

MARINA GALVÃO BUENO

Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ*

SÃO PAULO
2012



MARINA GALVÃO BUENO

Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

**São Paulo
2012**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.


BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

2011/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2544
FMVZ

Bueno, Marina Galvão

Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ* / Marina Galvão Bueno. -- 2012.

298 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. Primatas Neotropicais. 2. Mata Atlântica. 3. Amazônia. 4. *Leishmania*.
5. *Plasmodium*. 6. Parasitologia. I. Título.

ERRATA

BUENO, M. G. Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ*. 2012. 298f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º	298 f.	297 f.
Resumo	1º	298f.	297 f.
Abstract	1º	298f.	297 f.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa da ocorrência de Leishmania e Plasmodium spp. e Trypanosoma spp. em primatas neotropicais de vida livre e mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo e Região Amazônica", protocolado sob o nº 1617, utilizando 160 (cento e sessenta) primatas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Survey of Leishmania and Plasmodium spp. and trypanosoma spp. infections in free ranging and captive neotropical pimates in the State of São Paulo and Amazon regions", protocol number 1617, utilizing 160 (one hundred sixty) primates, under the responsibility Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 21 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



MUSEU DE ZOOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Caixa Postal 42594 - CEP 04299 - 970 - São Paulo, SP - Brasil
 Fone: (55)(11) 6165.8100 - Fax: (55)(11) 6165.8113 / 6165.8116
 http://www.mz.usp.br

**REMESSA DE ESPECIMENS
 (SHIPPING INVOICE)**

Nº: 03 2011
 LAB. (COLLECTION) AVES
 DATA: (DATE) 26/01/2011

PERMUTA EXCHANGE DEVOLUÇÃO RETURN
 IDENTIFICAÇÃO IDENTIFICATION DOAÇÃO GIFT
 EMPRÉSTIMO LOAN MESES, RENOVÁVEL, A PEDIDO MONTHS, RENEWABLE, ON REQUEST

ENVIADO PARA (SENT TO)

Prof. Dr. José Luiz Catão Dias
 Depto. Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
 Universidade de São Paulo, USP

ENVIAMOS O MATERIAL ABAIXO RELACIONADO (WE HAVE SENT THE SPECIMENS LISTED BELOW)

PRESERVADO EM (PRESERVED IN): Fragmentos de tecidos para análise parasitológica, sem valor comercial, conservados em esfregaço sanguíneo e meio inerte

Número	Espécie
01	Pionus menstruus
02	Selenidera reinwardtii
03	Pionus menstruus
04	Pteroglossus inscriptus
05	Amazona farinosa
06	Neomorphus geoffroyi
07	Saimiri boliviensis
08	Pithecia sp.
09	Lagothrix cana
10	Lagothrix cana
11	Callicebus dubius
12	Callicebus aff. brunneus
13	Cebus apella
14	Callicebus aff. brunneus
15	Aotus infulatus

MATERIAL ENVIADO DE ACORDO COM RESOLUÇÃO Nº 001, DE 8 DE JULHO DE 2002, DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (MEDIDA PROVISÓRIA N 2.186-16, DE 2001)

NÚMERO TOTAL DE LOTES (TOTAL NUMBER OF LOTS) 01 NÚMERO TOTAL DE EXEMPLARES (TOTAL NUMBER OF SPECIMENS) 15
 ENCAMINHADO POR (INITIATED BY) (assinatura) AUTORIZADO POR (AUTHORIZED BY) (assinatura)

Recebido em boas condições Pede-se assinar, datar e devolver uma cópia ao MZUSP
 (Received in good condition) Please sign, date and return one copy to MZUSP



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 18861-4	Data da Emissão: 29/11/2010 18:25
Dados do titular	
Nome: José Luiz Catão Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Pesquisa da ocorrência de Leishmania e Plasmodium spp. em Primatas Neotropicais de vida livre e mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo.	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colheita de material	02/2009	08/2011
2	Processamento do material	02/2009	10/2011
3	Elaboração dos relatórios técnicos, parcial e final	06/2009	06/2010

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

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 passa da, 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 NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, ou do proprietário, arrendatário, possessor 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 IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 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). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
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	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.
7	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.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	O planejamento e execução das atividades de contenção (física e química) e de coleta de material biológico EX SITU é de responsabilidade da equipe técnica do mantenedor e devem ser acordadas previamente com os executores do projeto.
2	O titular da licença ou membro da equipe fica responsável por fazer uma palestra de apresentação da Pesquisa nas comunidades da RESEX e integrar comunitários de acordo com a necessidade do Estudo como mateiros, ajudantes de campo.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	marina galvão bueno	Executora	251.174.338-82	23878020-x ssp/sp-SP	Brasileira
2	Fábio Rôhe	Colaborador	169.962.128-47	21462006 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO JOAQUIM DA BARRA	SP	Estado de São Paulo	Fora de UC
2	LORENA	SP	Lorena SP	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 18925894





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: 18861-4	Data da Emissão: 29/11/2010 18:25
------------------------	--

Dados do titular

Nome: José Luiz Catão Dias	CPF: 029.597.888-00
Título do Projeto: Pesquisa da ocorrência de Leishmania e Plasmodium spp. em Primatas Neotropicais de vida livre e mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo.	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

3	SAO PAULO	SP	DEPAVE	Fora de UC
4	PORTO VELHO	RO	Porto Velho à Abunã	Fora de UC
5		RO	Abunã	Fora de UC
6		RO	Jirau	Fora de UC
7	MANAUS	AM	PARNA Nascentes do Lago Jari	Fora de UC
8		AM	RESERVA EXTRATIVISTA DO LAGO DO CAPANA GRANDE	UC Federal
9		AM	RDS Igapo-açú (Gestao Estadual)	Fora de UC
10		AM	RDS rio Amapa G_Est	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Primates
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Primates
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Primates

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primates)	Fragmento de tecido/órgão, Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
2	Método de captura/coleta (Primates)	Captura manual, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Puçã

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	Laboratório de Patologia Comparada (LAPCOM) do Departamento de Patologia (VPT), da FMVZ-USP

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 18925894



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 18861-4		Data da Emissão: 29/11/2010 18:25	
Dados do titular			
Nome: José Luiz Catão Dias		CPF: 029.597.888-00	
Título do Projeto: Pesquisa da ocorrência de Leishmania e Plasmodium spp. em Primatas Neotropicais de vida livre e mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo.			
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP			CNPJ: 63.025.530/0019-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, 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

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. 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: 18925894



Nome: BUENO, Marina Galvão

TÍTULO: Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que me ensinaram a seguir e realizar tudo aquilo que sonhamos e acreditamos. O apoio à todas as difíceis decisões tomadas durante a viabilização desta pesquisa foram fundamentais para a qualidade do trabalho. Por isso, sou imensamente grata. Sem a ajuda de vocês, a realização deste projeto não teria sido possível.

OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Ao amigo, orientador e Professor Dr. José Luiz Catão-Dias, pelos ensinamentos, ajuda, compreensão e acima de tudo constante apoio, sempre, principalmente nos momentos mais difíceis. Serei sempre grata pelas conversas e orientações, que acontecem desde 1999. Obrigada por transferir os seus conhecimentos; e além disso, sempre me ensinar que:

*“Tudo é uma questão de manter,
a mente quieta,
a espinha ereta,
e o coração tranquilo...”*

OBRIGADA!

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais. Ao meu querido irmão Felipe.

Ao Departamento de Patologia pelo apoio e consentimento para realização deste projeto. Aos funcionários da instituição, aos técnicos do laboratório de histopatologia (Cláudio Arroyo e Luciano A. Bugalho), às secretárias da patologia (Adriana S. Margarido, Milena F. de Oliveira e Maria e Tereza Cristina A. Mário) e da pós-graduação (Cláudia Lima, Dalva T.V. Alves e Marli C. Ribeiro).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado direto (Processo nº 2009/53561-4) e do auxílio a pesquisa (Processo nº 2009/51466-4).

Ao Departamento de Parques e Áreas Verdes - DEPAVE III, da Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, da Prefeitura de São Paulo, por permitir a anestesia e coleta das amostras biológicas dos primatas, nas figuras de: Dra. Vilma C. Geraldi, Dra. Maria Eugenia L. Summa, Dra. Antonieta Rosa Bauab, Dra. Vera Lúcia de Oliveira e ainda à amiga Dra. Adriana Jopper, pela pronta disponibilidade de ajuda sempre.

Ao CETAS de Lorena do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pelo consentimento da anestesia e colheita das amostras dos primatas, na figura do biólogo Daniel P. Nogueira, demais colegas, tratadores e auxiliares.

Ao CETAS - Refúgio Mata Atlântica Lello – UNIMONTE pelo consentimento de coletadas amostras dos primatas, na figura da amiga Dra. Claudia Nascimento e demais tratadores e auxiliares.

Ao CRAS “Orlando Vilas Boas” do Parque Ecológico do Tietê pelo consentimento na coleta de material biológico do *Callicebus nigrifrons*. Em especial aos colegas Dra. Liliane Milanelo, Dr. Bruno Petri e a grande e querida amiga Dra. Thaís Guimarães Luis.

Ao Parque Zoológico Municipal de Bauru, pelo consentimento na coleta do material biológico dos primatas na figura do Dr. Luis Antonio da Silva Pires e ainda dos colegas, Dra. Maria Emilia Bodini Santiago, Dr. Lauro Leite Soares Neto e Dr. Gerson Rodrigues pela compreensão, grande ajuda na contenção dos animais e coleta

de material. Agradeço também aos tratadores e demais funcionários que ajudaram nos dias de coleta e captura.

