



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

Wesley José dos Santos

***Trypanosoma cruzi* E OUTROS TRIPANOSOMAS EM
PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE
ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU, SÃO PAULO, BRASIL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

**Botucatu
2016**

Wesley José dos Santos

***Trypanosoma cruzi* E OUTROS
TRIPANOSOMAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS
PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO
MUNICIPAL DE BAURU, SÃO PAULO, BRASIL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis
Coorientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Wesley José dos.

Trypanosoma cruzi e outros tripanosomas em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil / Wesley José dos Santos. - Botucatu, 2016

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

1. Trypanosoma cruzi. 2. Primatas não humanos. 3. Macaco. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Técnica indireta de fluorescência para anticorpo.

Palavras-chave: Diagnóstico; Macaco; PCR; RIFI; Tripanosoma.

Dedicatória

DEDICO ESSE TRABALHO A TODOS OS HOMENS E MULHERES QUE ME
EMPRESTARAM SEUS OMBROS E SUAS MENTES PARA QUE EU PUDESSE
ENXERGAR MAIS LONGE. POIS A VERDADE É COMO AS ÁGUAS DE UM
OCEANO: ESTAMOS DE PÉ EM SUAS MARGENS, DESCOBRINDO AOS POUCOS
O QUE ELA NOS TRAZ. FELIZMENTE AS ÁGUAS NOS PARECE
CONVIDATIVA.

MEUS PAIS, IRMÃ E MEUS AVÓS, ONDE ALGUNS CONHECIMENTOS SÓ SÃO
OBTIDOS PELA CONVIVÊNCIA, NÃO SENDO ENCONTRADOS EM LIVROS E
ARTIGOS. SÃO ESSES CONHECIMENTOS QUE LEVAREI POR TODA A VIDA.
AMO VOCÊS.

E, TAMBÉM, A TODOS ÀQUELES QUE ME ACOMPANHARAM E ME
ACOMPANHAM EM COMPREENDER MAIS SOBRE ESSA INCRÍVEL DAMA DE
QUASE CINCO SÉCULOS DE IDADE: A CIÊNCIA.

Agradecimientos

SERIA IMPOSSÍVEL LISTAR TODOS OS NOMES QUE, DIRETA OU INDIRETAMENTE, ME AJUDARAM A FORMAR MINHAS OPINIÕES E MEUS CONHECIMENTOS. TODAVIA, ALGUNS NOMES MERECEM DESTAQUE AO AJUDAR A GALGAR ALGUNS PASSOS NESSA LONGA TRILHA QUE ESTOU PERCORRENDO.

MEUS PAIS, EDISON E MARISTELA, QUE ACREDITARAM EM MIM DESDE A DECISÃO DE MUDAR DE CIDADE PARA CURSAR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS EM BAURU. APESAR DA DISTÂNCIA SER PEQUENA, SAIR DO SEIO FAMILIAR EM BUSCA DE MEUS OBJETIVOS FORAM UM DOS MAIORES PASSOS QUE DEI EM MINHA VIDA. OBRIGADO POR TUDO QUE FIZERAM POR MIM!

MINHA IRMÃ, STHÉFANY, A MAIS BONITA QUE TENHO (HUAHUAHUA). APESAR DE TER CRESCIDO TANTO E A COMUNICAÇÃO SE PASSAR QUASE QUE EXCLUSIVAMENTE PELO WHATSAPP E FACEBOOK, SEMPRE SERÁ MEU ‘BIÉN’ COM AQUELA CARINHA FELIZ OLHANDO PARA MIM. AMO VOCÊ!

PARA SONIA, ADROALDO E LÁISA, QUE ME RECEBERAM CALOROSAMENTE EM SEU LAR E EM SEUS CORAÇÕES. E POR TEREM CUIDADO TÃO BEM DE MINHA LOIRINHA. OBRIGADO!

TODOS OS MEUS AMIGOS DE ESCOLA (SIM, PESSOAL DO ‘COTA’) QUE AINDA MANTENHO CONTATO E OS VEJO SEMPRE QUE POSSO. PARTE DE MINHA FORMAÇÃO COMO PESSOA DEVO A VOCÊS (EU ACHO!). O GRUPO THEDEIWZ AINDA VIVE! 🤪

AMIGOS DE FACULDADE, OS QUAIS ME ACOMPANHARAM E ATÉ HOJE ME ACOMPANHAM EM RISADAS E MOMENTOS DIVERTIDOS. DESCOBRI QUE O MUNDO É MUITO ESTRANHO, MAS FASCINANTE, COM VOCÊS. OBRIGADO! 😊

AO INCRÍVEL PESSOAL DO POMPOSO LABORATÓRIO DE SANIDADE ANIMAL (LASAB), DO APTA, OS QUAIS SÃO MUITO MAIS QUE ‘MEROS COLEGAS DE TRABALHO’, SENDO AMIGOS DE CONFIANÇA E ‘PAU PARA TODA OBRA’. MF E MIRIAN (SEMPRE A DUPLA DE IRMÃS NÃO-IRMÃS QUE BRIGAM COMO IRMÃS E FAZEM UM SHOW DE *STAND UP COMEDY* NO LABORATÓRIO), GABRIELA (PARA SEMPRE MELHOR ESTRANGEIRA EVER!),

FÁBIO (E SEU CARIOQUÊS), DANI (O PURITANISMO EM PESSOA #SQN) E AMANDA (A NOVATA, MAS QUE PARECE QUE PEGOU O JEITO DAS COISAS). COM CERTEZA MUITOS TIJOLOS DO CONHECIMENTO QUE CONSTRUÍ NESSES ANOS DE IC E MESTRADO FORAM FEITOS POR VOCÊS. OS ADORO ENORMEMENTE!

A MINHA ORIENTADORA SIMONE LUCHEIS, QUE CONFIOU EM MIM DESDE A INICIAÇÃO CIENTÍFICA E NO MESTRADO E QUE PERMITE FAZER EXPERIÊNCIAS COM GELO SECO SEMPRE QUE CHEGA ALGO REFRIGERADO NO LABORATÓRIO. E PARA MINHA CO-ORIENTADORA VIRGÍNIA PEREIRA, QUE ME ACOLHEU EM SUA ‘CRECHE’ E CONSIDERO O LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO IAL COMO UMA SEGUNDA CASA CIENTÍFICA! OBRIGADO POR TUDO!

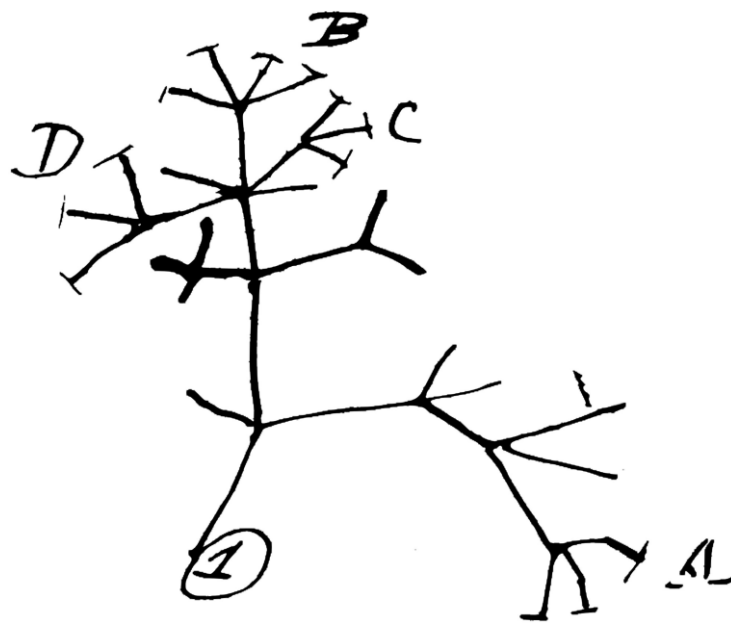
TODOS OS AMIGOS QUE CONHECI NESSE CURTO ESPAÇO DE TEMPO NO MESTRADO: DÉRBIS, FRAN, BÁRBARA, KETHLYN, AGHATA E LAÍS. SEM CONTAR TODOS AQUELES EM BOTUCATU, DOS CURSOS DE FÉRIAS E DOS ENCONTROS DA PÓS. LEMBRANÇAS TAMBÉM AO TIÃO, QUASE UM MÉDICO PARTICULAR DE TODA ESSA GENTE, SEMPRE COMPARTILHANDO SEUS SABERES. A TODOS E TODAS, MUITO OBRIGADO!

E, CLARO, A MINHA ‘LOIRINHA, DE OLHINHOS AZUIS’ QUE FOI E SEMPRE SERÁ MINHA PRIMEIRA NAMORADINHA, LÍVIA. CAMINHAR NESSA ESTRADA DO CONHECIMENTO, TENTANDO ENTENDER O QUE FAZER A CADA PASSO DADO FOI MUITO MAIS BONITO E MAIS RECONFORTANTE COM VOCÊ AO MEU LADO. APESAR DO SEU SANGUE ITALIANO FALAR MAIS ALTO ÀS VEZES, NÃO PENSO EM ESTAR FAZENDO MAIS NADA SEM VOCÊ COMIGO. VOCÊ SABE QUE MEU CORAÇÃO É TEU... AMO-TE! ❤️

FINALIZANDO, À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), POR COLABORAR EM ALCANÇAR MEUS OBJETIVOS.

P.S.: PARA AS FUTURAS GERAÇÕES QUE LEREM ESSE CONTEÚDO, NÃO LIGUEM PARA O LINGUAJAR. ÉRAMOS ESTRANHOS MESMO... E VISITE MEU BLOG (WWW.NANO-MACRO.COM)! 🤪

I think



“Cada célula é um triunfo da seleção natural.

E nós somos feitos de trilhões de células. Dentro de
nós, há um pequeno universo”.

“

(Carl Sagan)

Resumo

Santos. WJ. ***Trypanosoma cruzi* e outros tripanosomas em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil.** 83p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2016.

Os animais silvestres, tanto os de vida livre como os de cativeiro, podem ser reservatórios e portadores de diversos protozoários, como os integrantes do gênero *Trypanosoma*. *Trypanosoma cruzi* é um dos mais conhecidos tripanosomas, agente etiológico da doença de Chagas. Manifesta-se clinicamente com um caráter multifacetado, afetando humanos e várias espécies de animais domésticos e silvestres, como os primatas não humanos, que podem constituir-se em reservatórios do parasito. Em relação aos primatas neotropicais, ocorrem diferentes infecções por tripanosomas que também acometem humanos. No presente estudo, foram coletadas amostras de sangue de 39 primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru para pesquisa sorológica anti-*T. cruzi* e molecular de *T. cruzi* utilizando-se *primers* da região de kDNA de *T. cruzi* (TCZ1 e TCZ2) e da região codificadora da proteína de choque térmico (hsp70). Todos os animais foram negativos ao teste sorológico anti-*T. cruzi* e molecular para *T. cruzi* com os *primers* da região de kDNA. Porém, com a utilização de *primers* para hsp70, 11 dos 39 (28,2%) animais foram positivos. Os resultados do sequenciamento apresentaram similaridade para protozoários do gênero *Trypanosoma*. Apesar das dificuldades em se chegar à espécie circulante de tripanosoma entre os primatas, conclui-se que vetores triatomíneos e/ou moscas hematófagas podem estar circulando no ambiente dos animais e que ações de vigilância e busca dos mesmos são altamente recomendadas.

Palavras-chave: primatas não-humanos, macaco, diagnóstico, tripanosomas.

Abstract

Santos. WJ. ***Trypanosoma cruzi* and other trypanosomes in non-human primates from Zoo Park Municipal of Bauru, São Paulo, Brazil.** 83p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2016.

Wild animals, both free-living and the captive ones, can be reservoirs and carriers of various protozoa, such as members of the genus *Trypanosoma*. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is one of the most known trypanosomes. Chagas disease is manifested clinically with a multifaceted character, affecting humans and several species of wild and domestic animals, such as non-human primates, which can be reservoirs of this parasite. Regarding the Neo-tropical primates, different infections occur by trypanosomes that also can affect humans. In this study, 39 blood samples were collected from nonhuman primates from Zoo Park Municipal of Bauru, São Paulo, Brazil, by serological and molecular analysis for *T. cruzi* infection using specific primers for kDNA region (TCZ1 and TCZ2) and the region encoding the heat shock protein (hsp70). All animals were negative to the serological test for anti-*T. cruzi* and molecular for *T. cruzi* with primers for kDNA region. However, with the use of primers for hsp70, 11 of 39 (28.2%) animals were positive. The sequencing results showed similarity to the genus *Trypanosoma*. Despite the difficulties in establish the species of trypanosome among these primates, it is concluded that triatomine vectors and/or bloodsucking flies may be present in the animal environment; so, the entomologic vigilance for these insects are highly recommended.

