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	11	0	0	7	2	1	1	0	1

*: apenas os seis últimos números de registro enviados foram informados na tabela.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho revela a presença de tripanosomas nos PNH do Zoo Curitiba. O fato de termos encontrado trechos de DNA de tripanosomas nas amostras de sangue e swab conjuntival, aponta para a circulação do parasito no animal. Apesar de haver a possibilidade de uma reagudização em alguns casos, também é um indicativo de uma provável infecção recente nestes animais, o que remete para a possibilidade de que triatomíneos tenham construído ninhos próximos ou dentro destes recintos.

O estado do Paraná possui um longo histórico de doença de Chagas crônica em sua população e, apesar de Curitiba não apresentar casos da doença, a constituição paisagística do estado é propícia para a manutenção do vetor no ambiente (Ferro e Silva et al., 2018). Com clima mais ameno e uma das capitais com médias de temperaturas mais baixas do Brasil, o triatomíneo tende a nidificar em pontos próximos de onde obtém o seu alimento, evitando voar para longas distâncias para alimentação (Lehane et al., 1992), o que pode indicar que os ninhos de triatomíneos possam estar próximos ou dentro dos recintos dos animais amostrados.

Apesar de nossos trabalhos terem sido conduzidos em PNH, o fato de termos encontrado estes animais positivos pode indicar que a possível presença de triatomíneos pode colocar outros animais do Zoo Curitiba em situação suscetível a serem fonte sanguínea para estes insetos, já que estes animais tendem a viajar longe de seus ninhos de nidificação para alimentação (Lehane et al., 1992).

Conduzimos também buscas parasitológicas nas lâminas de esfregaço por extensão e sorologia pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com as amostras de soro. Contudo, para estas técnicas diagnósticas, os animais foram negativos. Os dados completos podem ser vistos na tese apresentada à FMB/Unesp.

7. RECOMENDAÇÕES

Nossas recomendações visam construir um elo entre os achados laboratoriais conduzidos por nós e a manutenção da saúde e bem-estar dos animais envolvidos na pesquisa – os PNH –, bem como dos demais animais do zoológico que podem ser suscetíveis à infecção, e, possivelmente, servir de reservatório da doença. Além disso, nossas recomendações são pensadas devido à intensa atividade humana próximo ao zoológico, tanto de moradia como de comércio, bem como da circulação de animais domésticos, como os cães, que também são suscetíveis à infecção por tripanosomas.

À equipe do zoológico: recomendamos reforçar a limpeza e manutenção tanto dentro como fora dos recintos e locais onde os PNH vivem e dormem, afim de restringir os possíveis locais de nidificação destes insetos. Apesar destes insetos serem, em sua maioria, de hábitos noturnos, eles tendem a se esconder em locais sombreados e protegidos do sol durante o dia. Recomendamos a constante limpeza e observação em locais que apresentam estas características. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, estes devem ser encaminhados ao centro de controle de vetores.

Ao centro de controle de vetores: recomendamos realizar buscas ativas em recintos (dentro e fora destes espaços), bem como por prováveis pontos de nidificação, como serrapilheira, pequenas construções cercadas de vegetação ao entorno e na própria vegetação. É sabido que triatomíneos constroem ninhos

em palmeiras e demais árvores de porte semelhante. É necessário monitoramento constante destas plantas, visto que elas são constantemente utilizadas como ornamentação. Isso inclui a busca ativa por triatomíneos em espaços ao redor do zoológico, visto que os insetos podem construir ninhos em outros espaços e voar durante a noite para dentro do zoológico para se alimentar dos animais. Em caso de encontrar insetos triatomíneos, recomendamos realizar uma busca por tripanosomas para verificar se há manutenção dos parasitos no ambiente.

À secretaria de meio ambiente: construir um plano de busca constante no município, em parceria com outros órgãos municipais e estadual, visando a busca dos triatomíneos por toda a extensão do município.

Sabemos que poderá haver limitações quanto a aplicabilidade destas recomendações. Contudo, a simples manutenção da limpeza e atenção nos recintos dos animais do zoológico irão colaborar enormemente para reduzir a transmissão de tripanosomas aos PNH, bem como para os demais animais do zoológico, o que indiretamente contribuirá também para a prevenção de doenças aos seres humanos que co-habitam com estes animais durante suas atividades laborais e à população circulante dentro e ao entorno do Zoo.

8. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda a equipe do Zoo Curitiba pela colaboração pela coleta das amostras para nossa pesquisa, em especial à Oneida Lacerda e Manoel Lucas Javorouski, pela disponibilidade e colaboração.

9. REFERÊNCIAS

Benassi JC, Benvença GU, Ferreira HL, Pereira VF, Keid LB, Soares R, Oliveira TMFS., 2017. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. Exp Parasitol. 177:93-97. doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.004.

Fiocruz. Instituto Oswaldo Cruz. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

Fitzwater S, Calderon M, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, Gilman RH, Bern C. Short report: polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(5):768-770.

Hernandez C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez D. Identification of six new World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors.* 2014; 7(501):1-7.

Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 1992;52(1):27-38. doi:10.1016/0001-706x(92)90004-h

Ministério da Saúde. Brasil. Boletim epidemiológico: Panorama da doença de Chagas no Brasil. 2019;50(36);1-7.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989b; 27(7):1477-1482.

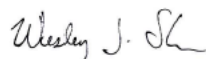
Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herrerii* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1996; 80:119-123.

Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malaria, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, (ed). *The laboratory primate: handbook of experimental animals.* 2005;Elsevier.

Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 5:574-583.

Ziccardi M, Lourenço-De-Oliveira R, Lainson R, Brígido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(2):157-159. doi:10.1590/s0074-02762000000200004

Botucatu, outubro de 2020.



Me. Wesley J Santos



Profa. Dra. Simone B Lucheis