Ao Horto Florestal de Bauru e Instituto Florestal (IF) pela ajuda na captura e coleta de material dos primatas do Horto, na figura dos amigos queridos, Marcio Port Carvalho e Aido sato.

À Wildlife Management (WLM) Consultoria Veterinária Ltda, esta na figura do colega Rodrigo del Rio do Valle, pelo consentimento e coleta das amostras durante a construção da PCH Anhanguera, em São Joaquim da Barra e Guará, SP. Agradeço ainda à Central Elétrica Anhanguera (Celan) e também a todos os colegas, na época funcionários da WLM, pela compreensão e coleta do material: Fernanda, Thais, Renata, Alex, Rogério, Thalita, Taís, Fer Rosa, Ligia, Michele, Mário, Flávio e Francisco.

Ao Museu de Zoologia pelas autorização e apoio no trabalho de campo. Agradeço também pela doação do material biológico (In voice n.03-2011) para que fosse utilizado neste e em outros trabalhos.

Ao grande e querido amigo Dr. Luís Fábio Silveira, Prof. do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), pelo consentimento e grande ajuda durante o trabalho de campo em Rondônia, Abunã. Agradeço ainda à toda equipe e colaboradores do laboratório de ornitologia do MZUSP, em especial ao Patrick Pina pela ajuda na coleta das amostras durante a viagem de campo, e ao Marco Antonio Rego pela grande ajuda na confecção do mapa (Figura 49).

À Wildlife Conservation Society (WCS-Brasil), pelo consentimento e grande ajuda durante o trabalho de campo na BR-319, Amazonas, nas figuras dos amigos: Fabio Hore, Jean Boubli, Jefferson B. Oliveira, Austem Andrade, Anderson, André P. Antunes, Flavia Miranda, Catia Dejuste e em especial ao assistente de campo Sebastiao Salles (Sr. "Sabath").

Ao Laboratório de Patologia das Moléstias infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP/ LIM 50), pela colaboração e parceria neste projeto, na figura do Prof Dr. Carlos Corbett e Profa. Dra. Marcia Dalastra Laurenti.

À Profa. Dra. Marcia Dalastra Laurenti e Profa. Dra. Vania Ribeiro da Matta, pela amizade, paciência e incentivo constantes. Obrigada por terem me transmitido seus conhecimentos científicos, me recebido de braços abertos, incluindo me na equipe do laboratório (FMUSP/LIM50), dando assim, apoio incondicional e extensa contribuição a este estudo.

Às amigas do LIM50/FMUSP pela grande ajuda durante este trabalho, além dos momentos de risos e acolhimento nas horas de insegurança: Thaise Y. Tomokane, Mariana Aschar, Fernanda Francesquini, Maria Fernanda Rosa.

Aos funcionários e amigos do LIM-50 pelo acolhimento, ensinamento e pelas boas risadas: Felipe Passero, Ana Carolina Stocco de Lima, Ana Kely de Carvalho, Claudio Rossi, Malu, Edson Tadeu Fernanda Rodrigues, Joyce Meneses, Izildinha Moraes, Marcela Issa Roques, Fabio Batista, Dra. Cláudia Gomes e Lia Negrão (Lia: Obrigada pela ajuda sempre que solicitada em especial na disciplina de Antropologia Médica).

Ao Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira, do Instituto Evandro Chagas, por seder os soros controles dos primatas do CENP para realização da padronização dos testes sorológicos e pela transmissão do seu grande conhecimento sobre as Leishmanioses, assim como incentivo ao projeto.

Ao Núcleo de Estudos em Malária do Núcleo de Endemias da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, representado pela chefe do laboratório, Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi. Agradeço a ajuda na execução das leituras da gota espessa para diagnóstico de plasmódio, transferência de conhecimento e consentimento para realização dos testes neste laboratório.

À pesquisadora Dra. Karin Kirchgatter, do Núcleo de Estudos em Malária do Núcleo de Endemias da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, pela amizade, compreensão, transferência de conhecimento, orientação e ajuda na execução dos testes moleculares para diagnóstico de plasmódio. Agradeço também a querida amiga e colega deste laboratório, Lilian Guimarães, pela grande ajuda com a PCR.

Aos funcionários do Núcleo de Estudos em Malária do Núcleo de Endemias da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, Maria de Jesus C.

Nascimento e Christina R. C. Toniolo pela ajuda com as leituras das lâminas de gota espessa e aos demais colegas e funcionários desta instituição.

Ao Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT), na figura da Profa. Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez. Obrigada pelo acolhimento em seu laboratório, paciência, divulgação do conhecimento científico e ajuda na realização dos testes sorológicos para diagnóstico de anticorpos anti-plasmodium. Agradeço ainda a grande ajuda da colega Arianni Sanchez na execução do ELISA e ao ótimo convívio no laboratório com a Profa. Dra. Guita L. Elefant e a colega Tania Barbosa.

Ao Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical (IMT), nas figuras da Profa Dra. Eufrozina Umezawa e do técnico Dr. Norival Junior Kesper. Obrigada pela imediata e excelente recepção ao laboratório e parceria para execução do TESA-Blot, além das orientações quanto às pesquisas.

À aluna de Iniciação Científica, Camila Molina, pela ajuda e paciência com a correria do dia a dia. Tenho muito prazer em poder participar da sua formação acadêmica e agradeço muito à toda ajuda prestada.

À grandes e queridas amigas Catia Dejuste e a Claudia Niemeyer que me ajudaram na coleta dos materiais biológicos dos primatas, no CETAS de Lorena e em Bauru, respectivamente.

Aos colegas e amigos, Patrícia Coutinho, Suelen S. Ferreira, Mario F. Rego pela ajuda durante as coletas no DEPAVE.

Agradecimento especialmente à Elza Faquim da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela atenção, paciência e ajuda durante a formatação desta tese.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela convivência, troca de conhecimento, amizade, consolo e risos: Omar Gonzales, Catia Dejuste, Cláudia Niemeyer, Stephanie Santos, Vivian Ferreira, Alex Genoy, Angélica Sarmiento, Fabíola Prioste, Gustavo Bauer, Katia Groch, Alice Oliveira, Marina Cesar, Patrícia Coutinho, Pedro Oliveira, Alice Oliveira, Ralph Vanstreels, Renata F. Santos, Rosely

Gioia, Sávio Sant'anna,, Silmara Rossi, Ticiana Zwarg, Adriana Siqueira, Martha Brito, Daniel Sanches e Luciana Torres.

Ao Jorge Oyakawa do LAPCOM pela grande ajuda com a organização do material de coleta e com o meu projeto.

Ao Prof. Dr. Rodrigo M. Soares, do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal (VPS) pela ajuda e orientação quanto à padronização da PCR para diagnóstico de *Leishmania* spp.

Ao Lucas Chaible, colega e amigo do Departamento de Patologia pela ajuda na padronização da PCR para diagnóstico de *Leishmania* spp.

Ao San Diego Zoological Society pela oportunidade de treinamento no laboratório de Biologia Molecular do Wildlife Disease Laboratories do Institute for Conservation Research (ICR), na figura do M.V.PHD. Dr. Bruce Rideout, e em especial, ao M.V.PHD Dr. Mark Schrenzel por ter auxiliado e indicado o uso do TMAC na padronização da PCR para diagnóstico de *Leishmania* spp.

Às minhas grandes e queridas amigas da vida e da alma: Tarsila G. Sakamoto e Ivone Kuribara, obrigada pelo constante apoio. Luciana Mirotti, obrigada pela ajuda com a revisão; Katia Haipek, obrigada pela capa e pelas lindas figuras; Paula Bertagna: obrigada pela ajuda e presença desde 1998, não importa se na Inglaterra ou no Canadá... estão sempre presentes...Obrigada !

Aos meus querido amigos: Mariana Suyama, Juliana Caldeira, Fabiana Marques, Flavia Miranda, Catia Dejuste, Ariela Setzer, Silvia Godoy, Erica Pacífico, Tiago K. de Melo (obrigada pela ajuda com o Mac), e a todos os demais amigos que em algum momento me ajudaram dando força e contribuição a este projeto.

Ao querido Marcelo, pela paciência nos momentos de estresse, carinho e compreensão sempre.

E à todos que contribuíram de uma forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*O que me impressiona, à vista de um macaco, não é que ele tenha sido
nosso passado: é este pressentimento de que ele venha a ser nosso
futuro”.*

(Mário Quintana)

*Começo aqui,
E meço aqui este começo
E recomeço.
Remeço e arremesso
E aqui me meço
E começo*

(Haroldo de Campos)

RESUMO

BUENO, M. G. **Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas:** investigação *in situ* e *ex situ*. [Survey of *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp in neotropical primates from Atlantic Forest and Amazon Regions impacted by humans activities: *in situ* and *ex situ* study]. 2012. 298f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Este trabalho investigou a ocorrência de infecções causadas por *Plasmodium* spp. e *Leishmania* spp. em primatas neotropicais mantidos em cativeiro e de vida livre, oriundos de regiões impactadas pelo homem nos biomas Mata Atlântica e Amazônia. Os agentes parasitários investigados são responsáveis por processos zoonóticos que acometem humanos, animais domésticos e selvagens, com significativas perdas ambientais e econômicas. Amostras biológicas foram colhidas e submetidas para análise parasitária por testes sorológicos e moleculares. Com relação aos plasmódios, os resultados alcançados sugerem a transmissão de *Plasmodium* spp. entre os primatas de cativeiro e de vida livre. No estado de São Paulo, nossos dados apontam para a circulação de *P. malariae* e *P. simium*, sendo este último encontrado em *Callicebus nigrifrons*. Na Amazônia, nossos dados indicam a circulação de *P. brasilianum*. Com relação às leishmanias, demonstramos que circula entre os primatas de cativeiro do estado de São Paulo a *L. (L.) chagasi*, as *L. (L.) amazonensis* e as leishmanias do complexo Viannia. Na região amazônica, 5,2% (1/19) foram positivos no PCR de sangue para *L. (L.) chagasi*. Os resultados deste trabalho podem subsidiar abordagens sanitárias públicas e veterinárias com relação aos primatas neotropicais existentes no estado de São Paulo e nas regiões Amazônicas.