Keywords: non-human primates, monkey, diagnosis, trypanosomes.

umário

5. CAPÍTULO I	17
5.1 INTRODUÇÃO.....	18
5.2 OBJETIVOS	27
5.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
6. CAPÍTULO II.....	36
7. CONCLUSÃO	56
8. ANEXOS.....	58
9. APÊNDICES	71

apítulo I

Introdução

A família Trypanosomatidae é um amplo grupo filogenético que reúne dezenas de espécies de pequenos protozoários de diversos gêneros. Podem infectar todos os vertebrados existentes e possuem diversos animais 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 (1).

Os integrantes mais conhecidos dessa família são os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, responsáveis por causarem diversas doenças tanto em homens como em animais, domésticos ou não (2). Somado a isso, está o interesse dos cientistas em estudar mecanismos de interação hospedeiro-parasito-ambiente que são refinados nesses gêneros.

Trypanosoma pode ser dividido em dois grupos: Salivaria e Stercoraria (3). Salivaria inclui tripanosomas que realizam parte do ciclo de vida no interior das glândulas salivares dos insetos vetores, sobretudo em dípteros. Eles são transmitidos para os vertebrados durante o repasto sanguíneo, principalmente para alimentação dos insetos adultos. Já em Stercoraria os protozoários são transmitidos via conteúdo fecal ou urina do inseto vetor, principalmente por triatomíneos, vulgarmente conhecidos como “barbeiros”, após o repasto sanguíneo (4). Os tripanosomas atingem a corrente sanguínea do vertebrado pela lesão na pele feita pelo vetor durante o repasto.

Trypanosoma cruzi é um dos tripanosomas do subgrupo Stercoraria mais conhecido, causador da doença de Chagas ou, ainda, conhecida como tripanossomíase americana (5, 6). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é listada como uma das 17 doenças tropicais negligenciadas (7), com cerca de oito milhões de pessoas infectadas em toda a América, sendo três milhões apenas no Brasil (6, 8).

Nos últimos anos, a doença de Chagas também foi detectada em países como os Estados Unidos, Canadá, Europa e, mais recentemente, no Japão, via transfusão sanguínea (9,

10). Acredita-se que a mobilidade populacional dos latino-americanos seja a responsável por esses países apresentarem casos de tripanossomíase (5). Recentemente foi sugerido que a doença de Chagas seria “a nova aids das Américas”, o que acendeu debates entre os especialistas da área (11, 12), tendo em vista a reagudização da doença, em casos de imunossupressão do paciente.

Embora a tripanossomíase americana conviva conosco por milhares de anos e que tenham sido encontradas evidências do protozoário em tecidos mumificados de índios Chinchorro de nove mil anos atrás, no Chile, a doença foi inicialmente descrita pelo médico sanitaria Carlos Chagas, no Brasil, em 1909 (13, 14). Em seu trabalho, Chagas discorre sobre a criação de um novo gênero, *Schizotrypanum*, nomeando a nova espécie de *Schizotrypanum cruzi*. Entretanto, a nova espécie acabou sendo inserida no existente gênero *Trypanosoma*, gênero este que Chagas havia inserido anteriormente, em uma nota publicada um ano antes (13).

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 (6, 15). Por muitos anos, no Brasil, *Triatoma infestans* foi o principal vetor da doença de Chagas. Já nos primeiros anos do século 20, o barbeiro foi associado à transmissão de doença de Chagas no Estado de São Paulo (16) e, em 1950, dos 369 municípios da época, em 130 haviam sido encontrados triatomíneos, especialmente *T. infestans* (17). O alto número de casos da doença de Chagas até metade do século 20 mobilizou autoridades de saúde da época em buscar medidas de controle do vetor no Estado de São Paulo em meados da década de 1960, visando a erradicação do barbeiro (18).

Ainda que *T. infestans* tenha sido virtualmente eliminado do Estado de São Paulo em 2000 (19), no Brasil, há mais de 60 espécies de triatomíneos identificados, entre os quais

se destacam, além de *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus*, que são considerados triatomíneos de grande importância epidemiológica (20). 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 nos centros urbanos.

Outra forma de transmissão conhecida, além da transmissão vetorial, é a transmissão por transfusão sanguínea. Fong et al. (21), documentaram a transfusão de sangue contaminado entre dois primatas (*Macaca nemestrina*) imunossuprimidos experimentalmente e que receberam transplante de medula óssea, desenvolvendo um quadro de doença de Chagas agudo. O diagnóstico foi confirmado pela presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* ao esfregaço sanguíneo. O animal desenvolveu pancitopenia recorrente e edema de prepúcio, escroto e pernas.

Relatam-se ainda outras formas de transmissão, tais como por transplante de órgãos sólidos, como mostrado em um estudo de dez anos nos Estados Unidos, em que 14 doadores soropositivos para doença de Chagas transmitiram horizontalmente a doença para nove receptores (22); transmissão congênita na América Latina, na qual cerca de 15 mil casos ocorrem por ano, ocorrendo em cerca de 5% dos nascimentos em mães com a doença crônica (23); e acidentes laboratoriais, em que 65 de 199 (32,6%) dos casos relatados de infecção em acidentes laboratoriais foram ocasionados por *T. cruzi*, geralmente por erro em manusear material contaminado (24);

Outra forma de infecção, sendo considerada uma das mais atuais, é a transmitida pela ingestão de alimentos contaminados com fezes e/ou urina contendo as formas tripomastigotas de *T. cruzi* viáveis ou, ainda, pela trituração do triatomíneo durante o preparo

do alimento, ocasionando doença de Chagas agudo, que tem ocorrido pelo hábito do consumo de caldo de cana (25) e da polpa de açaí (26), principalmente na região Norte do Brasil, mais especificamente no Estado do Amazonas (27, 28) e também casos relatados principalmente no Estado do Pará (29). Tal forma de infecção se apresenta como pequenos surtos, envolvendo indivíduos de uma mesma família em um curto espaço de tempo.

Os tripanosomas, principalmente *T. cruzi*, restringiam-se a animais silvestres, mantendo-se no ciclo silvestre. Entretanto, com a degradação ambiental provocada pelo homem, seja no desenvolvimento de práticas agropecuárias ou devido ao avanço urbano frente a áreas rurais, o vetor começou 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 de humanos (30, 31). Além disso, outros animais silvestres começaram a aproximar-se do peridomicílio, como os gambás (gênero *Didelphis*), em busca de abrigo e alimento, o que também é observado atualmente no cenário urbano.

Em relação às técnicas diagnósticas que podem ser utilizadas, algumas diferenças são observadas entre os métodos sorológicos, como a técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), parasitológico direto (observação do parasito em lâmina) e testes moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Tais diferenças e dificuldades podem ser devido a alguns fatores, tais como o tempo de permanência dos anticorpos circulantes no sangue periférico e a presença de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, como *Leishmania* spp. (32); ou ainda, devido a baixa quantidade ou ausência do parasito no momento da coleta, principalmente durante a fase crônica indeterminada, não sendo possível a sua detecção pela técnica da PCR (33).

Grande parte do conhecimento sobre a ação do parasito e a resposta imunológica se deve a experimentos realizados em animais, sobretudo em roedores, animais comumente utilizados em laboratórios. Entretanto, devido a distância filogenética dos humanos, muitos dados observados não eram transpostos de forma eficaz entre os dois grupos de mamíferos (34). Os trabalhos de Barreto (30) mostraram que os primatas não humanos são considerados reservatórios silvestres do *T. cruzi*. Um dos primeiros experimentos para observar a infecção a partir de triatomíneos foi a infecção intencional de um exemplar primata de *Callithrix penicillata*, nome científico do sagui de tufo preto, um pequeno primata comum do Cerrado brasileiro. Foi verificado que o sangue do animal, transcorrido alguns dias, estava com formas evolutivas de *T. cruzi* (13).

Os tripanosomas são os parasitos mais frequentemente relatados entre os primatas não humanos de região tropical (35), e os primatas do Novo Mundo são naturalmente susceptíveis à doença (36). O Brasil é um dos países com maior número de primatas conhecidos, com 19 gêneros distribuídos em cinco famílias, com cerca de 130 espécies. Destas, 92 são encontradas na Amazônia, 24 na Mata Atlântica e apenas cinco na região de Cerrado (37).

Lisboa et al. (38) identificaram a presença de primatas 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 reagentes em técnica sorológica com títulos de até 1280. Além disso, o parasito foi isolado em 38 do total de primatas amostrados, indicando a circulação do mesmo no meio próximo ao perímetro urbano (cerca de 120 km da cidade do Rio de Janeiro). Outros estudos também apontaram a presença de *T. cruzi* em animais silvestres, incluindo primatas (39, 40).

Além disso, os primatas podem ser naturalmente infectados por outros tripanosomas, como apontado no trabalho de Tenório et al. (41), em que um primata do Centro de Conservação da Fauna Silvestre de Ilha Solteira, em São Paulo, na divisa com o Estado do Mato Grosso do Sul, foi positivo para *Trypanosoma minasense*, sendo também encontrado em outro primata em um estudo realizado em Minas Gerais (42), o que pode apontar que essa espécie é amplamente difundida entre os primatas no país. Macacos do Centro Nacional de Primatas, no Estado do Pará foram positivos para diversos tripanosomas, incluindo o *T. minasense*, assim como *T. cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma deanei* (35).

Embora animais de cativeiro estejam mais protegidos do meio silvestre, eles ainda podem ser infectados por tripanosomas. Um estudo realizado no Texas, EUA, a fim de verificar a *causa mortis* de primatas diagnosticados com miocardite linfocítica, constatou pela PCR a partir de tecido cardíaco em parafina, que babuínos e macacos cinomolgus (*Macaca fascicularis*) estavam infectados por *T. cruzi* (43).

Mesmo com uma grande diversidade de espécies animais, o Brasil possui 103 zoológicos que abrigam diferentes espécimes, em sua maioria nativas, mas também, espécies exóticas. Aproximadamente 40% dos zoológicos do Brasil localizam-se no Estado de São Paulo e o Parque Zoológico Municipal de Bauru, no interior paulista, é bem-conceituado no país. Atualmente, 24 das 227 espécies existentes no zoológico de Bauru são primatas, sendo vinte espécies do Novo Mundo e quatro do Velho Mundo.

O Parque Zoológico Municipal de Bauru está localizado no interior do Estado de São Paulo, na cidade de Bauru e situa-se nas coordenadas 22°20'28" S e 49°01'18" O. Possui licença IBAMA 1/35/91/2157; SMA 8000/2011 e CRMV-SP 01601. Inaugurado no dia 24 de agosto de 1980, contava com um número restrito de espécies de animais, mas, com o passar

do tempo, sofreu diversas expansões e hoje possui uma área de 20 alqueires, que está inserido em um ambiente de cerrado de mais de 200 alqueires. É considerado de grande destaque no país, principalmente devido a sua estrutura e preocupação ecológica. Possui 880 animais e 227 espécies, recebendo cerca de 150.000 visitantes por ano. Os animais que residem no Zoológico representam diferentes locais do planeta, seja da África, Ásia, Austrália, Europa, Américas do Norte e do Sul, mas a maioria deles é proveniente da fauna brasileira.

Vários fatores relevantes foram considerados para este estudo, tais como a presença de animais sinantrópicos na área urbana do município de Bauru, principalmente gambás, importantes reservatórios de tripanosomatídeos (44), bem como o crescente aumento do número de doenças emergentes de importância em saúde pública devido a destruição de áreas de conservação ambiental. Bauru encontra-se em processo de urbanização crescente, e a ação humana e modificação da vegetação em torno se faz presente, o que possibilita o refúgio de triatomíneos para colonização destes ambientes artificiais, em busca de novas fontes de alimentação, o que faz importante conhecer se os primatas estão participando da manutenção desses parasitos no ambiente.

Várias espécies de primatas apresentam tripanosomas semelhantes a *T. cruzi*, como já observado por Terry (45) e Souza et al. (46). Chaia et al. (47) verificaram que o macaco da espécie *Cebus apella* tem alta susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*. Estudos mais recentes têm identificado diversas espécies de tripanosomas a partir de amostras de sangue de primatas, apontando a facilidade com que esses animais se infectam com esses parasitos no meio ambiente (41, 48).