Palavras-chave: Primatas Neotropicais. Mata Atlântica. Amazônia. *Leishmania*. *Plasmodium*. Parasitologia.

ABSTRACT

BUENO, M. G. **Survey of *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp. in neotropical primates from Atlantic Forest and Amazon Regions impacted by humans activities:** *in situ* and *ex situ* study. [Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ*]. 2012. 298f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

This study investigated the occurrence of infections caused by *Plasmodium* spp. and *Leishmania* spp. in neotropical primates. Specimens were obtained both in captivity and in the wild in regions impacted by human activities in the Atlantic Forest and Amazon, Brazil. The pathogens investigated are responsible for significant zoonotic processes that affect humans, domestic and wild animals, with significant economic and environmental losses. The samples were collected and submitted for analysis by serological and molecular tests. The results suggest the transmission of *Plasmodium* spp. in primates from captive to those in the wild. In São Paulo state our data point for the presence of *P. malariae* and *P. simium*, this latter being found in *Callicebus nigrifrons*. In the Amazon, our data indicate the presence of *P. brasilianum*. *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, *L.* (*L.*) *amazonensis* and the *Leishmania* Viannia complex circulates among the captive primates in São Paulo state. In the Amazon, 5.2% (1/19) of the primates sampled were detected by PCR as positive for *L.* (*L.*) *chagasi*. The results of this work may improve animal and public health approaches in relation to the neotropical primates in the regions studied.

Keywords: Neotropical Primates. *Leishmania*. *Plasmodium*. Atlantic Forest. Amazon, Parasitology.

LISTA DE TABELAS

Figura 1 - Distribuição global dos vetores dominantes ou potencialmente importantes para a transmissão da Malária (CDC, 2011a) – São Paulo- 2012	41
Figura 2 - Ciclo biológico do Plasmodium spp. evidenciando a fase no anofelino vetor e no humano (CDC, 2011b) – São Paulo-2012	43
Figura 3 - Distribuição da malária no mundo (CDC, 2011c) – São Paulo-2012	44
Figura 4 - Mapa de risco da malária, por município de infecção. Amazônia legal, 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) – São Paulo- 2012.....	45
Figura 5 - Número de casos de malária autóctone, estado de São Paulo, 1980 a 2007 (COUTO et al., 2010) – São Paulo- 2012.....	46
Figura 6 - Chave taxonômica de <i>Leishmania</i> (WHO, 2010) – São Paulo- 2012.....	56
Figura 7 - Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i> , demonstrando as duas formas evolutivas: promastigotas (vetor) e amastigotas (hospedeiro vertebrado) (CDC, 2011b) – São Paulo-2012.....	58
Figura 8 - (a) Formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , oriundas de cultura, em fase estacionária de crescimento (Giemsa - 100x). (b) Formas amastigotas (seta) de <i>Leishmania</i> sp., no interior do citoplasma do macrófago (Citologia aspirativa de linfonodo de cão) (Giemsa - 100x) – São Paulo-2012	59
Figura 9 - Incidência de casos de Leishmaniose Tegumentar por município, no Brasil. Sinan, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2007 (BRASIL, 2007) – São Paulo-2012.....	61
Figura 10 - Representação dos diferentes ecossistemas, tanto silvestre quanto doméstico, que podem circular o vetor e ocorrer a Leishmaniose Tegumentar – São Paulo- 2012	63
Figura 11 - Incidência de casos de Leishmaniose Visceral por município, no Brasil. Sinan, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) – São Paulo – 2012.....	66
Figura 12 - Representação da Leishmaniose Visceral encontrada em grandes centros urbanos e os animais que podem vir a fazer parte do ciclo epidemiológico nestes locais – São Paulo-2012.....	67
Figura 13 - Classificação epidemiológica da AA pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (SES/SP, 2011) – São Paulo – 2012.....	70
Figura 14 - Distribuição de municípios do estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral americana, novembro de 2011 (SES/SP, 2011) – São Paulo – 2012.....	70
Figura 15 - Minicírculo de <i>Leishmania</i> composto por uma molécula de DNA circular. Visualiza-se região conservada e variável (PEREIRA-CHICCOLA, 2009) – São Paulo – 2012.....	80
Figura 16 - Mapa do Brasil evidenciando os locais e as regiões usadas na colheita de amostras biológicas de PNT: (A) estado de São Paulo, (B) Rondônia e (C) Amazonas – São Paulo/Amazônia – 2008-2012	83
Figura 17 - Imagem aérea do Parque Anhanguera, no bairro de Perus, São Paulo (à esquerda), e foto de recinto externo para manutenção de saguis (<i>Callithrix</i> spp.) (à direita) localizado no DEPAVE-CRAS – São Paulo- 2009.....	84

Figura 18 - Recinto externo (à esquerda) utilizado para abrigar primata, como <i>Cebus</i> e <i>Alouatta</i> spp., e gaiolas para manutenção de saguis (<i>Callithrix</i> spp.) (à direita) localizado no CETAS de Lorena - São Paulo- 2010	84
Figura 19 - Imagem aérea da Cidade de São Vicente, Litoral de São Paulo. O ícone vermelho marcar a localização do CETAS UNIMONTE na cidade - São Paulo- 2010.....	85
Figura 20 - Imagem aérea do Parque Ecológico do Tietê (PET), em Guarulhos, São Paulo, onde o CRAS está localizado - São Paulo- 2010	86
Figura 21 - Imagem aérea da localização do Parque Zoológico Municipal de Bauru – São Paulo- 2011	86
Figura 22 - Imagem da entrada do Horto Florestal de Bauru (à esquerda) e vista aérea da localização do Horto dentro da cidade de Bauru (à direita) – São Paulo- 2011.....	87
Figura 23 - Localização da área de construção da PCH, entre os municípios de São Joaquim da Barra e Guará, nordeste do estado de São Paulo. A área diretamente afetada (ADA) foi dividida em 9 sub áreas, abrangendo os fragmentos de mata nas margens do rio Sapucaí-mirim. RA – Rodovia Anhanguera. – São Paulo – 2008-2010	88
Figura 24 - Área de construção da PCH Anhanguera, (a) área antes da construção do empreendimento. (b) área após a construção, evidenciando o alagamento na região. A seta branca representa a área obrigatória de reflorestamento.- São Paulo – 2008 - 2012.....	88
Figura 25 - Imagem aérea, à direita, da localização da Fazenda Sta. Cecília (seta branca) em Patrocínio Paulista, bioma Cerrado, no Nordeste do estado de São Paulo. À foto da esquerda mostra a entrada da mata e a casa da fazenda em proximidade a mata - São Paulo – 2012	89
Figura 26 - Localização geográfica da região de Abunã, Rondônia (B). À direita e ao centro, local de coleta dos primatas, região Amazônica preservada. No canto inferior, à direita, um exemplo de uma típica moradia da população local. Observar proximidade com a mata - Rondônia– 2010	90
Figura 27 - Localização geográfica da BR-319 (AM). Os pontos tracejados marca a área de coleta dos animais, ao longo da rodovia. As áreas coloridas representam as diversas unidades de conservação no qual a rodovia cruza - Amazonas – 2011	91
Figura 28 - Condição atual da BR-319 (à direita) e foto da vila de Igapó Açu, localizada próxima a área de coleta - Amazonas – 2011	91
Figura 29 - Armadilhas metálicas utilizadas para captura de PNT. (A) e (B) representam armadilhas tipo “Trampa”. (C) e (D) armadilhas tipo “Tomahawk” - São Paulo – 2009-2011	93
Figura 30 - À esquerda, colheita de sangue venoso, veia femoral. No centro, realização de esfregaço sanguíneo. À direita, punção de linfonodo em sagui (<i>Callithrix</i> spp.) proveniente do DEPAVE-CRAS - São Paulo – 2008-2010.....	96
Figura 31 - Colheita de material biológico a campo - Amazônia – 2011	96
Figura 32 - Fluxograma do material biológico colhidos e os respectivos exames realizados - São Paulo – 2008 – 2012.....	97

Figura 33 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na <i>nested</i> PCR que tem como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (<i>ssuRNA</i>) do <i>Plasmodium</i> spp - São Paulo – 2012	103
Figura 34 - Sequências de oligonucleotídeos usados na <i>nested</i> PCR que tem como alvo o gene mitocondrial citocromo b (<i>cytb</i>) do <i>Plasmodium</i> spp - São Paulo – 2012.....	104
Figura 35 - Formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> oriundas da cultura descrita acima, em fase estacionária de crescimento (Giemsa - 100X) – São Paulo – 2010.....	105
Figura 36 - PCR de amostras (1 a 16), selecionadas de sangue de primata. Gel de agarose 1,5%. Observar as bandas espúrias. CN = controle negativa, CP= controle positivo - São Paulo – 2011	111
Figura 37 - Parasitas visualizados por microscopia ótica na gota espessa corada com Giemsa: (A) trofozoíto maduro (seta) (x1000) de <i>P. simium</i> em <i>Callicebus nigrifrons</i> , São Paulo, 2012; (B) gametócito (x1000) de <i>P. brasilianum</i> em <i>Callicebus dubius</i> , Rondônia. São Paulo/Amazônia - 2009 – 2011	124
Figura 38 - Diluições seriadas dos soros controles (positivo: A+; e negativos: A1 ⁻ , A2 ⁻ , A3 ⁻) utilizando ambos os conjugados na diluição de 1:80.000 e antígeno de <i>P. falciparum</i> – São Paulo – 2008 – 2012	125
Figura 39 - Diluições seriadas dos soros controles (positivos: Pv+, 295/85 e 681/87 e negativos: A1 ⁻ , A2 ⁻ , A3 ⁻) utilizando ambos os conjugados na diluição de 1:40.000 e antígeno de <i>P. vivax</i> – São Paulo – 2008 – 2012	125
Figura 40 - Comparação entre o índice de reatividade (IR) encontrado no ELISA, usando como conjugado a proteína A e o anti-IgG de primata para <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> – São Paulo, 2008- 2012	127
Figura 41 - Imunofluorescência indireta (IFI) para <i>P. falciparum</i> : (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P178), <i>Saimiri [ustus] madeirae</i> , proveniente do Amazonas (BR-319) - Rondônia – 2010	129
Figura 42 - Imunofluorescência indireta (IFI) para <i>P. vivax</i> : (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P047), <i>Alouatta fusca</i> , proveniente do CETAS LORENA - São Paulo – 2011 – 2012.....	130
Figura 43 - Imunofluorescência indireta (IFI) para <i>P. malariae</i> : (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P047), <i>Alouatta fusca</i> , proveniente do CETAS LORENA, São Paulo – 2012	130
Figura 44 - Teste imunocromatográfico, SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.) evidenciando marcação positiva para Pv de soro de <i>Alouatta fusca</i> (P047), proveniente do CETAS LORENA - São Paulo – 2008-2012	131
Figura 45 - Exemplo dos resultados obtidos com a <i>nested</i> PCR utilizando como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA) ou 18S, para detecção de <i>Plasmodium</i> spp. Amostras clínicas negativas = 10B, 10C, 10D, 10F, 10G, 10H, 11A, 11B, 11C e 11D; Amostra clínica positiva = 10E; Controle positivo = 12E; Controle negativo = 12H. M = marcador de peso molecular (Fermentas 100pb). – São Paulo - 2012	131
Figura 46- Alinhamento das sequências nucleotídicas encontradas nas amostras positivas para <i>Plasmodium</i> na <i>nested</i> PCR de 18S – São Paulo - 2012	132

Figura 47 - <i>Nested</i> PCR utilizando como alvo o gene <i>cytb</i> de <i>Plasmodium</i> spp. Amostras clínicas negativas = 2 e 5. Controle negativo = 9. Controle positivo = 10. M = 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). - São Paulo – 2012.....	133
Figura 48 - Alinhamento das sequências nucleotídicas encontradas nas amostras positivas para <i>Plasmodium</i> para a <i>nested</i> PCR de <i>cytb</i> – São Paulo - 2012.....	134
Figura 49 - Localização dos primatas positivos (pontos vermelhos) no <i>Nested</i> PCR utilizando como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (<i>ssuRNA</i>) ou 18S para diagnóstico de <i>Plasmodium</i> spp. A) Estado de São Paulo, 1- São Joaquim da Barra; 2- Patrocínio Paulista, 3- Bauru, 4- DEPAVE-CRAS, 5- Lorena, 6- PET, 7- DEPAVE-Ibirapuera, 8-CETAS UNIMONTE; B) Rondônia, Abunã; C) Amazonas, BR-319. - São Paulo/Amazônia – 2008-2012.....	136
Figura 50 - Diluições seriadas dos soros controles, utilizando ambos os conjugados na diluição de 1:80.000 e, como antígeno, o extrato bruto de <i>L. (L.) amazonensis</i> – São Paulo – 2008 – 2012.....	137
Figura 51 - Distribuição dos índices de reatividade (IR) encontrados no ELISA, usando como conjugado a proteína-A e o anti-IgG de primata para <i>Leishmania</i> spp. – São Paulo – 2008-2012.....	139
Figura 52 - Imunofluorescência indireta (IFI) para <i>Leishmania</i> spp.: (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P170), <i>Lagothrix cana</i> de Rondônia - São Paulo – 2011.....	140
Figura 53 - Gradiente de temperatura de anelamento dos <i>primers</i> . Gel de agarose 1,5%. Seta branca indica a temperatura escolhida (59 °C). – São Paulo – 2011.....	142
Figura 54 - Comparação entre as condições iniciais de PCR (A) e após a otimização (B), utilizando os mesmos DNA proveniente de papa de leucócitos de primatas. Gel de agarose 1,5% - São Paulo – 2011.....	142
Figura 55 - Diluições seriadas do DNA provenientes de cultura (<i>L. (L.) chagasi</i>) para determinar sensibilidade analítica do teste: 0,1 parasitas (menos de 1 parasito) ou 3,5 fentogramas de DNA/ µl. – São Paulo- 2011.....	143
Figura 56 - Exemplo de amostras que foram positivas na PCR tendo como alvo o gene de β - <i>actina</i> – São Paulo – 2011.....	144
Figura 57 - PCR-RFLP de DNA proveniente de cultura, cepas padrões: 1. <i>L. (L.) chagasi</i> , 2. <i>L. (L.) amazonensis</i> , 3. <i>L. (V.) braziliensis</i> , 4. <i>L. (V.) shawi</i> , 5. <i>L. (V.) guyanensis</i> , 6. <i>L. (V.) naiffi</i> , 7. <i>L. (V.) lindenberg</i> , 8. <i>L. (V.) lainsoni</i> . Observar que a digestão da <i>L. (L.) chagasi</i> gera 2 fragmentos, sendo um em torno de 120 e outro 60 bp. A <i>L. (L.) amazonensis</i> e a <i>L. (V.) lainsoni</i> não sofrem digestão e todas as outras cepas do grupo Viannia, geram 3 fragmentos em torno de 120, 80 e 40 bp.- São Paulo- 2011.....	146
Figura 58 - Localização dos primatas positivos (pontos vermelhos) no PCR-RFLP utilizando como alvo o kDNA do cinetoplasto de <i>Leishmania</i> spp. A) Estado de São Paulo, 1- São Joaquim da Barra; 2- Patrocínio Paulista, 3- Bauru, 4- DEPAVE-CRAS, 5- Lorena, 6- PET, 7- DEPAVE-Ibirapuera, 8-CETAS UNIMONTE; B) Rondônia, Abunã; C) Amazonas, BR-319. - São Paulo/Amazônia – 2008 – 2012.....	148

Figura 59 - Tripanosoma spp. encontrados em esfregaços sanguíneos de primatas neotropicais (Giemsa, x1000): A) 169, <i>Callicebus dubius</i> , Rondônia; B) 108, <i>Callithrix Penicillata</i> , São Joaquim da Barra, São Paulo, C) P044, <i>Callicebus nigrifrons</i> , CETAS de Lorena, São Paulo. D) P165, <i>Callicebus brunneus</i> , Rondônia – São Paulo - 2008 – 2012.....	149
Figura 60 - TESA-blot, com antígenos de <i>T. cruzi</i> (cepa Y), testados em soros de primatas neotropicais. Amostras positivas: 1.P109, 2.P170, 3.P176, 4.P127 CN=controle negativo e CP=controle positivo. A seta preta indica a marcação positiva do teste (de 150 a 160-kDa) - São Paulo - 2011-2012.....	151

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies de Primatas Não Humanos com ocorrência natural de <i>Leishmania</i> – São Paulo – 2012	74
Quadro 2 - Relação dos locais e regiões de coleta de amostras biológicas de PNT, coordenadas geográficas e tipo de local a que pertencem – São Paulo/Amazônia – 2008-2012.....	82
Quadro 3 - Distribuição dos PNT amostrados de acordo com a espécie, gênero e faixa etária. M=macho, F=fêmea; A=adulto; J=juvenil e F=filhote – São Paulo/Amazônia - 2008-2011	116
Quadro 4 - Principais alterações clínicas encontradas nos PNT de cativeiro. Alguns animais tinham mais de uma alteração clínica – São Paulo - 2008-2012.....	117
Quadro 5 - Distribuição dos PNT amostrados <i>in situ</i> , de acordo com a espécie, gênero e faixa etária. M=macho, F=fêmea; A=adulto; J=juvenil e F=filhote – São Paulo – 2008- 2012.....	120
Quadro 6 - Principais alterações clínicas encontradas nos PNT de vida livre. Alguns animais apresentavam mais de uma alteração clínica – São Paulo – 2008 -2012	121
Quadro 7 - Relação de primatas neotropicais <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> positivos para <i>Trypanosoma</i> spp. em esfregaço sanguíneo São Paulo – 2008- 2012.....	150
Quadro 8 - Distribuição comparativa dos resultados das provas sorológicas (IFI e ELISA) e molecular (PCR-RFLP) para <i>Leishmania</i> e o TESA-blot para pesquisa de anticorpo IgG anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> , em primatas neotropicais – São Paulo - 2008 -2012	152