O município de Bauru possui áreas fragmentadas de florestas que estão sob constante desequilíbrio ecológico pela ação do homem, o que leva a evasão de animais silvestres para áreas urbanas. Quando estes animais encontram abrigo e alimento nestas áreas,

acabam por incorporarem-se a estas áreas como seu próprio habitat. Esta situação ocorre no município, no qual várias destas espécies, em particular marsupiais do gênero *Didelphis*, popularmente conhecidos como “gambás”, encontram-se bem adaptados a vários ambientes e são frequentemente vistos na área urbana do município. Santiago et al. (44) encontraram uma proporção de 71% de animais positivos dentre 107 amostras de medula óssea examinadas para o teste de ELISA e 91,6% de animais positivos à PCR para *Leishmania* spp. dentre 112 amostras testadas, sugerindo que *Didelphis* spp. podem participar do ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. em Bauru. Tais espécies também são um dos reservatórios mais importantes de *T. cruzi* (49).

A vegetação do bioma Cerrado onde o Parque Zoológico Municipal de Bauru está inserido é um ambiente o qual os triatomíneos estão bem adaptados (25), além de permitir a manutenção de vetores, sobretudo em palmeiras (família Aracaceae), cascas de árvores e ninhos de pássaros (50). Portanto, deve-se aventar a possibilidade de busca ativa de triatomíneos nessas áreas, como medida de prevenção da infecção por tripanosomas, tanto para os animais como para humanos, seja pela transmissão vetorial ou pela transmissão oral, já que primatas podem ingerir esses insetos junto com os alimentos.

A pesquisa de *T. cruzi* e outros tripanosomas em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico do estudo não é conhecida. A conciliação da técnica sorológica de RIFI e teste molecular de PCR são de grande utilidade para determinar a presença de animais infectados no local. Desta forma, pretendeu-se verificar a presença de tripanosomas em primatas não humanos do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP, como uma forma de vigilância em saúde para a doença de Chagas e para infecções por outros tripanosomas, bem como propor medidas de controle no ambiente.



Objetivo Geral:

- Pesquisar a ocorrência de *T. cruzi* e outros tripanosomas em 39 primatas de cativeiro procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru –SP.

Objetivos Específicos:

- Pesquisar anticorpos anti-*T. cruzi* com o uso da técnica sorológica de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Aplicar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para pesquisa de *Trypanosoma cruzi* utilizando-se *primers* específicos para região do cinetoplasto (kDNA) do protozoário e para outros tripanosomatídeos, utilizando-se de *primers* que amplificam região codificadora da proteína de choque térmico (hsp70);
- Realizar o sequenciamento genético das amostras positivas à PCR.

eferências

1. ¹Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol. 2001;31:648-52.
2. Lukes J. Trypanosomatida Kent 1880. Version 02 January 2009 (under construction) [Internet]. 2009 [cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://tolweb.org/Trypanosomatida/98015/2009.01.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
3. Lukes J. *Trypanosoma* Gruby 1843. Version 02 January 2009 (under construction) [Internet]. 2009 [cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://tolweb.org/Trypanosoma/98034/2009.01.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
4. Stevens J, Gibson W. The evolution of salivarian trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:225-8.
5. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) – fact sheet (revised in August 2012). Weekly Epidemiol Rec. 2012;87(51/52):519-22.
6. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: WHO; 2013 [cited 2014 Fev 21]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
7. World Health Organization. Neglected tropical disease [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [cited 2014 Fev 21]. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
8. Portal da Saúde (BR), Ministério da Saúde. Doença de Chagas [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2016 [acesso 18 Jan 2016]. Disponível em:

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

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>

9. Yasukawa K. Blood donor screening for *Trypanosoma cruzi* infection in Japan. Transfusion. 2012;54:745-6.
10. Blumental S, Lambermont M, Heijmans C, Rodenbach MP, El Kenz H, Sondag D, et al. First documented transmission of *Trypanosoma cruzi* infection through blood transfusion in a child with sickle-cell disease in Belgium. PLOS Neglect Trop Dis. 2015;9(10):e0003986. doi: 10.1371/journal.pntd.0003986. eCollection 2015
11. Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS, et al. Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas”. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1498. doi: 10.1371/journal.pntd.0001498
12. Pays JF. No, Chagas disease is not the new AIDS of the Americas [editorial]! Bull Soc Pathol Exot. 2012;105:337-48.
13. Chagas C. Nova tripanozomíase 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.
14. Morillo CA. Infection With *Trypanosoma cruzi* and progression to cardiomyopathy. Circulation. 2013;127:1095-7.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease): Triatomine Bug FAQs [Internet]. Atlanta: CDC; 2013 [cited 2014 Feb 21]. Available from: http://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/
16. Neiva A. Informações sobre a biologia da vinchuca, *T. infestans* KLUG. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1913;5:24-31.
17. Freitas JLP. Dados atuais sobre a distribuição de triatomíneos e moléstia de Chagas no Estado de São Paulo. Rev Paul Med. 1950;37:227-36.

18. 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;31:73-88.
19. Ramos Jr AN, Carvalho DM. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. Cad Saúde Pública. 2001;17:1403-12.
20. Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. Cienc Cult (São Paulo). 2003;55:30-3.
21. Fong DL, Torrence AE, Vogel KW, Stockinger DE, Nelson V, Murnane RD, et al. Transmission of Chagas disease via blood transfusion in 2 immunosuppressed pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). Comp Med. 2014;64:63-7.
22. Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, et al. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. Am J Transplant. 2013;13:2418-25.
23. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:363-8.
24. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev. 2001;14:659-88.
25. Cardoso AVN, Lescano SAZ, Neto VA, Gavika E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. Rev Inst Med Trop. 2006;48:287-289.
26. Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, Franco RM, Guaraldo AM, et al. Survival *in vitro* and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. J Food Prot. 2012;75:601-6.
27. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis. 2009;15:653-5.

28. Souza-Lima RC, Barbosa MGV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento AS, Ferreira JMBB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:510-4.
29. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012;54:845-52.
30. 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;1:167-74.
31. Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:962-7.
32. Luciano RM, Lucheis SB, Troncarelli MZ, Luciano DM, Langoni H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI). *Braz J Res Anim Sci.* 2009;46:181-7.
33. Chiamonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Heredia V. Study of cases of leishmaniasis in the Province of Salta: evidences of mixed infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Medicina.* 1996;56:259-68.
34. Almeida EA, Navarro MR, Guariento ME, Carvalhal SS. Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi*. Avaliação clínica, eletrocardiográfica e anatomopatológica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1992;25:7-12.
35. Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Lainson R, Brígido MCO, Muniz JAPC. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:157-9.

36. Philipp MT, Purcell JE. Modeling parasitic diseases in nonhuman primates: malária, Chagas' disease, and filariasis. In: Wolfe-Coote S, editors. The laboratory primate: handbook of experimental animals. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005. p. 91.
37. Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2nd ed. Arlington: Conservation International; 2012.
38. Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:445-52.
39. Barrett TV, Hoff R, Mott KE, Guedes F, Sherlock IA. An outbreak of acute Chagas's disease in the São Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animals reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1979;73:703-9.
40. Roque ALR, Xavier SCC, Gerhardt M, Silva MFO, Lima VS, D'andrea OS, et al. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in diferente areas of Abaetetuba minicipality (Pára State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. Vet Parasitol. 2013;193:71-7.
41. Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. Vet Parasitol. 2014;203:203-6.
42. Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira R. The haemoculture of *Trypanosome minasense* Chagas, 1908. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:501-5.
43. Mubiru JN, Yang A, Dick EJ Jr, Owston M, Sharp RM, Vandeberg JF, 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;90:627-33.

44. Santiago ME, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Ade FM, Lima VM. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban áreas in Bauru (São Paulo, Brazil). Vet Parasitol. 2007;150:238-90.
45. Terry BT. Trypanosomiasis in monkeys (*Macacus rhesus*) in captivity. Proc Soc Exp Biol. 1911 9:17-18 apud Ruch TC. Diseases of laboratory primates. London: W.B. Saunders Company; 1967.
46. Souza EO, Rossan RN, Baerg GD. The prevalence of Trypanosomes and microfilariae in Panamanian monkeys. Am J Trop Med Hyg. 1974;23:862-8.
47. Chaia G, Abreu IB, Chiari L, Araújo SM. Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp. pelo *Trypanosoma cruzi* (Cepa “Y”): I – curva da parasitemia na fase aguda da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1977;11:81-5.
48. Lisboa CV, Mangia RH, Luz SLB, Kluczkowski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, et al. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. Parasitology. 2006;133:603-11.
49. Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas? Rev Biol. 2011;6b:44-8.
50. Diotaiuti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JCP. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two diferente regions of the state of Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1993;35:237-45.

apítulo II

***Trypanosoma* spp. in captive primates in a Brazilian zoo**

Wesley José dos Santos^{1¶*#a}, Livia Maísa Guiraldi^{1¶}, Mirian dos Santos Paixão^{1&}, Maria Fernanda Alves-Martin^{1&}, Gabriela Pacheco Sanchez^{2&}, Daniela Barbosa da Silva^{2&}, Virgínia Bodelão Richini-Pereira^{1,3}, Simone Baldini Luccheis^{1,2,4#b}.

¹Department of Tropical Diseases and Imaging Diagnosis, Botucatu Medical School, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratories Center, Bauru, São Paulo, Brazil.

⁴Paulista Agency of Agribusiness Technology, Bauru, São Paulo, Brazil.

*Author for correspondence

E-mail: wesleyash@gmail.com

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

Key words: non-human primates, monkey, diagnosis, trypanosomes.

Periódico submetido: PLOS Neglected Tropical Diseases.

Abstract

Captive animals, despite the constant care provided by those responsible for the site, are susceptible to infections from different sources. We report herein a natural infection of 11 (28.2% positive) of 39 non-human primates, from 13 different species, in a Brazilian zoological park by trypanosomes. Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) and conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) ruled out *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease. However, the sequencing performed with positive samples employing hsp70 primers presented similarities from 86% to 88% for diverse trypanosomes, including *T. cruzi*, *Trypanosoma grayi*, *Trypanosoma lewisi*, *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma vivax*. We believe that the low similarity obtained by sequencing reflects the difficulties in molecular identification of trypanosomes, since they share a great portion of genetic material, and points to a possible coinfection by more than one trypanosome specie. Thus, our study demonstrates the presence of diverse trypanosomes in primates, which are susceptible to infection by these parasites. Therefore, actions to combat vector insects must be performed in these environments, besides the quarantining of animals recently introduced into zoos as a preventive measure, to avoid transmitting infection to other animals, staff and the visiting public.

Author Summary

Diverse parasites are found in tropical regions of the planet, including protozoa of the genus *Trypanosoma*. Wild animals are frequently parasitized by these protozoa, such as diverse species of monkeys, both in the Americas and in Africa. However, research studies that require blood collection from these animals in the wild are difficult to accomplish. The placement of zoos in tropical environments facilitates the obtainment of samples for diverse serological and molecular studies. We have studied blood samples of 39 primates from a Brazilian zoo in a search for protozoa, including the protozoan that causes Chagas disease. Although all the primates in our study were found negative in the serological test, the molecular test found 11 of the 39 monkeys positive for diverse species of *Trypanosoma*. We believe that the circulation of trypanosomes among captive animals in tropical regions is common since the latter, on account of living in regions where the vectors of these protozoa are found, are susceptible to infection by these parasites during the feeding of the vectors,

generally by the ingestion of blood. Thus, we demonstrate a need for greater control of insects in zoo environments, especially those in tropical regions, to avoid such infection not only in monkeys, but also in other animals that live in the zoo as well as their human caretakers and the visiting public.

Introduction

Trypanosoma encompasses dozen of dozens of parasite species that infect practically all the existent vertebrate groups, including humans [1]. Mammals in particular are reservoirs for diverse trypanosomatids, such as *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, which is endemic in the Americas, transmitted by diverse triatomine species [2]. More than 10 million persons in Latin America are infected by this protozoan [3], while it is estimated that in Brazil about three million persons still carry the disease in a chronic form [4]. The vertebrates are infected by trypanosomatids during feeding on their blood by some infected invertebrate vector [5]. The non-human primates participate in the wild cycle of these protozoa [6], which can be reservoirs for diverse species of trypanosomes [7].

The trypanosomes are usually divided into two groups: Stercoraria and Salivaria [8]. Stercoraria trypanosomes include parasites that infect vertebrates utilizing the intestinal route of the vector, generally being eliminated from the invertebrate via feces and urine, as in the case of *T. cruzi*. Yet in Salivaria, they utilize mouth parts of the vectors to infect the vertebrate, especially in the salivary glands of these insects, as occurs in the transmission of *Trypanosoma brucei*, which causes African Trypanosomiasis, also known as sleeping sickness.