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos primatas neotropicais <i>ex situ</i> amostrados em função da classificação taxonômica, segundo Perelman, et al. (2011) - São Paulo - 2008-2012.....	115
Gráfico 2 - Distribuição dos primatas neotropicais <i>ex situ</i> amostrados em função da classificação taxonômica, segundo Perelman, et al. (2011) – São Paulo - 2008 - 2012.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os resultados ELISA utilizando-se como conjugado a proteína-A e o Anti-IgG- primata em relação aos animais <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> – São Paulo, 2008-2012	128
Tabela 2 - Matriz de similaridade entre as sequências nucleotídicas de um fragmento de ~240 pb que codifica SSUrRNA, obtidas para as amostras positivas – São Paulo – 2008-2012.....	133
Tabela 3 - Matriz de similaridade entre as sequências nucleotídicas de um fragmento de ~600 bp do gene <i>cytb</i> obtidas para as amostras positivas – São Paulo - 2012	135
Tabela 4 - Distribuição dos resultados do ELISA para <i>Leishmania</i> utilizando como conjugado a proteína-A e o anti-IgG- primata em relação aos animais <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> – São Paulo -2008 – 2012	139
Tabela 5 - Distribuição dos resultados positivos na PCR para os animais <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> , em relação a São Paulo e Amazônia: (A) amostras de papa de leucócito e (B) amostras de punção aspirativa de linfonodo – São Paulo - 2008 – 2012	145

TAXONOMIA*, NOMES POPULARES E LISTA DE ESPÉCIES

Cebidae

Sagui -híbrido	<i>Callithrix</i> spp.
Sagui-de-tufo-branco	<i>Callithrix jacchus</i>
Sagui-de-tufo-preto	<i>Callithrix penicillata</i>
Sauim	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>
Sagui-de-boca-branca	<i>Saguinus labiatus rufiventer</i>
Macaco-prego híbrido	<i>Cebus</i> spp.
Macaco-prego	<i>Cebus macrocephalus</i>
Macaco-prego	<i>Cebus apella</i>
Macaco-da-noite	<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>
Mico-de-Cheiro	<i>Saimiri boliviensis</i>
Macaco-da-noite	<i>Aotus infulatus</i>

Atelidae

Muriqui-do-Sul	<i>Brachyteles arachnoides</i>
Macaco-barrigudo	<i>Lagothrix poeppigii</i>
Macaco-barrigudo	<i>Lagothrix cana</i>
Macaco-aranha-de-cara-preta	<i>Ateles chamek</i>
Macaco-aranha	<i>Ateles paniscus</i>
Bugio-preto	<i>Alouatta caraya</i>
Bugio	<i>Alouatta fusca</i>
Bugio-ruivo	<i>Alouatta clamitans</i>
Guariba-de-mãos-ruivas	<i>Alouatta belzebul</i>

Pitheciidae

Macaco-parauacu	<i>Pithecia</i> sp.
Guigó	<i>Callicebus dubius</i>
Guigó	<i>Callicebus caligatus</i>
Guigó	<i>Callicebus nigrifrons</i>
Guigó	<i>Callicebus brunneus</i>
Guigó	<i>Callicebus personatus</i>
Guigó híbrido	<i>Callicebus</i> spp.

* Classificação taxonômica de acordo com Perelman, et al., 2011.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

CDC	Center for Disease Control and Prevention
CETAS	Centros de Triagem de Animais Selvagens
DIEs	Doenças Infecciosas Emergentes
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
IFI	Imunofluorescência Indireta
IHQ	Reação de Imunoistoquímica
IR	Índice de Reatividade
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
MS	Ministério da Saúde
OIE	World Organisation for Animal Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pm</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
PNH	Primatas não humanos
PNM	Primata do Novo Mundo
PNT	Primatas neotropicais
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PVM	Primata do velho Mundo
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TMAC	Cloreto de Tetrametil Amonio
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivos gerais.....	32
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	34
3.1	Primatas neotropicais - PNT	34
3.1.1	Classificação, aspectos biológicos e conservação.....	34
3.2	UMA SAÚDE - doença, meio ambiente, animais selvagens, animais domésticos e o homem.....	37
3.3	Tráfico de animais, ações antrópicas e o impacto da movimentação dos PNH	38
3.4	Agentes patogênicos & enfermidades	40
3.4.1	<i>Plasmodium</i> spp. – Malária.....	40
3.4.1.1	<i>Agente etiológico.....</i>	41
3.4.1.2	<i>Ciclo biológico.....</i>	42
3.4.1.3	<i>Distribuição geográfica.....</i>	44
3.4.1.4	<i>Epidemiologia.....</i>	47
3.4.1.5	<i>Malária Simiana.....</i>	48
3.4.1.6	<i>Diagnóstico.....</i>	51
3.4.2	<i>Leishmania</i> spp. - <i>Leishmanioses.....</i>	53

3.4.2.1	<i>Agente etiológico – Leishmania</i>	55
3.4.2.2	<i>Ciclo biológico</i>	56
3.4.3	Leishmaniose tegumentar americana (LTA)	59
3.4.3.1	<i>Agente e aspectos clínicos</i>	59
3.4.3.2	<i>Distribuição geográfica</i>	60
3.4.3.3	<i>Epidemiologia</i>	61
3.4.4	Leishmaniose visceral americana (LVA)	64
3.4.4.1	<i>Agente e aspectos clínicos</i>	64
3.4.4.2	<i>Distribuição geográfica</i>	65
3.4.4.3	<i>Epidemiologia</i>	66
3.4.4.4	<i>Leishmania spp. em primatas não humanos</i>	70
3.4.4.5	<i>Diagnóstico</i>	75
4	MATERIAL E METODOS	82
4.1	Colheita de amostras	82
4.1.1	Animais e locais de colheita	82
4.1.1.1	<i>Locais de colheita - Ex situ</i>	83
4.1.1.2	<i>Locais de colheita - In situ</i>	87
4.2	Captura	92
4.3	Contenção química	93
4.4	Exame clínico	94

4.5	Material biológico.....	94
4.6	Processamento e análises laboratoriais.....	97
4.6.1	Pesquisa de <i>Plasmodium</i> spp.....	97
4.6.1.1	<i>Diagnóstico parasitológico pela gota espessa.....</i>	97
4.6.1.2	<i>Ensaio Imuno Enzimático – EIE / ELISA.....</i>	98
4.6.1.3	<i>Imunofluorescência indireta (IFI).....</i>	100
4.6.1.4	<i>Teste imunocromatográfico.....</i>	101
4.6.1.5	<i>Diagnóstico molecular.....</i>	101
4.6.2	Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp.....	104
4.6.2.1	<i>Ensaio Imuno Enzimático – EIE / ELISA.....</i>	105
4.6.2.2	<i>Imunofluorescência indireta (IFI).....</i>	107
4.6.2.3	<i>Diagnóstico imunoistoquímico.....</i>	108
4.6.2.4	<i>Diagnóstico molecular.....</i>	109
4.6.2.5	<i>Pesquisa de <i>Trypanosoma</i> spp.....</i>	113
5	RESULTADOS.....	115
5.1	Animais & condição clínica no momento da colheita.....	115
5.1.1	<i>Ex situ.....</i>	115
5.1.2	<i>In situ.....</i>	119
5.2	Pesquisa de <i>Plasmodium</i> spp.....	123
5.2.1	Diagnóstico parasitológico pela gota espessa.....	123
5.2.2	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> spp.....	124
5.2.2.1	<i>Ensaio Imuno Enzimático EIE / ELISA.....</i>	124
5.2.2.2	<i>Imunofluorescência indireta (IFI).....</i>	128
5.2.2.3	<i>Teste imunocromatográfico.....</i>	

5.2.3	Diagnóstico molecular.....	131
5.2.3.1	Reação da cadeia da polimerase (nested PCR).....	131
5.3	Pesquisa de <i>leishmania</i> spp.	137
5.3.1	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp.....	137
5.3.1.1	Ensaio Imuno Enzimático EIE / ELISA.....	137
5.3.1.2	Imunofluorescência indireta (IFI).....	140
5.4	Diagnóstico histopatológico	141
5.4.1	Reação de imunistoquímica (IHQ).....	141
5.5	Diagnóstico molecular	141
5.5.1	Extração de DNA.....	141
5.5.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	141
5.5.3	Digestão do produto de PCR (RFLP).....	146
5.6	Pesquisa de <i>Trypanosoma</i> spp.	149
6	DISCUSSÃO	153
6.1	Animais & condição clínica no momento da colheita	153
6.2	Pesquisa de <i>Plasmodium</i> spp.	155
6.2.1	<i>Ex situ</i>	156
6.2.2	<i>In situ</i>	160
6.3	Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp.	163
6.3.1	<i>Ex situ</i>	163
6.3.2	<i>In situ</i>	169
6.4	Discussão geral	175
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	182
8	REFERÊNCIAS	185

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, algumas alterações nas populações silvestres atribuídas a causas antropogênicas têm sido relacionadas às doenças infecciosas emergentes (DIEs). As DIEs existem há tanto tempo quanto os seus respectivos hospedeiros, mas acredita-se que as alterações recentes no equilíbrio entre o agente infeccioso e correspondente hospedeiro possam ter conduzido a consequências catastróficas repentinas, principalmente quando as doenças são introduzidas em ecossistemas naturais (SCHOEGEL; DASZAK; NAVA, 2005).

Neste sentido, diversos estudos sobre o papel de mamíferos silvestres como reservatórios de zoonoses têm sido realizados no Brasil. Entretanto, a diversidade da fauna de mamíferos brasileiros ainda não é completamente conhecida, e a emergência e re-emergência de zoonoses é um problema atual de saúde pública (BRASIL, 2012).

Desta forma, a pesquisa de agentes infecciosos zoonóticos, como o *Plasmodium* spp., causador da malária, e a *Leishmania* spp. causador das leishmanioses, nos animais domésticos, silvestres e no homem, bem como a inter-relação entre os mesmos e as mudanças no ambientes, são de grande importância para a compreensão e controle destas doenças humanas e para a conservação da vida silvestre.

Os primatas neotropicais (PNT), desempenham importante papel na manutenção do ecossistema natural, como por exemplo, na dispersão de sementes (CHAPMAN; ONDERDONK, 1998) e por sua vez mantêm relação com diversos patógenos, podendo ser esta uma relação benéfica ou deletéria. As crescentes ações antrópicas (construção de Usina Hidroelétrica e Rodovia, dentre outras ações) afetam o meio ambiente, destruindo os habitats, podendo ocasionar graves mudanças ambientais como a fragmentação do ambiente florestal, perda de biodiversidade e mudanças climáticas. Estas alterações no ecossistema podem acarretar mudanças no ciclo epidemiológico das doenças, ocasionando danos à saúde pública e animal (HUNTER; REY; SCOTT; 1983; LERER; SCUDDER, 1999).

Sendo assim, os PNT podem ser afetados por estas mudanças no ecossistema, seja pelo contato mais próximo com animais domésticos ou mesmo os silvestres, promovendo a transferência de agentes patogênicos (“Spill-over”), ou até mesmo pela perda de recurso alimentar (CLEAVELAND et al., 2000; CLEAVELAND et al., 2002).

Desta forma, espera-se que os resultados do presente trabalho subsidiem abordagens sanitárias em relação às populações de PNT expostas às crescentes ações antrópicas, contribuindo, desta forma, tanto para o incremento da saúde pública quanto para a conservação destes fascinantes animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando a relevância das Leishmanioses e da Malária, como enfermidades zoonóticas; a importância dos primatas do Novo Mundo na ecologia dos sistemas neotropicais, incluindo os ciclos naturais das doenças infecciosas; as condições de manutenção destes animais em cativeiro; as ações antrópicas que geram importantes mudanças nos ecossistemas; e as práticas de soltura e reintrodução com os consequentes desdobramentos relacionados à disseminação de doenças, os **Objetivos Gerais** do presente trabalho foram:

1. Determinar a ocorrência de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em diferentes populações de primatas neotropicais *in situ* (Mata Atlântica e Regiões Amazônicas), em áreas que foram e/ou serão impactadas por ações antrópicas, e *ex situ* (cativeiros selecionados no Estado de São Paulo);
2. Discutir o papel desempenhado por este Taxa nos ciclos naturais destas enfermidades;
3. Fornecer subsídios para práticas nos campos da saúde pública e animal envolvendo estes patógenos;
4. Contribuir para o rol de conhecimento disponível sobre a condição sanitária deste Taxa.

2.2 Objetivos específicos

Para tanto, os **objetivos específicos** do trabalho foram:

1. Pesquisar a ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em diferentes populações de PNT *in situ* e *ex situ*, nas regiões acima citadas, valendo-se para tanto de exames histopatológico, imunoistoquímico, sorológicos (ELISA e IFI) e molecular (PCR-RFLP);
2. Determinar as espécies de *Leishmania* spp. isoladas através de técnica molecular (PCR-RFLP), e discutir a importância das mesmas nas saúdes pública e animal;
3. Investigar a ocorrência de infecção por *Plasmodium* spp. em diferentes populações de PNT *in situ* e *ex situ*, nas regiões acima citadas, valendo-se para tanto de exames de observação direta (análise de gota espessa), sorológicos (ELISA, IFI e teste imunocromatográfico) e moleculares (*nested* PCR);
4. Efetuar a caracterização molecular dos *Plasmodium* spp. isolados e discutir a importância dos mesmos nas saúdes pública e animal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Primatas neotropicais - PNT

3.1.1 Classificação, aspectos biológicos e conservação

O Brasil é o quinto maior país do mundo em área, e o primeiro em biodiversidade, com cerca de 14% da biota mundial e a maior diversidade de mamíferos, com mais de 530 espécies descritas. Apesar dos mamíferos serem o grupo de organismos mais bem conhecido, pouquíssimos locais foram adequadamente inventariados. A região da Amazônia é, provavelmente, a mais diversa do planeta em termos de mamíferos e outros vertebrados. O *hotspot* da Mata Atlântica é o segundo em termos de diversidade de mamíferos, porém em relação a sua área, acredita-se possuir um número maior de espécies (COSTA, 2005; REIS, 2011).

Dentre os mamíferos, as quatro Ordens mais diversificadas e com expectativas de aumento do número de espécies são Rodentia, Chiroptera, Didelphimorphia e Primates (REIS, 2011).

De acordo com a IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), no Brasil existem 18 gêneros e 131 espécies/subespécies de PNT, sendo algumas destas endêmicas de algumas regiões e outras mais generalistas estando presentes em diferentes biomas (IUCN, 2008)

Os primatas são mamíferos placentários e bem adaptados ao ambiente arborícola, devido adaptações evolutivas sofridas por esta Ordem. Possuem diferentes características que são utilizadas, em conjunto, para classificá-los (AURICCHIO, 1995). Desempenham papel importante na preservação das matas devido a grande dispersão de sementes que fazem (CHAPMAN; ONDERDONK, 1998).

A classificação taxonômica dos primatas divide-os em duas subordens, Prosimii (Prossímios) e Antropoidea (Antropóides e Símios). Os primeiros são divididos em lemuriformes, lorosiformes e tarsiiformes (AURRICHIO, 1995; ROWE, 1996). A subordem Antropoidea é dividida em primatas do Velho Mundo (PVM) (Catarrhini) e primatas do Novo Mundo (PNM) (Platyrrhini). Os primatas neotropicais fazem parte dos animais do Novo Mundo, porém, ainda há divergências quanto a classificação taxonômica dos mesmos.

De acordo com Ryland et al. (2000), pertencem aos Platyrrhini as famílias Aotidae (macacos-da-noite), Callitrichidae (micos e saguis), Cebidae (macacos-prego e mico-de-cheiro), Athelidae (bugios, macacos-barrigudos, muriquis e macacos-aranha) e Pitheciidae (parauacus, sauás e uacaris). Entretanto, Perelman et al. (2011), sugerem, através de estudo baseado em ferramentas moleculares, que os Platyrrhini sejam compostos pelas famílias Cebidae (*Mico*, *Cebuella*, *Callithrix*, *Callimico*, *Leontopithecus*, *Saguinus*, *Aotus*, *Saimiri*, *Cebus*), Atelidae (*Lagothrix*, *Brachyteles*, *Ateles*, *Alouatta*) e Pitheciidae (*Cacajao*, *Chiropotes*, *Pithecia*, *Callicebus*). Neste trabalho optou-se por utilizar esta classificação taxonômica.

Conseqüentemente a esta grande variedade de famílias e espécies, este grande grupo possui uma extensa diversidade de características biológicas, ecológicas e comportamentais, variando em tamanho, modo de vida, dieta, uso do habitat e organização social (REIS, 2011) e, conseqüentemente, variando na adaptação às diversas mudanças ambientais.

Os primatas do Novo Mundo (PNM) são especialmente vulneráveis a fragmentação do habitat devido ao seu grau de especialização arbórea. Até mesmo as grandes espécies são incapazes de atravessar grandes distâncias que separam os principais fragmentos florestais. Isto pode acarretar em consanguinidade e surgimento de doenças (FERRARI, 1995).

Os primatas são um dos grupos de mamíferos mais ameaçados, com 26 espécies listadas. Isso significa que 26,8% do total de primatas está em perigo de desaparecer do Brasil (REIS, 2011). As espécies endêmicas geralmente sofrem maior pressão quando há destruição do habitat e fragmentação, podendo chegar a extinção mais rapidamente que as espécies não endêmicas. Por outro lado, algumas espécies de PNT adaptam-se tão bem em diferentes ecossistemas que são

consideradas, em algumas regiões, como espécies exóticas invasoras, ameaçando outras espécies de primatas e a biodiversidade local, como no caso, por exemplo, do *Callithrix jacchus* no Estado de São Paulo (COSTA, 2005; SILVA, 2009).

Infelizmente, as populações de PNT vem sofrendo grave declínio populacional devido a alguns fatores que variam em ordem de importância dependendo da região. Na Mata Atlântica, a principal ameaça é a perda do habitat e fragmentação. Entretanto, na Amazônia a caça de subsistência ainda representa a maior ameaça (COSTA, 2005). Porém, outros fatores são importantes e ainda estão presentes, como por exemplo, o tráfico de animais (MITTERMEIER, 1986; MAST, 1996).

Neste contexto, as doenças são um dos fatores que pode favorecer o declínio populacional de primatas, principalmente nestes que possuem reduzido número de indivíduos (WOODROFFE, 1999; COSTA, 2005).

Apesar de muitos estudos, pouco ainda se sabe sobre a diversidade de patógenos presentes nas populações de primatas *in situ*. Muitos primatas são considerados reservatórios para uma extensa variedade de doenças que acometem os homens, como as parasitárias, virais, bacterianas, etc. (COX-SINGH, 2008; FRIEND, 2006).

Neste sentido, a compreensão da relação patógeno-hospedeiro e as possíveis alterações desta dinâmica em relação as mudanças ecológicas, ambientais e as socioeconômicas se fazem de grande importância não somente para a conservação dos primatas neotropicais como também para a saúde pública e animal.

Diversas doenças e patógenos vem afetando a saúde pública mundial, como as Doenças Infecciosas Emergentes (DIEs), impactando a economia mundial e local. A maioria das DIEs (60,3%) é causada por patógenos zoonóticos e 71,8% destes eventos zoonóticos são causados por patógenos que se originaram de animais selvagens, como por exemplo, a SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), o *Nipah* vírus e até mesmo o HIV, no qual o surgimento está associado a caça de subsistência de Primatas Não-Humanos (PNH) (FRIEND, 2006; JONES, 2008).