Diverse techniques are employed for detecting trypanosomes in wild animals, especially serological and molecular techniques [9-10]. However, the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique has been demonstrated to be an optimum tool due to its high specificity and sensitivity. Despite the advances, many species of trypanosomes have not yet been correctly identified, or have obtained only partial registrations in databases [11]. This is due, principally, to the adaptations of the protozoan to a wide variety of vector insects and vertebrate host, placing the trypanosomes into a large genus that is cohesive but diverse [12].

Zoos and centers for animal wildlife conservation perform an important role in the recuperation of animals that had been victims of illegal trafficking, but also in the

encouragement of procreation of threatened species [13]. Despite the care given to these animals, open enclosures make these animals susceptible to diverse diseases [14], especially to those endemic in the locations where they are found.

Despite the actions taken for combatting exclusively the kissing bug *Triatoma infestans* in past decades, one of the main vectors of Chagas disease in Brazil, cases of acute infection by the protozoan are still being reported in the country [2], provoked principally by the presence of infected triatomines that are processed together with foods [15]. Added to this, hematophagous flies, commonly found in southeastern Brazilian [16] can transmit diverse parasites, including *Trypanosoma vivax*, that occur in the country [17].

Knowledge on trypanosomes in wild animals is limited, principally due to difficulties posed by conducting research in the field [18]. Zoological parks inserted into wild environments provide alternatives that permit researchers to study diverse aspects of wildlife, from the behavior of animals to susceptibility to diseases. In this context we have researched, in the present study, the presence of *Trypanosoma* spp. in captive primates from a zoo in Brazil.

Methods

Location of the study

The Municipal Zoological Park in Bauru, a city located in the interior of the Brazilian state of Sao Paulo, inaugurated in 1980, currently encompasses 484 thousand m² of constructed area, placed within more than 4.8 million m² of preserved area (Fig. 1). With a hot humid climate during summer and dry during winter, the zoo is found in a savannah area with subtropical semi-deciduous forest, in which part of the natural vegetation loses leaves during the dry season [19].

Fig. 1: Localization of the Zoo of the study. Map highlighting the location do Municipal Zoological Park, placed within the city of Bauru, Sao Paulo, Brazil. Scale referent to the city.

Animals of the study

Blood samples were collected from 39 primates of 13 different species between September and December 2014 during an odontological intervention previously scheduled by the zoo veterinarian. The primates were anesthetized with ketamine at the dose of 10 mg/kg of animal

body weight, according to the national guidelines “Surveillance Guide For Epizootic Diseases On Non-Human Primates And Entomology Applied To Yellow Fever Surveillance” and “National Council of Animal Experimentation Control: appendix 1”. The study was approved by the Committee for the Ethical Use of Animals (CEUA/FMB nº 1104/2015) and by the System for Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO/ICMBio/MMA nº 45000-2). The number of specimens of each specie in this study is displayed in Table 1. All the animals in the study were born in or were transferred to the zoo prior to 2013, according to the records supplied by the zoo.

Table 1. Relation of specimens of New and Old World primates, originating from the Municipal Zoological Park of Bauru, Brazil.

Scientific Name	Popular Name	Nº of specimens
New World Primates		
<i>Alouatta belzebul</i>	Red-handed howler monkey	2
<i>Alouatta caraya</i>	Black howler monkey	5
<i>Alouatta fusca</i>	Brown howler monkey	1
<i>Alouatta seniculus</i>	Venezuelan red howler monkey	2
<i>Ateles chamek</i>	Black-faced spider monkey	3
<i>Ateles marginatus</i>	White-cheeked spider monkey	3
<i>Ateles paniscus</i>	Red-faced spider monkey	2
<i>Cebus albifrons</i>	White-fronted capuchin monkey	2
<i>Lagothrix lagotricha</i>	Woolly monkey	3
Old World Primates		
<i>Erythrocebus patas</i>	Patas monkey	3
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandrill	4
<i>Papio hamadryas</i>	Hamadryas baboon	8
<i>Papio papio</i>	Guinea baboon	1
Total		39

Spatial distribution of animals

The primates are allocated between two points of the zoo. Near the visitors’ entrance are the New World primates (23 primates from nine species), in fenced enclosures, encircled by diverse trees that also comprise the interior of the enclosures, in order to create a diversified environment for these animals. At the other point, a more remote location, are the Old World primates (16 primates from four species). Walls of concrete and glass delimit the enclosure,

which is enclosed by a fence only on the top. Despite the native vegetation encountered inside the enclosure, lianas pass through the location where these animals live (Fig. 2).

Fig. 2: Spatial distribution of primates from the study within the zoo. The areas in dark gray indicate the location of enclosures of primates, with the location image of each group, highlighted in boxes. Map without scale.

Serological evaluation

Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT). Conjugated anti-monkey (IgG – γ -chain specific - SAB3700765 – Sigma-Aldrich®, USA) was utilized for the reaction. Strain Y of *T. cruzi* was maintained in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium for seven days, being washed subsequently three times and suspended in Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. The final suspension was distributed into slides, dried at ambient temperature, and stored in a freezer at -18 °C until performance of the technique [20].

Molecular evaluation.

DNA of blood samples was extracted by utilizing the commercial kit Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen Scientific®, USA), according to the manufacturer's recommendations. The extracted samples were maintained in a freezer at -18 °C.

Conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR). The conditions of the reaction were as follows: each 0.2 mL microtube received PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl), 1.6 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs, 1U of Taq-polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®, USA), 0.2 μ M of each *primer*, 1 μ L of tested sample and 8.3 μ L of ultra-pure water (MIX-PCR), finalizing in 11 μ L of MIX-PCR and 1 μ L of DNA extraction product.

For amplification of minicircle fragments of *T. cruzi* kDNA, the following *primers* were utilized: TCZ1: 5'CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT3'; TCZ2: 5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3', according to Virreira et al. [21]. The amplification conditions were modified starting from the description of Moser et al. [22], being one cycle for initial denaturing at 94 °C for 30 seconds; 25 cycles of denaturing at 94 °C for 20 seconds, annealing at 57 °C for 30 seconds, extending at 72 °C for 30 seconds, and a final cycle at 72 °C for 3 minutes.

For amplification of the gene coding for heat shock protein (hsp70), the following *primers* were employed: HSP70F: 5'AGGTGAAGGCGACGAACG3'; HSP70R:

5'CGCTTGTCCATCTTTGCGTC3' according to Hernandez et al. [23]. The amplification conditions were modified starting from Hernandez et al. [23] with one initial cycle at 94 °C for 4 minutes; 40 cycles of denaturing at 94 °C for 30 seconds, followed by annealing at 59 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds; one final extension cycle was performed at 70 °C for 10 minutes.

To evaluate the quality of the extracted DNA, *primers* that amplify the β -globulin gene were utilized: β 1: 5'ACCACCAACTTCATCCACGTTTCAC3'; β -2: 5'CTTCTGACACAACACTGTGTTCAGTACTAGC3', according to Lee et al. [24]. Non-amplified samples were submitted to the *primers* that amplify the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene: GAPDH-F: 5'AGGCTGAGAACGGGAAACTT3'; GAPDH-R: 5'ATTAAGTTGGGGCAGGGACT3', as described by Kullberg et al. [25]. The same amplification conditions were obtained for both *primers*, consisting of one initial cycle at 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturing at 95 °C for 30 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds, followed by one final extension at 72 °C for 5 minutes.

Results

Serological

Among the samples of 39 primates, five were insufficient for accomplishing the serological test. Thus, the sera of 34 primates were analyzed. All the primates tested for IFAT anti-*T. cruzi* were non-reactive.

Molecular

In the first molecular test utilizing the specie-specific *primers* TCZ1 and TCZ2 for *T. cruzi*, all the primates studied were negative.

Utilizing the hsp70 *primers*, 11 of the 39 (28.2%) were positive, two animals each of the species *P. hamadryas*, *L. lagotricha* and *A. chamek* and one each of the species *P. papio*, *E. patas*, *C. albifrons*, *A. seniculus* and *A. caraya*. The animals of the species *A. belzebul*, *A. fusca*, *A. marginatus*, *A. paniscus* and *M. sphinx* were all negative. The samples were submitted to sequencing, revealing similarity of 88% for *T. cruzi* (M26595.1 / X67716.1 / KC960011.1), *Trypanosoma grayi* (XM009317554.1) and *Trypanosoma lewisi*

(KP208748.1), and 86% for *Trypanosoma rangeli* (KC544896.1 / KC960003.1) and *Trypanosoma vivax* (KP208747.1).

Discussion

Initiated in last decades in diverse Latin American countries, the attempt to eradicate exclusively the triatomine *Triatoma infestans* formulated a campaign to reduce cases of the main form of Chagas disease contagion [26]. Brazil received in 2006 an official certification as being a region virtually free of the vector [27]. However, cases of Chagas disease, principally provoked by the ingestion of foods in which triatomines were crushed during their preparation [28] indicate that the control for the elimination of one single vector specie was not sufficient to declare the country free of vector transmission, since there are diverse species of hematophagous triatomines that participate in the epidemiological cycle of Chagas disease, especially the species *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus* and *Triatoma sordida*. Other insects are also important in the zoo environment, including hematophagous flies such as the stable fly (*Stomoxys calcitrans*), transmitter of *T. vivax* in South America [17].

The location of the study where the primates are found is wooded, with diverse species, especially the Brazilian savannah, an environment in which triatomines are adapted to living in domestic areas [29]. Thus, the zoo primates inserted into a savannah environment may be exposed to hematophagous insect vectors of diverse trypanosomes. Furthermore, palm trees (family Arecaceae) are found throughout the zoo, near diverse enclosures, being utilized as part of a local landscaping design. Such plants are known habitats of diverse triatomines [30], which may indicate a greater risk of the exposure of these animals to the vector, as well as to hematophagous flies.

All the primates in the study were negative for *T. cruzi* by conventional PCR utilizing the primers TCZ1 and TCZ2. However, 11 animals were positive by employing the primer hsp70, revealing a similarity of up to 88% with *T. cruzi*, differing from the results of conventional PCR. The molecular method utilizes species-specific primers that amplify known segments of parasites. A wide diversity of trypanosomes, many of which differ from those already deposited in databases, can contribute to the non-amplification of diverse trypanosomes that already possess well established conventional molecular methods [18]. Due to the difficulties posed by working with captive animals, additional methods of data

collection could not be performed at the moment of blood collection, such as cardiological exams, since primates can present cardiomyopathies similar to those that occur in humans [31]. However, given the fact that the DNA of the parasite had been found in the blood, indicating the possibility of a recent infection, cardiac alterations would not yet be identified in these animals, suggesting long-term monitoring to verify the occurrence of any physiological alterations in these animals.

The gene coding for the heat shock protein (hsp70) is a conserved region of the genome responsible for regulating activities in the cellular interior, highly expressed in situations of stress, such as changes in temperature upon transit between vector and host [32]. By virtue of being a highly conserved region found in diverse organisms, the sequence is very useful in the identification of a large number of trypanosomes, including some for which *primers* have not yet been designed for use in conventional PCR techniques [33].

The other trypanosomes present in the sequenced samples may reflect a great similarity among the sequences of these organisms deposited in databases, given that some trypanosomes do not infect primates naturally or are found only in other regions of the world. *Trypanosoma grayi* naturally infects African crocodiles. Although this vector is a tsetse fly (*Glossina* spp.), *T. grayi* is transmitted through the fecal material of the vector, a mechanism similar to that adopted by diverse trypanosomes, especially *T. cruzi* [34]. Despite its similarity to some trypanosomes that infect alligators in South America, such as *Trypanosoma ralph* [35], the literature does not indicate whether this parasite can infect mammals, due to the absence of membrane proteins that would enable the invasion of mammalian cells, despite the fact that *T. grayi* is genetically proximate to other trypanosomes, such as *T. cruzi* and *T. rangeli* [36]. This proximity may indicate that another *T. grayi*-like or *T. cruzi*-like trypanosome could infect primates.

Yet *T. lewisi*, is a trypanosome commonly found infecting rats in the wild or in the laboratory. Its principal transmission route is by a bite or the ingestion of fleas infected with the parasite [37]. Despite infecting and growing only in rats, not developing in mice, for example, the infected fleas can interact with other vertebrates, including humans, and transmit the parasite. A newborn child with dengue-like symptoms checked into a hospital in Thailand. After a blood smear showed the presence of trypanosomes in peripheral blood, PCR was performed, with subsequent sequencing, revealing 98% similarity with *T. lewisi* [38].

Brazil has reports of rats naturally infected by *T. lewisi*, indicating the possibility that the protozoan circulates freely in wild and urban environments, given that it is transmitted by diverse species of fleas [39]. As in the case report of the Thai child, the primates in the zoo may have been infected by some unidentified *T. lewisi*-like trypanosome.

The result from sequencing also showed similarity to *T. vivax*. This parasite was inserted into Latin America by the importation of bovines principally from Africa in the 19th Century, [40] and is able to infect a large variety of animals of veterinary interest [41], including non-human primates, being one of the most common findings among these animals [42]. In Africa, where it circulates in the wild, it is transmitted by tsetse flies. However, in Brazil, the parasite has adapted to the mechanical transmission effected by stable-flies, flies of diverse species that present hematophagous activity, including *S. calcitrans*, and found in diverse parts of the country.

Trypanosoma rangeli is a non-pathogenic trypanosome to humans and other mammals [43-44]. Commonly found in primates of Amazonia rain forest [7, 45-46], the parasite was also encountered in savannah regions [47], even in the environment of the current study, indicating the possibility of triatomines feeding on the blood of primates in addition to the wild ones that circulate in these spaces.

Despite the findings indicating the circulation of trypanosomes among these animals, the primates did not present any clinical signs of infection, as reported by the zoo data, suggesting that the animals would be asymptomatic in the presence of the infection or that the parasites did not demonstrate pathogenicity toward them. However, other laboratory exams such as the complete blood count and biochemical exams could be useful for verifying clinical alterations.

The similarities found in the sequencing of our samples reflect the sequences deposited at the GenBank™ that returned similarity percentages very close in relation to more than one trypanosome specie, which may account for finding species of trypanosomes generally not reported in primates, such as *T. grayi*. Furthermore, these animals can be co-infected with more than one trypanosome specie. Co-infection exclusively by trypanosomes is not well documented in the literature, being frequently related to other diseases of human interest, as in the case of co-infection by *Leishmania* and HIV [48]. It is known that fish can be co-infected by more than one trypanosome specie [49], which may have occurred with the primates studied.

It is known that inhibitors present in blood, added to a low parasite load, can be factors that hamper works with PCR [50], which can interfere in the results of sequencing, justifying similarities of up to 90%. However, captive animals are protected by environmental laws, which would impede the use of samples from tissues or spinal puncture for the realization of more precise tests, given that the stress and suffering of the animal in these procedures are high. Although the use of other molecular techniques such as PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) can provide better results [51], the use of *primers* that amplify conserved regions of these parasites is a viable alternative for identifying trypanosomes in wild animals [33].

The primates are included on the list provided by the “Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora” (CITES), which aims to protect diverse animals and plants throughout the world, permitting exchanges of specimens between locations and reintroduction of animals into the wild [52]. However, there has been no surveying of the parasitic state of these animals, which can insert diverse trypanosomatids into new locations [53], rendering the local population of animals susceptible to new infections, if there is a presence of triatomine vectors or of hematophagous flies.

Thus, diverse species of trypanosomes can circulate in the environment where these primates are inserted, indicating that insect vectors of these parasites are capable of feeding on the blood of these animals. This can be common in zoos inserted into tropical regions, since many are located in regions of native vegetation, permitting a flow of wildlife animals and vectors between animal enclosures. Future actions such as constant entomological vigilance against possible vectors are procedures that would augment the protection of primates living in captivity in zoos, and ensure the health not only of caretakers who constantly manage the animals but also of the visiting public, as a public health measure.

Acknowledgements

The authors thank the veterinary physician Maria Emília Bodini Santiago, from the Municipal Zoological Park of Bauru and grant n. 2014/12186-4, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

1. 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: 37-49.
2. Ministério da Saúde (BR). Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiol.* 2015;46(21): 1-9.
3. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GAJ, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005;35: 225-233
4. Ministério da Saúde (BR). Doença de Chagas [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2016 [cited 2016 Jan 18]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>.
5. Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of trypanosomatidae and bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol.* 2003;20(4): 644-652
6. Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95: 445-452.
7. Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Lainson R, Brígido MCO, Muniz JAPC. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95: 157-159.
8. Stevens J, Gibson W. The evolution of salivarian trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94: 225-228.
9. Roque ALR, Xavier SCC, Gerhardt M, Silva MFO, Lima VS, D'Andrea OS, et al. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in diferente areas of the Abaetetuba

municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. Vet Parasitol. 2013;193: 71-77.

10. Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. Vet Parasitol. 2014;203: 203-206.

11. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Taxonomy of *Trypanosoma* [Internet]. Bethesda: NCBI; 2016 [cited 2016 Feb 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5690>.

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

13. Cuarón AD. Further role of zoos in conservation. Monitoring wildlife use and the dilemma of receiving donated and confiscated animals. Zoo Biol. 2005;24: 115-124.

14. Speckmann G. Diseases of zoo animals (diseases and their therapy of wild animals in zoos, game farms, circuses, and private collections). Zootierkrankheiten. Can Vet J. 1977;18: 37.

15. Ferreira RTB, Branquinho MR, Leite PC. Transmissão oral de doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. Vigil Sanit Debate. 2014; 2(4): 4-11.

16. Gonçalves PM. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. Cien Rural. 2000;30: 187-194.

17. Dávila AMR, Majiwa PAO, Grisard EC, Aksoy S, Melville SE. Comparative genomics to uncover the secrets of tsetse and livestock-infective trypanosomes. Trends Parasitol. 2003;19(10): 436-439.

18. Auty H, Anderson NE, Picozzi K, Lembo T, Mubanga J, Hoare R, et al. Trypanosome diversity in wildlife species from Serengeti and Luangwa Valley Ecosystems. PLOS Neglect Trop Dis. 2012;6(10): 1-10.

19. Cavassan O. Bauru: terra de cerrado ou floresta? Cien Geogr. 2013;17: 46-54.
20. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the sorodiagnostics of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop. 1966;8: 227-234.
21. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Veja C, Solano M, Carlier Y, et al. 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.
22. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989;27: 1477-82.
23. 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. Parasit Vector. 2014;7: 501. doi: 10.1186/s13071-014-0501-y.
24. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. Br J Biomed Sci. 2001;58: 85-91.
25. Kullberg M, Nilsson MA, Arnason U, Harley EH, Janke A. Housekeeping Genes for Phylogenetic Analysis of Eutherian Relationships. Mol Biol Evol. 2006;23: 1493-1503.
26. Ramos Jr AN, Carvalho DM. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. Cad Saúde Pública. 2001;17: 1403-1412.
27. Ferreira ILM, Silva TPT. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39: 507-509.
28. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of 28 palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis. 2009;15: 653-655.

29. Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. Cien Cult. 2003;55: 30-33.
30. Abad-Franch F, Lima MM, Sarquis O, Gurgel-Gonçalves R, Sánchez-Martín M, Calzada J, et al. On palm, bugs, and Chagas disease in the Americas. Acta Trop. 2015;151: 126-141.
31. Jelicks LA, Tanowitz HB. Advances in imaging of animal models of Chagas disease. Adv Parasitol. 2011;75: 193-208. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00009-5.
32. Burger A, Ludewig MH, Boshoff A. Investigating the chaperone properties of a novel heat shock protein, hsp70.c, from *Trypanosoma brucei*. J Parasitol Res. 2014. ID 172582. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/172582>.
33. Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. Trends Parasitol. 2010;26: 324-328.
34. Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodilian trypanosome *Trypanosoma grayi*. Sci Data. 2014;1(140024):1-7. doi:10.1038/sdata.2014.24
35. Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, Paula CD, Botero-Arias R, et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. Parasit Vector. 2013;6: 313.
36. Martins NO, Souza RT, Cordero EM, Maldonado DC, Cortez C, Marini MM, et al. Molecular characterization of a novel Family of *Trypanosoma cruzi* surface membrane proteins (TcSMP) involved in mammalian host Cell invasion. PLOS Neglect Trop Dis. 2015;9(11): e0004216. doi: 10.1371/journal.pntd.0004216. eCollection 2015.
37. Desquesnes M, Ravel S, Cuny G. PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. Kinetoplastid Biol Dis. 2002;1: 2. doi: 10.1186/1475-9292-1-2.

38. Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. J Med Microbiol. 2007;56: 1118-1121.
39. Linardi PM, Botelho JR. Prevalence of *Trypanosoma lewisi* in *Rattus norvegicus* from Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97: 411-414.
40. Jones TW, Dávila AMR. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. Trends Parasitol. 2001;17: 99-101.
41. Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of Trypanosomes infecting humans and primates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93: 669-675.
42. Nijokou F, Simo G, Nkinin SW, Laveissière C, Herder S. Infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* “forest type”, and *T. simiae* in small wild vertebrates in South Cameroon. Acta Trop. 2004;92: 139-146.
43. Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P. Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. Parasit Vectors. 2012;5: 105. doi: 10.1186/1756-3305-5-105.
44. Gürtler RE, Cardinal MV. Reservoir host competence and the role of domestic and comensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 2015;151: 32-50.
45. Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R. The infection rates of Trypanosomes in squirrel monkeys at two sites in the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92: 465-470.
46. Ndao M, Kelly N, Normandin D, Maclean JD, Whiteman A, Kokoskin E, et al. *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, comercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. Comp Med. 2000;50: 658-665.

47. Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Silva EL. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31: 99-102.
48. Okwor I, Uzonna JE. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. Immunol Res. 2013;56: 163-171.
49. Grybchuk-Ieremenko A, Losev A, Kostygov AY, Lukes J, Yurchenko V. High prevalence of trypanosome co-infections in freshwater fishes. Folia Parasitol. 2014;61: 495-504.
50. Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). Rev Bras Hematol Hemoter. 2004;26: 274-281.
51. Lisboa CV, Monteiro RV, Martins AF, Xavier SCC, Lima VS, Jansen AM. Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in free-ranging population of lion tamarins (*Leontopithecus* spp): an 11-year follow-up. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110: 394-402.
52. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III: valid from 5 February 2015 [Internet]. Geneva: International Environment House; 2015 [cited 2016 Apr 2] Available from:<https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2015/E-Appendices-2015-02-05.pdf>.
53. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2014;3: 251-262.

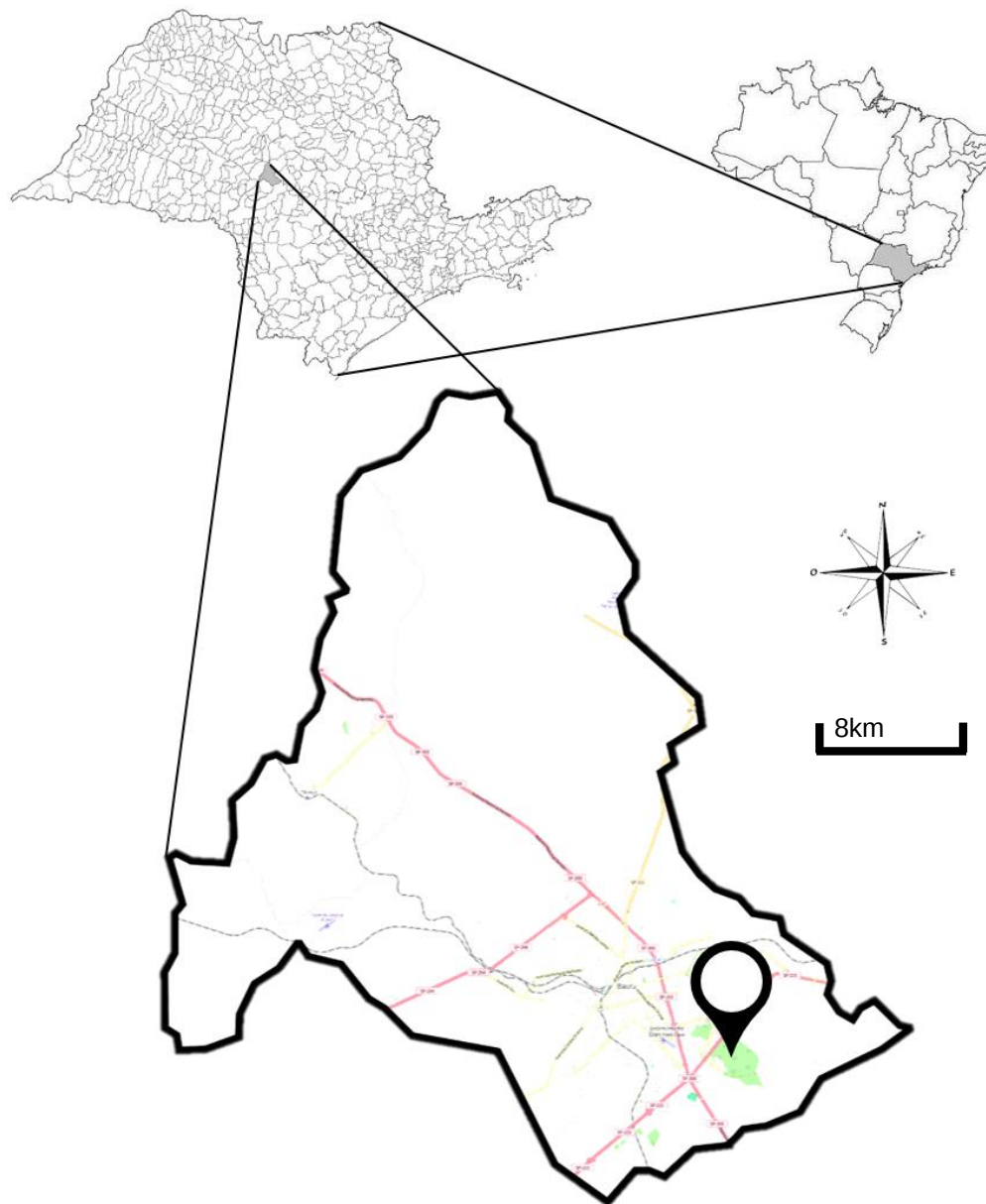


Fig. 1: Localization of the Zoo of the study. Map highlighting the location of Zoo Park Municipal, placed within the city of Bauru, São Paulo, Brazil. Scale referent to the city.