Devido a todos estes aspectos, a pesquisa da ocorrência de agentes zoonóticos em primatas neotropicais e a compressão do papel que estes

desempenham no ciclo epidemiológico das doenças reveste-se de grande importância para as saúdes animal e humana e para a conservação dos mesmos.

3.2 Uma Saúde – doença, meio ambiente, animais selvagens, animais domésticos e o homem

A destruição crescente do hábitat natural por ação antrópica promove o aumento no número de espécies ameaçadas de extinção. A reação em cadeia originada desta destruição ameaça não somente o hábitat, mas também a saúde de todas as espécies da fauna e flora silvestres, bem como a do homem e a de animais domésticos (SCHOEGEL; DASZAK; NAVA, 2005).

Segundo Cleaveland et al. (2002) , por exemplo, em áreas fragmentadas há o aumento da proximidade dos animais silvestres com as comunidades humanas e com os animais domésticos, o que aumenta o risco do surgimento de zoonoses e epizootias, devido ao efetivo contato físico, seja direto ou indireto, via vetor, entre animais (selvagens e/ou domésticos) e o homem.

Neste contexto, o termo “Uma Saúde” significa a compreensão da inter-relação entre os patógenos, o meio ambiente, os animais selvagens, os animais domésticos e o homem, com o intuito de garantir a saúde do ecossistema como um todo.

Sendo assim, a compreensão de que os animais selvagens podem ser fontes de infecção tanto para a população humana, quanto para as outras populações de animais selvagens e para os animais domésticos, é de extrema importância para se garantir a saúde do ecossistema e, conseqüentemente, a saúde animal e humana. Estima-se que existam pelo menos 144 doenças humanas derivadas de patógenos dos animais selvagens, como por exemplo, a raiva, leptospirose, tuberculose, vírus do oeste do Nilo, influenza aviária e as leishmanioses (OIE, 2010).

Além disso, sabe-se que as doenças impactam as populações de animais selvagens podendo ser um dos fatores, somados a outros como perda de ambiente e consanguinidade, que contribui para a extinção de espécies.

Neste sentido a compreensão exata da relação entre o homem, os animais domésticos, animais selvagens e as mudanças ambientais é que irão garantir a saúde ecológica e a saúde humana. Programas efetivos de Saúde Pública devem incluir estudos para que se tenha a compreensão dos fatores epidemiológicos dos patógenos zoonóticos dos animais selvagens, assim como dos animais domésticos e dos seres humanos e suas inter-relações (OIE, 2010).

3.3 Tráfico de animais, ações antrópicas e o impacto da movimentação dos PNH

Recentemente, pesquisadores tem se atentado para um relevante tema que é a avaliação dos efeitos causados pelas ações antrópicas, como a construção de usinas hidrelétricas e rodovias, na dinâmica e epidemiologia das doenças, tais como a malária e as leishmanioses.

Algumas hipóteses tem sido comprovadas no sentido destas ações aumentarem a transmissão das doenças, ou mudarem os fatores epidemiológicos, causando efeitos deletérios à saúde animal e humana, principalmente nas doenças transmitidas por vetores (HUNTER et al., 1983; ALEMAYEHU et al., 1998; BICKEL et al., 2003; ELLIS; WILCOX, 2009).

As mudanças ambientais diretas no habitat, como as ações antrópicas, ou até mesmo as indiretas, como as mudanças climáticas, geralmente modificam os padrões de transmissão das doenças transmitidas por vetores. Acredita-se que as mudanças climáticas, por exemplo, possam modificar a distribuição espacial e temporal das Leishmanioses, seja diretamente pelo efeito da temperatura no desenvolvimento do parasita, ou indiretamente pelo da temperatura e outras variáveis ambientais no alcance e abundância dos flebotomíneos vetores, ou até

mesmo pelas mudanças socioeconômicas que por ventura possam decorrer dos empreendimentos realizados (READY, 2008).

Além do impacto ambiental resultante destas situações, há uma crescente preocupação sobre a possibilidade de disseminação de patógenos presentes nos animais selvagens provenientes dos programas de resgate destes empreendimentos.

A fauna originária destas diferentes regiões do país acaba sendo destinadas para diferentes locais. Muitas vezes os animais são encaminhados para cativeiros em outros estados (Zoológicos ou CETAS ou Criadouros), ou soltos (introduzidos ou translocados) em áreas onde ainda sobrevivem populações selvagens. Sendo assim, alguns pesquisadores acreditam que este deslocamento poderia acarretar na dispersão de patógenos, inclusive causadores de zoonoses, para um local onde antes estes não ocorriam (WOODFORD; ROSSITER, 1993; CUNNINGHAM, 1996; DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; THOISY et al., 2001).

A mesma hipótese de dispersão de patógenos ocorre com os animais provenientes do tráfico. Segundo Karesh et al. (2005), o tráfico internacional de animais selvagens pode favorecer o mecanismo de transmissão de doenças, que não somente pode afetar a população humana, gerando epidemias, mas também pode causar danos aos animais domésticos e às populações de animais selvagens e a saúde do ecossistema.

No Brasil, o tráfico de animais selvagens é considerado a segunda maior ameaça à fauna silvestre, e no mundo este tipo de tráfico só perde em recursos para o de armas e drogas. O tráfico de animais atende diferentes finalidades: coleções particulares, zoológicos, pesquisas científicas (biopirataria), vendas em *pet shop*, produtos da fauna para adornos e artesanato. Anualmente, no Brasil, estima-se que 4 milhões de animais sejam retirados da natureza. Dentre os mamíferos, os primatas estão no topo da lista dos mais traficados, sendo que os PNT representam 20% dos primatas traficados no mundo e 10% destes pertencem a família Cebidae e os outros 10% à família Callitrichidae (RENCTAS, 2001).

Além disso, os animais e em especial os PNT mantidos em Centro de Estudos e Manejo de Animais Selvagens - CETAS são, na sua grande maioria,

animais provenientes do tráfico de animais silvestres, ou seja, da apreensão realizada pelos Órgãos do Sistema Nacional de Meio Ambiente (SISNAMA; IBAMA, 2011). Devido à falta de local apropriado, estes indivíduos acabam permanecendo por muito tempo nestes centros e, nestas circunstâncias, acabam tendo contato relativamente próximo com humanos e outros animais, seja diretamente, seja indiretamente via vetores.

Desta forma, é de grande valia e importância estudos que visem a pesquisa de agentes patogênicos nas populações que serão manejadas, tanto cativas quanto presentes em vida livre.

3.4 Agentes patogênicos & enfermidades

3.4.1 *Plasmodium* spp. – Malária

Dentre os diversos protozoários de interesse em saúde pública, destaca-se o *Plasmodium* spp. causador da malária, doença zoonótica de grande impacto econômico e de elevada importância para saúde humana.

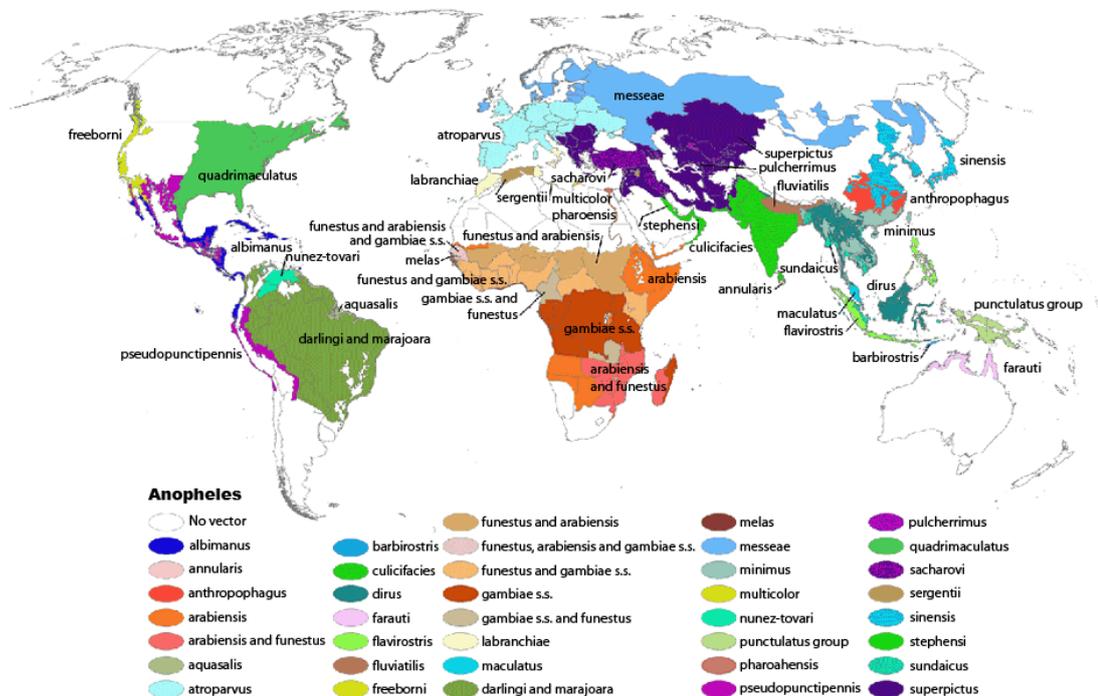
A malária também é conhecida como impaludismo, febre palustre, maleita e sezão. Está presente em 106 países e estima-se que 3.3 bilhões de pessoas estão expostas à doença, sendo o maior risco na região africana subsaariana (BRASIL, 2005; WHO, 2011). Em áreas não endêmicas, há relatos de casos importados, sendo portanto tida como uma doença de risco elevado para viajantes e migrantes (BRASIL, 2005).