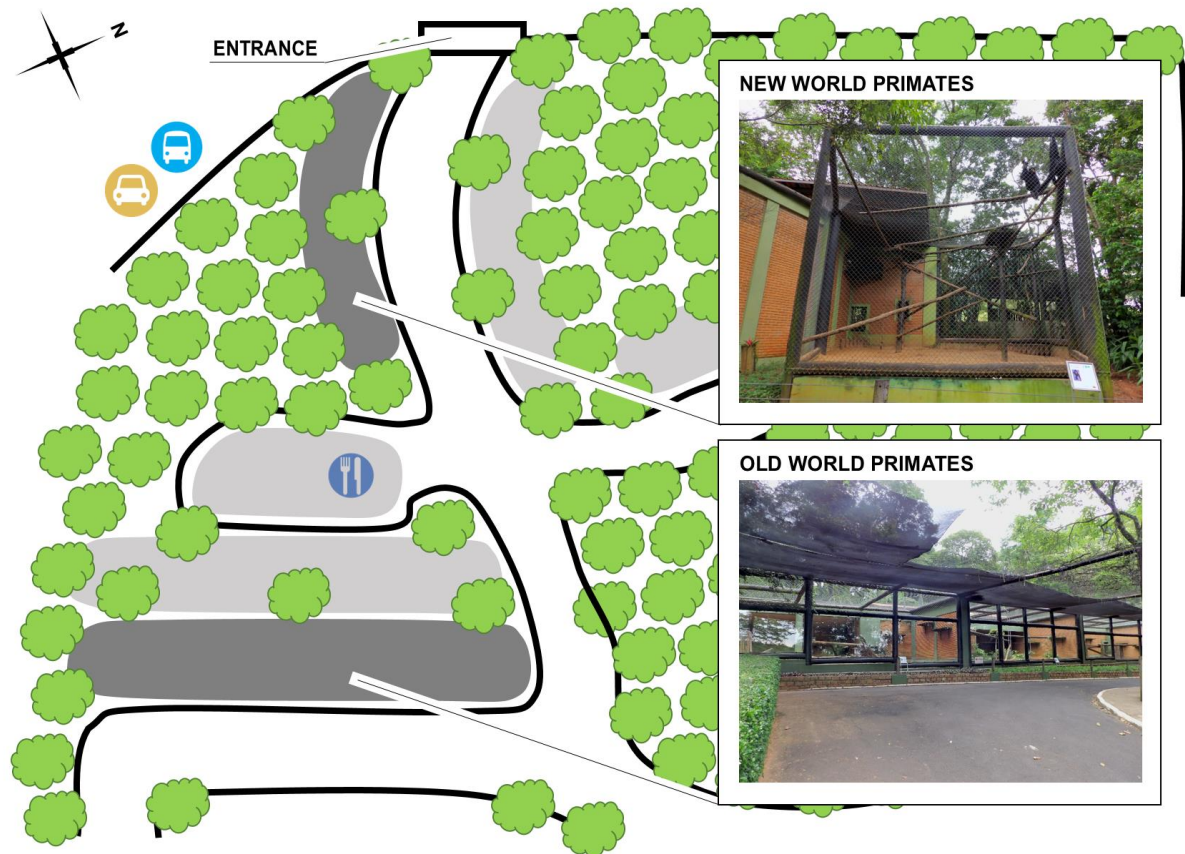


Fig. 2: Spatial distribution of primates from the study within the zoo. The areas in dark gray indicate the location of enclosures of primates, with the location image of each group, highlighted in boxes. Map without scale.

onclusão

Primatas de cativeiro do Zoo de Bauru são suscetíveis à infecção natural por tripanosomas, apontando que insetos vetores, tais como triatomíneos e moscas hematófagas, circulam livremente entre esses animais, utilizando-os como fonte para repasto sanguíneo. Ações de vigilância em saúde e busca ativa de possíveis vetores devem ser realizadas no zoológico, a fim de se possibilitar ações de prevenção da infecção para os animais, bem como para os tratadores e público visitante, como medida de saúde pública.

Anexos

Anexo 1: Autorização da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), da Unesp.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DPM nº 611 de 13/12/2012
CERTIFICADO Nº 1104/2015-CEUA			
CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1104/2014) Pesquisa de Trypanosoma Cruzi em primatas não humanos procedentes do parque Zoológico Municipal de Bauru, a ser conduzido por Wesley José dos Santos, orientado pela Prof^a Dr^a Simone Baldini Luchies, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "primatas não-humanos" são provenientes do Parque Zoológico Municipal de Bauru.			
CERTIFICAMOS que foi autorizada a utilização de "45 primatas não-humanos". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 05/03/2015			
 Prof. Adjunto Katashi Okoshi Presidente da CEUA		 Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br			

Anexo 2: Autorização SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade. Número: 45000-2



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: 45000-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:35	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* 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
Título do Projeto: PESQUISA DE Trypanosoma cruzi EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
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	Deteção de Trypanosoma cruzi em primatas não-humanos por meio de técnicas sorológicas e moleculares	08/2014	08/2016

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Wesley José dos Santos	Coleta e análise de material biológico	352.114.338-40	447419675 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BAURU	SP	Parque Zoológico Municipal de Bauru	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

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

Código de autenticação: 27526133





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: 45000-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:35	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* 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
Título do Projeto: PESQUISA DE Trypanosoma cruzi EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Mandrillus sphinx, Ateles marginatus, Alouatta belzebul, Alouatta fusca, Alouatta caraya, Papio hamadryas, Papio papio, Cebus albifrons, Ateles chamek, Erythrocebus patas, Callicebus personatus, Callicebus nigrifrons, Alouatta seniculus, Lagothrix lagotricha, Ateles paniscus
---	--	---

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primatas)	Captura manual, Puçá

Destino do material biológico coletado

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

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

Código de autenticação: 27526133



Página 2/4



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: 45000-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:35	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* 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
Título do Projeto: PESQUISA DE Trypanosoma cruzi EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
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 nº 03/2014, 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 (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

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

Código de autenticação: 27526133



Página 3/4



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: 45000-2	Data da Emissão: 13/07/2015 18:35	Data para Revalidação*: 11/08/2016
* 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
Título do Projeto: PESQUISA DE Trypanosoma cruzi EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU - SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 27526133



Página 4/4

Anexo 3: Protocolo utilizado para a Extração de DNA para pesquisa de *Trypanosoma cruzi* e região de microssatélite hsp70 de acordo com o *kit* comercial Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen Scientific®, USA).

Os microtubos com as amostras foram descongeladas em estantes refrigeradas. Em microtubos novos de 1,5mL livres de DNAsas e RNAsas foram acrescentados 500µL de Buffer AP1 e 200µL das amostras, sendo homogeneizados em agitador (*vortex*) por 10 segundos. Em seguida, foram adicionados 100µL de Buffer AP2 e homogeneizados em agitador por 10 segundos. Em seguida foram centrifugados por 20 minutos a 12.000rcf para decantação de detritos. Após essa etapa, o sobrenadante foi pipetado e transferido para a coluna dentro do tubo coletor do *kit*. Centrifugou-se a 12.000rcf durante 1 minuto. Após desprezar o líquido do tubo coletor, retornou a coluna ao tubo coletor e foram adicionados 700µL de Buffer W1A, deixando em temperatura ambiente por dois minutos. Em seguida, foi centrifugado a 12.000rcf por um minuto. Novamente desprezando o líquido do tubo coletor, foi adicionado 800µL de Buffer W2 à coluna e centrifugado a 12.000rcf por um minuto. Desprezando o líquido do tubo coletor, foi adicionado 500µL de Buffer W2 à coluna, centrifugando novamente a 12.000rcf durante um minuto. Para eliminação de qualquer líquido da reação, repete-se mais uma etapa de centrifugação a 12.000rcf por um minuto. O tubo coletor foi desprezado juntamente com o sobrenadante e a coluna colocada em microtubos de 1,5mL livres de DNAsas e RNAsas, onde foi adicionado 100µL de Buffer TE previamente aquecido à 65°C, deixando um minuto em temperatura ambiente para, em seguida, ser centrifugado a 12.000rcf por um minuto, obtendo-se a amostra de DNA a qual foi armazenada à -18 °C em freezer.

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

O procedimento foi realizado com o equipamento disponível no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz, Regional 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. Foi utilizado o *software* Gen 5 2.03 para registro dos dados, que podem ser vistos no Tabela 2, disponível no Apêndice 4.

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 proteínas².

² Silveira, M. C. A. Procedimentos em técnicas laboratoriais vegetais. 94 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Tocantins. 2010.

Anexo 5: Eletroforese em gel de agarose.

Para a corrida eletroforética, 10µL dos *amplicons* foram homogeneizados com 2µL da solução de azul de bromofenol e submetida a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, USA) 0,1µL/mL, em cuba horizontal (Labnet Enduro Gel XL) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A agarose foi dissolvida em TBE 1X previamente aquecido em micro-ondas e o material distribuído de forma uniforme na cuba horizontal. As amostras foram submetidas a uma tensão elétrica a 60V por 20 minutos, seguido de tensão elétrica a 100V por 30 minutos. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100bp DNA Ladder (Norgen, Canadá) e, como controles positivos, foram utilizados *amplicons* de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (para teste molecular para *Trypanosoma cruzi*, utilizando *primers* TCZ1/TCZ2) e *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (MHOM/BR/IOC/L2906) (para teste molecular para *primers* hsp70) mantidas sob cultivo em meio NNN-LIT em estufa B.O.D. a 25°C e repicadas quinzenalmente. Água ultrapura foi utilizado como controle negativo. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com as cepas padrão utilizadas como controles positivos expondo o gel à luz ultravioleta utilizando-se o Transluminador Syngene®.

Anexo 6: Purificação dos *amplicons* para realização do sequenciamento genético, com o uso de ExoSAP-IT® (USB Affymetrix, USA).

A ExoSAP-IT® é constituída por duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e alcalina fosfatase de camarão (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP). A exonuclease I remove quaisquer resíduos de *primer* na solução, enquanto a SAP quebra as bases (dNTPs) que não se ligaram na PCR.

Para o procedimento de purificação, a cada microtubo de 0,2mL foram acrescentados 4µL de ExoSAP-IT® e 10µL do produto da PCR. A mistura foi submetida em termociclador a 37 °C por uma hora, seguido de inativação das enzimas a 80 °C por 15 minutos, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a ciclagem em termociclador, foi feito uma breve diluição do produto nos microtubos utilizando água ultrapura, de acordo com as indicações para sequenciamento disponíveis no site do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBTec – UNESP)³. Em microtubos de 0,2mL livres de DNAses e RNAses foram acrescentados, separadamente, 5µL de cada um dos *primers sense* (ou *forward*) (F) e *anti-sense* (ou *reverse*) (R), na concentração de 5pmol/µL. Em cada microtubo com os *primers* F e R, foram acrescentados 10µL da amostra purificada. Foi estocado em temperatura ambiente até a realização do sequenciamento realizado pelo IBTec – UNESP.

³ Sequenciamento Sanger. IBTec – UNESP. Disponível em: <http://www.ibtec.unesp.br/#!/servicos/sequenciamento-sanger/>. Acessado 29 fev. 16.

Anexo 7: Sensibilização de lâminas para realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Trypanosoma cruzi*.

Lâminas próprias para imunofluorescência armazenadas em álcool 70% foram secas e mantidas protegidas de impurezas por 24 horas. A cultura com formas tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* mantidas em tubos rosqueados contendo 10mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e 5 mL de meio NNN (Novy, Mc Neal, Nicolle) foram aliquotadas e observadas em microscópio óptico 400X para avaliação de quantidade e motilidade dos protozoários. Transferiram-se 5 ml da cultura para tubos plásticos rosqueados (*falcon*). Em seguida, foram centrifugados a 3.000rpm durante 10 minutos. Foi descartado o sobrenadante e completado 5ml de PBS pH 7,2 (qsp). Foi homogeneizado em agitador por 10 segundos e, em seguida, centrifugado a 3.000rpm por 10 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante, completando com PBS pH 7,2 qsp e homogeneizando no agitador por 10 segundos. Realizou-se mais uma centrifugação a 3.000rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante e homogeneizando em agitador por 10 segundos. 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.

Anexo 8: Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), de acordo com Camargo (1966)⁴.

Foram utilizadas microplacas para realização da diluição inicial de 190µL de solução salina tamponada (PBS) 0,01M com 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 de soro 1:20 nas lâminas já fixadas com o *Trypanosoma cruzi*, sendo incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida. Foram realizadas duas lavagens das lâminas com PBS 0,01M, pH7,2 por 10 minutos sendo, em seguida, secas em estufa. Foi utilizado o conjugado específico contendo anti-anticorpo IgG de macaco (IgG – γ -chain specific - SAB3700765 – Sigma-Aldrich®, USA), diluído em solução de azul de Evans a 20%. O conjugado foi testado segundo as diluições: 1:400; 1:425; 1:450; 1:475; 1:500; 1:525; 1:550; 1:575 e 1:600. Estabeleceu-se como ponto de diluição 1:500, no 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 30 minutos. Lavou-se novamente por duas vezes com PBS 0,01M pH7,2 por 10 minutos 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 realizada a leitura das amostras dos soros. Foi considerado positivo as amostras de soro com titulação igual a 1:20. Em caso de soros positivos nessa diluição, as amostras seriam avaliadas em diluições maiores (1:40; 1:80; 1:160; 1:320 e 1:640) afim de se determinar a titulação final de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma* nos primatas.

⁴ CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med Trop São Paulo, v. 8, p. 227-234, 1966.

A diluição do conjugado específico anti-anticorpo IgG de macaco em 1:500 já havia sido descrita por Leite et al., (2008)⁵. Para verificar se no estudo essa diluição também seria válida, utilizou-se como controle positivo uma amostra de primata positivo anteriormente pela técnica sorológica de Aglutinação Direta Modificada (MAD) para pesquisa de *Toxoplasma gondii*. Após verificação, o conjugado permaneceu na diluição de 1:500.

⁵ LEITE, T. N. B., MAJA, T. A., OVANDO, T. M., CANTADORI, D. T., SCHIMIDT, L. R., GUÉRCIO, A. C., CAVALCANTI, A., LOPES, F. M. R., CUNHA, I. A. L., NAVARRO, I. T. Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii* em macacos-prego (*Cebus apella*) de Campo Grande, MS. Rev. Bras. Parasitol. Vet, v. 17, n. 1, p. 317-310, 2008.

A pênndices

Apêndice 1: Registro fotográfico do Parque Zoológico Municipal de Bauru e dos primatas do estudo.



Figura 1: Vista frontal do Parque Zoológico Municipal de Bauru, (Zoo Bauru). Fonte: arquivo pessoal.



Figura 2: Bilheteria do Zoo Bauru. Fonte: arquivo pessoal.

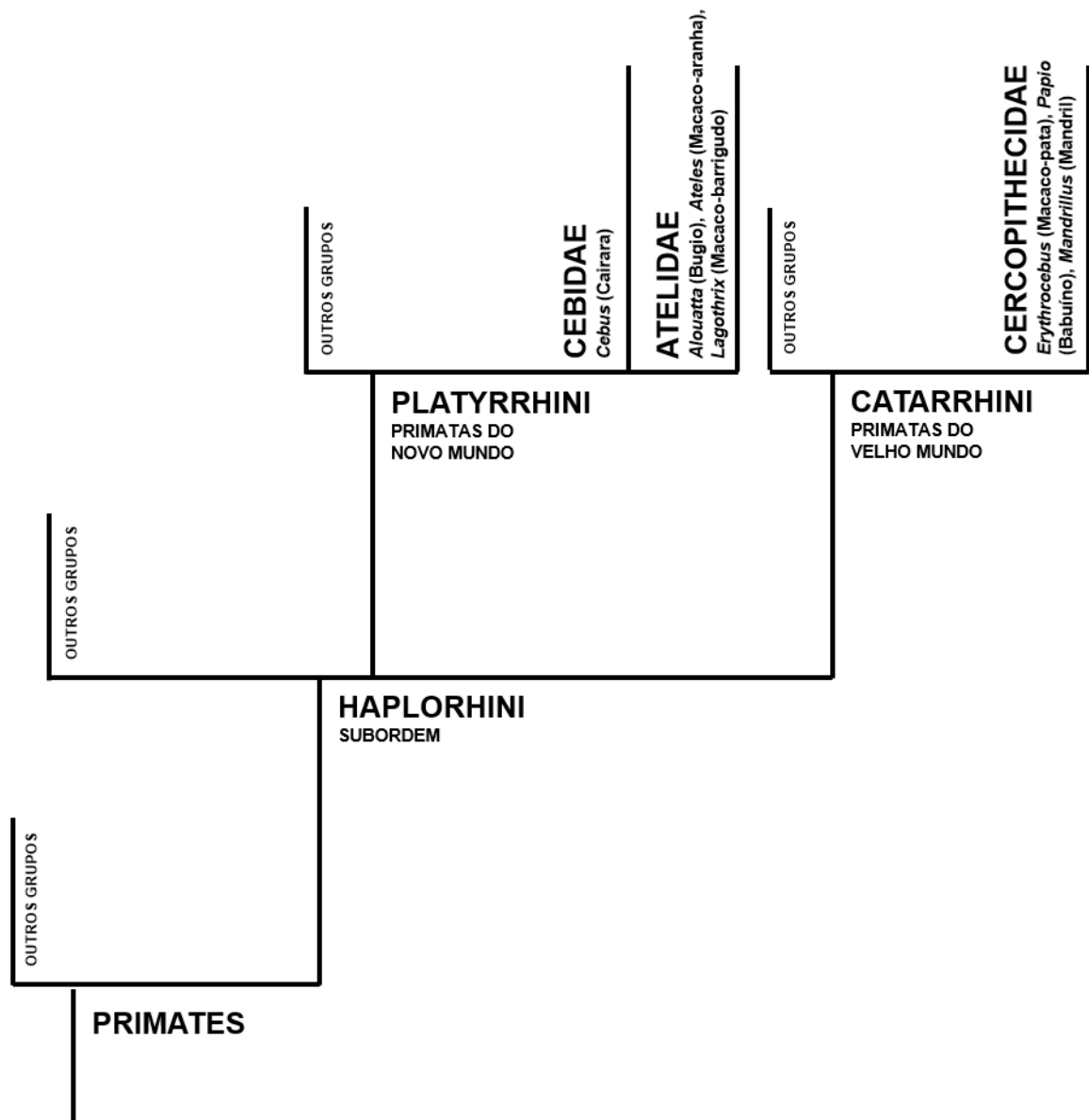


Figura 3: Clado simplificado das relações filogenéticas dos animais estudados. Todos as nove espécies de primata dos Novo Mundo estão em duas famílias, enquanto as quatro espécies de primatas do Velho Mundo estão em uma única família. As distâncias entre os galhos do clado não indicam a idade entre os grupos a partir de um ancestral comum, servindo apenas para ilustração de parentesco.

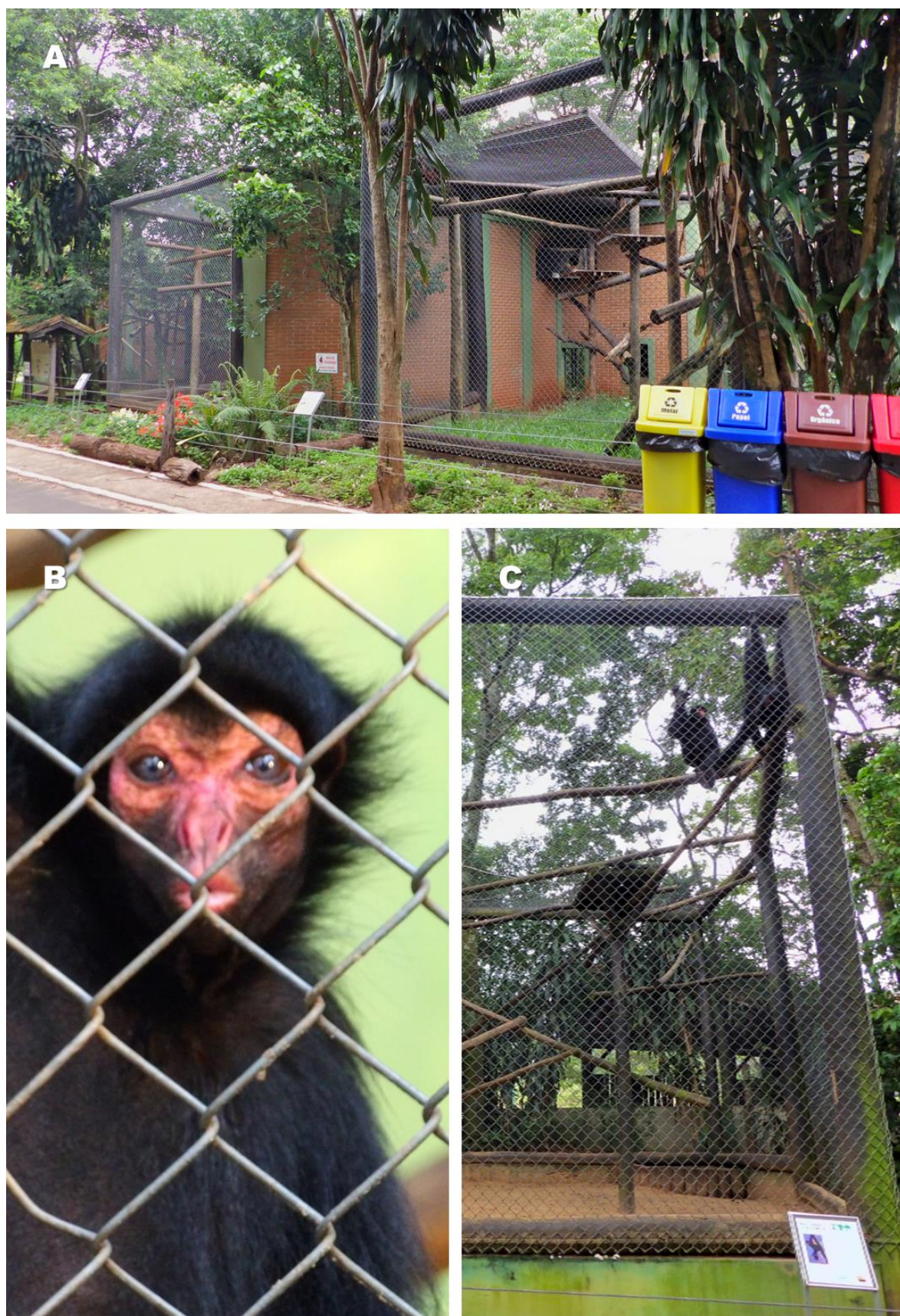


Figura 4: (A) Visão geral de alguns recintos de primatas neotropicais (nativos da América), (B) Macaco-aranha-de-cara-vermelha (*Ateles paniscus*), (C) Detalhe do recinto gradeado do *A. paniscus*. Fonte: arquivo pessoal.

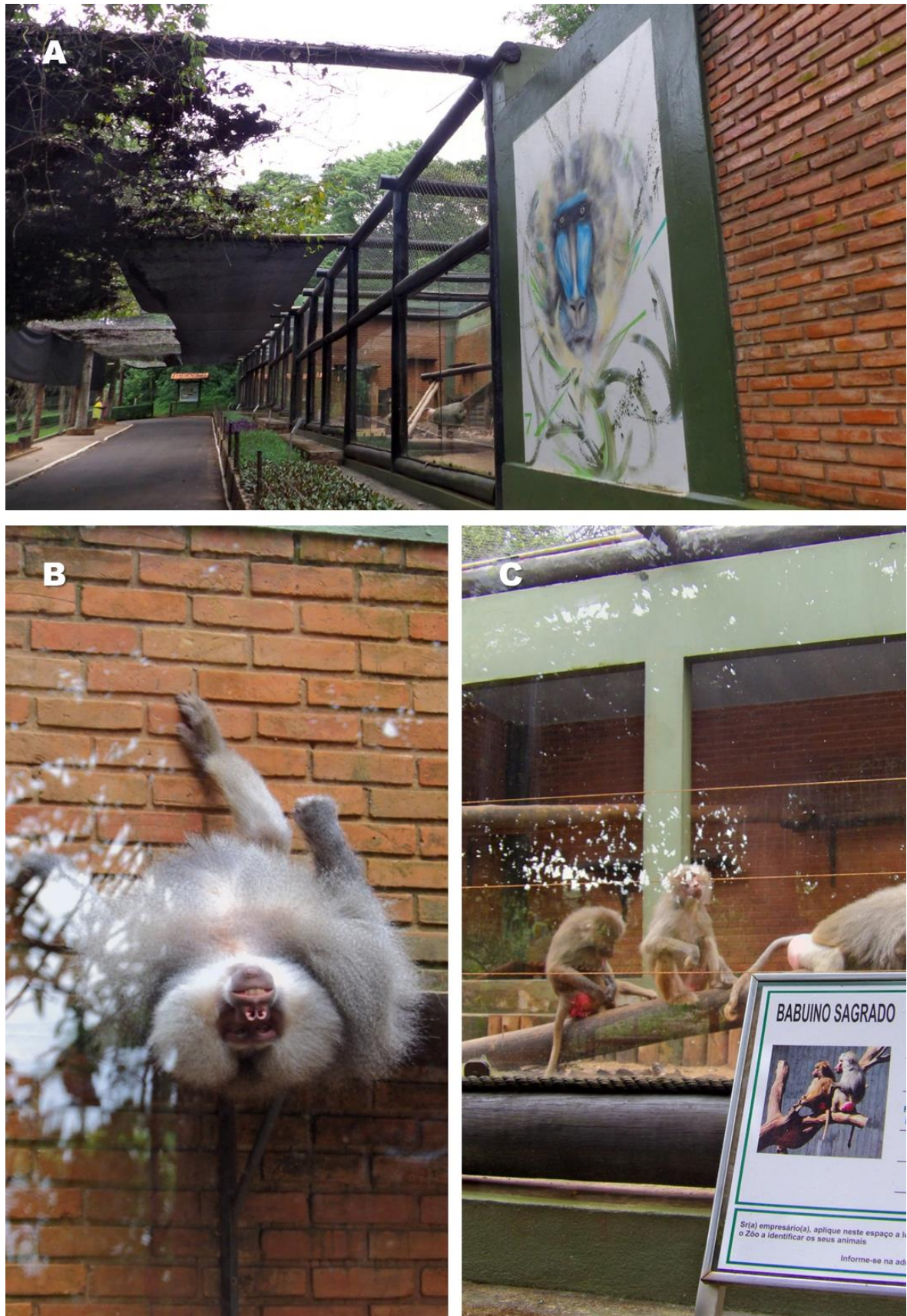


Figura 5: (A) Recinto dos primatas do Velho Mundo. Diferentemente dos demais primatas do zoológico, são fechados por um vidro na parte frontal, (B) Babuíno-comum (*Papio papio*) descansando em um suporte preso à parede, (C) Babuíno-sagrado (*Papio hamadryas*), interagindo com os demais membros do recinto. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 6: Coleta de sangue dos primatas do Zoo Bauru. (A) Mandril (*Mandrillus sphinx*), (B) Bugio-preto (*Alouatta caraya*), (C) Babuíno-comum (*P. papio*). Fonte: arquivo pessoal.

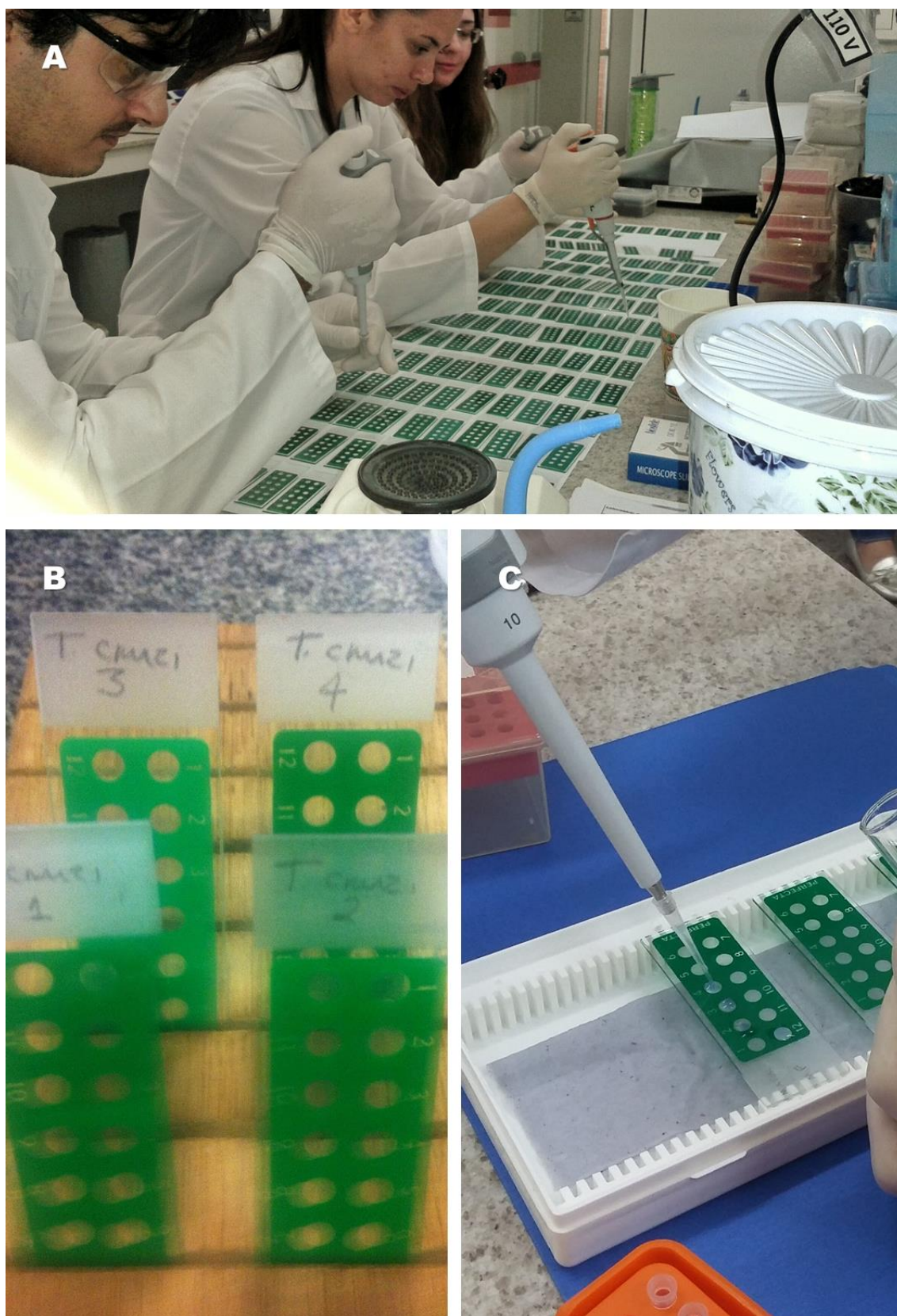
Apêndice 2: Técnica sorológica de RIFI.

Figura 7: (A) Sensibilização de lâminas para a técnica de RIFI, (B e C) Procedimento para exame sorológico de RIFI. Fonte: (A) Laboratório de Sanidade Animal de Bauru (LASAB), (B e C) arquivo pessoal.

Apêndice 3: Técnica molecular de PCR.

Figura 8: (A e B) Pipetagem do mix-PCR e adição de amostras de DNA extraídas, (C) Detalhe dos microtubos com mix-PCR com DNA extraído mantidos em cooler. Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice 4: Tabelas e dados organizados.

Tabela 1: Informações de sexo e origem dos primatas do Parque Zoológico Municipal de Bauru utilizados no estudo.

Primata	Sexo	Origem (data de entrada)
<i>Alouatta belzebul</i>		
01	F	Norte do Brasil (2006)
02	M	Santarém, PA (2013)
<i>Alouatta caraya</i>		
03	M	Desconhecido (2005)
04	M	Ribeirão Preto, SP (2002)
05	M	NZ
06	F	NZ
07	F	Ribeirão Preto, SP (2002)
<i>Alouatta fusca</i>		
08	F	SP (2002)
<i>Alouatta seniculus</i>		
09	M	Norte do Brasil (2001)
10	F	RO (2006)
<i>Ateles chamek</i>		
11	F	RR (2011)
12	F	Desconhecido (2007)
13	M	Centro-Oeste do Brasil (2007)
<i>Ateles marginatus</i>		
14	M	Santarém, PA (2004)
15	F	SP (2012)
16	F	Santarém, PA (2004)
<i>Ateles paniscus</i>		
17	M	Norte do Brasil (2007)
18	F	Norte do Brasil (2007)
<i>Cebus albifrons</i>		
19	F	Desconhecido (2005)
20	M	Desconhecido (2005)
<i>Erythrocebus pata</i>		
21	F	NZ
22	F	NZ
23	M	SP (2013)
<i>Lagothrix lagotricha</i>		
24	M	Norte do Brasil (2008)
25	F	Norte do Brasil (2007)
26	F	Norte do Brasil (2007)
<i>Mandrillus sphinx</i>		
27	M	PR (2006)
28	F	NZ
29	F	NZ
30	M	SC (2013)
<i>Papio hamadryas</i>		
31	F	NZ
32	M	NZ

33	F	NZ
34	F	NZ
35	F	NZ
36	M	NZ
37	F	NZ
38	M	NZ
<i>Papio papio</i>		
39	F	Desconhecido (1999)

M = macho; F = fêmea; NZ = nascido no zoológico de Bauru.

Tabela 2: Quantificação do DNA de 39 amostras de sangue de primatas não humanos do Zoológico de Bauru.

Amostra	Relação $^{260}/_{280}$	DNA na amostra (ng/ μ l)
01	1,91	31,3
02	1,89	52,2
03	1,92	74,5
04	1,87	107,3
05	1,95	63,9
06	1,96	17,0
07	1,94	180,7
08	1,92	33,4
09	1,91	29,1
10	1,88	29,1
11	1,95	40,0
12	1,95	89,4
13	1,94	78,3
14	1,96	80,4
15	1,88	61,2
16	1,95	44,7
17	2,00	62,4
18	2,03	47,8
19	1,94	15,0
20	2,05	11,5
21	1,98	38,3
22	1,93	40,3
23	1,85	32,0
24	2,01	284,5
25	1,93	20,5
26	2,04	27,5
27	1,68	16,4
28	1,85	64,8
29	1,83	49,6
30	2,02	22,1
31	1,95	71,7
32	1,95	49,3
33	1,96	102,3
34	1,94	184,8
35	1,95	73,2
36	1,91	52,4
37	1,97	276,4
38	1,93	46,2
39	1,92	78,2

Tabela 3: Resultados gerais das técnicas moleculares e sorológica para 39 primatas não-humanos do Zoo Bauru.

Espécie	Nº ident.	Molecular <i>Trypanosoma cruzi</i>	hsp70	Sorológico <i>T. cruzi</i>
<i>Alouatta belzebul</i>				
	01	N	N	NR
	02	N	N	NR
<i>Alouatta caraya</i>				
	03	N	N	NR
	04	N	N	NR
	05	N	N	NR
	06	N	N	NR
	07	N	P	NR
<i>Alouatta fusca</i>				
	08	N	N	NR
<i>Alouatta seniculus</i>				
	09	N	P	SI
	10	N	N	NR
<i>Ateles chamek</i>				
	11	N	P	NR
	12	N	N	SI
	13	N	P	NR
<i>Ateles marginatus</i>				
	14	N	N	NR
	15	N	N	NR
	16	N	N	NR
<i>Ateles paniscus</i>				
	17	N	N	NR
	18	N	N	NR
<i>Cebus albifrons</i>				
	19	N	P	NR
	20	N	N	NR
<i>Erythrocebus pata</i>				
	21	N	N	NR
	22	N	P	SI
	23	N	N	NR
<i>Lagothrix lagotricha</i>				
	24	N	N	NR
	25	N	P	NR
	26	N	P	NR
<i>Mandrillus sphinx</i>				
	27	N	N	NR
	28	N	N	NR
	29	N	N	NR
	30	N	N	NR
<i>Papio hamadryas</i>				
	31	N	N	NR
	32	N	P	NR
	33	N	P	NR
	34	N	N	NR

35	N	N	NR
36	N	N	NR
37	N	N	SI
38	N	N	SI
<i>Papio papio</i>			
39	N	P	NR

NR = não reagente; SI = soro insuficiente para a realização da técnica; P = positivo; N = negativo.