No Brasil, o maior número de casos é registrado na região Amazônica, cujas condições ambientais e socioculturais favorecem a expansão de sua transmissão. Nesta área, destacam-se os estados do Pará, Rondônia e Amazonas, com a ocorrência de mais de 50% da totalidade dos casos (BRASIL, 2005).

3.4.1.1 Agente etiológico

A malária é uma infecção causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, Classe Sporozoa, transmitida na natureza pela picada de mosquitos vetores, fêmeas, infectados do gênero *Anopheles*, ou podem ainda serem transmitidos, por transfusões sanguíneas ou compartilhamento de seringas contaminadas (BRUCE-CHWATT, 1985; BRASIL, 2005; WHO, 2011).

Destacam-se no Brasil cerca de cinco espécies de *Anopheles* com maior importância na transmissão do parasita: *Anopheles (N) darlingi*, *A. (N) aquasalis*, *A. (N) albitarsis*, *A. (K) cruzi* e *A. (K) bellator* (BRASIL, 2005). Entretanto, na figura 1 aponta como os principais vetores o *A. (N) darlingi* e o *A. (N) albitarsis*. Geralmente esses insetos evoluem em águas limpas e sombreadas de rios, córregos, igarapés, lagoas, represas, açudes, valetas de irrigação, alagados e pântanos. Entretanto, a subespécie *Kerteszia* desenvolve-se em águas acumuladas pelas bromeliáceas, conhecidas no Sul pelo nome de gravatás (BRASIL, 2005).



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2011a).

Figura 1 – Distribuição global dos vetores dominantes ou potencialmente importantes para a transmissão da Malária (CDC, 2011a) – São Paulo - 2012

Cinco espécies de *Plasmodium* podem causar a doença humana (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*), sendo o *P. falciparum* o causador de maior mortalidade, com maior ocorrência na África. Já o *P. vivax*, é considerado menos patogênico, porém ocorre de forma muito mais frequente e apresenta uma distribuição geográfica maior (COX-SINGH et al., 2008; WHO, 2011).

Em relação aos aspectos clínicos observados em humanos, indivíduos que são expostos à malária, de forma contínua, podem apresentar infecções assintomáticas. Entretanto, os pacientes não-imunes apresentam febre intermitente, calafrios e sudorese intensa. As febres são classificadas em febre terçã (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*), que ocorre a cada 48 horas, e quartã (*P. malariae*), a cada 72 horas. Anemia e esplenomegalia são sinais comumente encontrados, entretanto, outros sinais clínicos como mialgia, dor lombar, cefaleia, náuseas e vômitos podem estar presentes (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003).

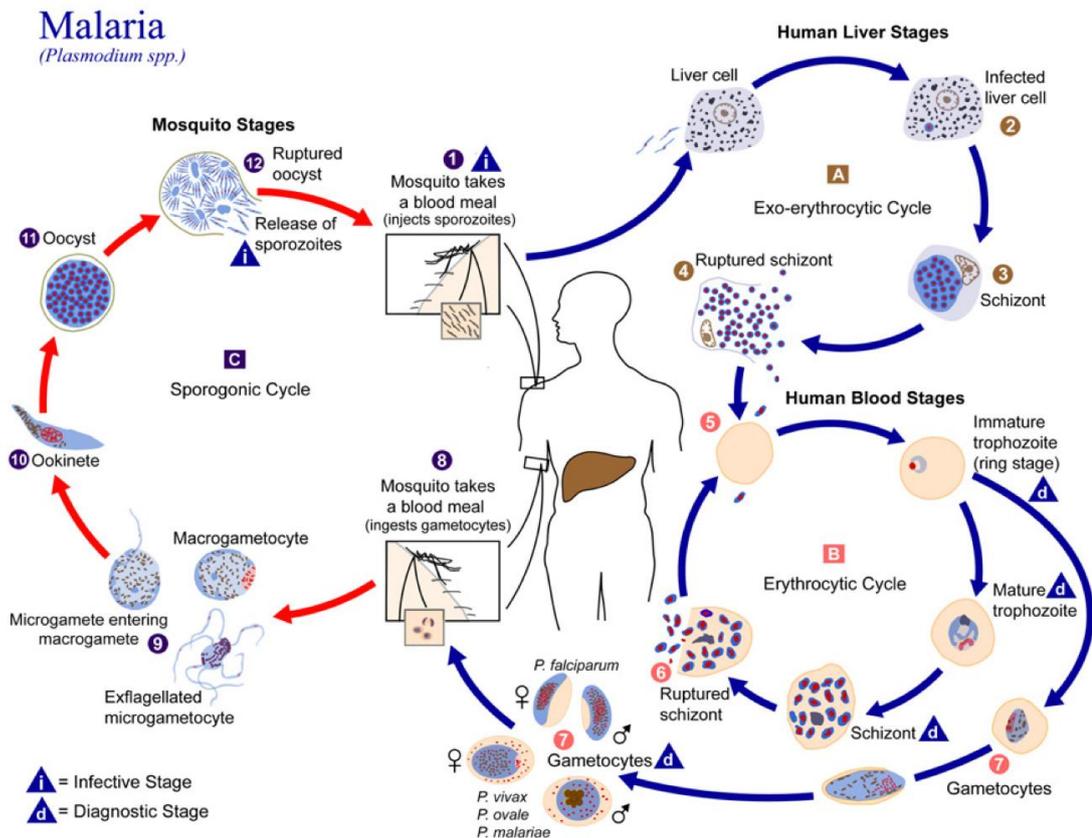
3.4.1.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico do *Plasmodium* se divide em 2 fases (Figura 2), descritas abaixo (FERREIRA; FORONDA; SCHUMAKER, 2003; BRASIL 2005):

Ciclo Sexuado: este ciclo ocorre no mosquito vetor do gênero *Anopheles* (esporogônia). O mosquito ao picar o vertebrado infectado adquire os gametócitos presentes na circulação sanguínea destes. Estas transformam-se em gametas que irão se reproduzir, no estômago do vetor, e formar o zigoto. Este se transforma em forma móvel (ocineto) que migra até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto. Dentro deste se desenvolverão os esporozoítos que serão liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde serão transferidos para o sangue do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo.

Ciclo Assexuado: O segundo ciclo ou o chamado ciclo assexuado (esquizogonia) se dá no hospedeiro vertebrado. Quando o anofelino infectado pica o vertebrado, acaba inoculando os esporozoítos infectantes. Estes circulam na corrente sanguínea por alguns minutos e chegam ao fígado,

penetrando nas células do mesmo. Neste órgão ocorre a esquizogonia tecidual no qual os esporozoítos se dividem em merozoítos e tem duração de 6 dias para o *P. falciparum*, 8 dias para a *P. vivax* e 12 a 15 dias para a *P. malariae*. Nesta fase, para a espécie *P. vivax* e *P. ovale*, pode haver um desenvolvimento muito lento e conseqüentemente a formação dos hipnozoítas (formas latentes). Ao final deste ciclo, rompem as células hepáticas, atingindo novamente a circulação sanguínea, no qual invadem as hemácias. Durante este período (esquizogonia sanguínea), que varia de 48 a 72 horas, o parasita se desenvolve no interior das hemácias até rompê-las e liberar novos merozoítos. Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos) que amadurecem e tornam-se infectantes aos mosquitos. Quando um novo vetor anofelino pica o vertebrado, adquire os gametócitos fechando o ciclo do parasita.

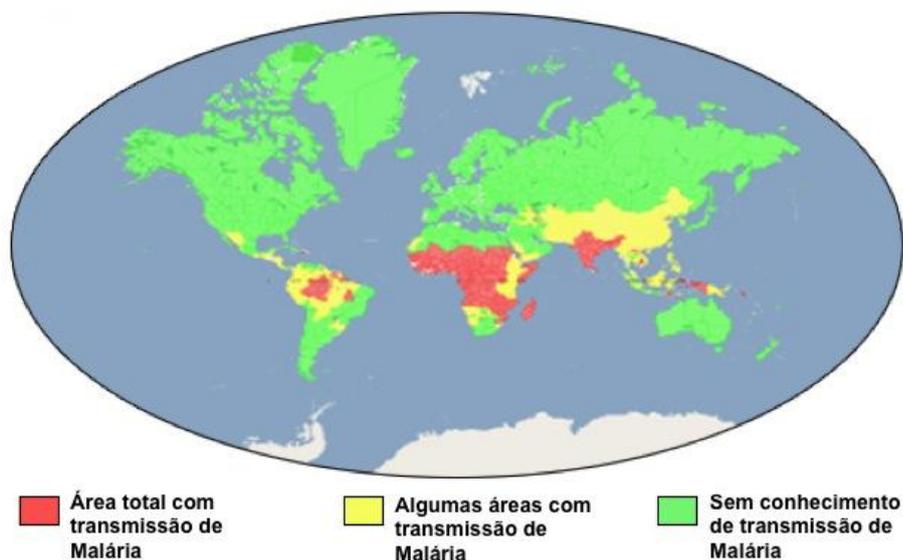


Fonte: Ilustração de Centers for Diseases Control and Prevention (CDC, 2011b)

Figura 2 - Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. evidenciando a fase no anofelino vetor e no humano (CDC, 2011b) – São Paulo - 2012

3.4.1.3 Distribuição geográfica

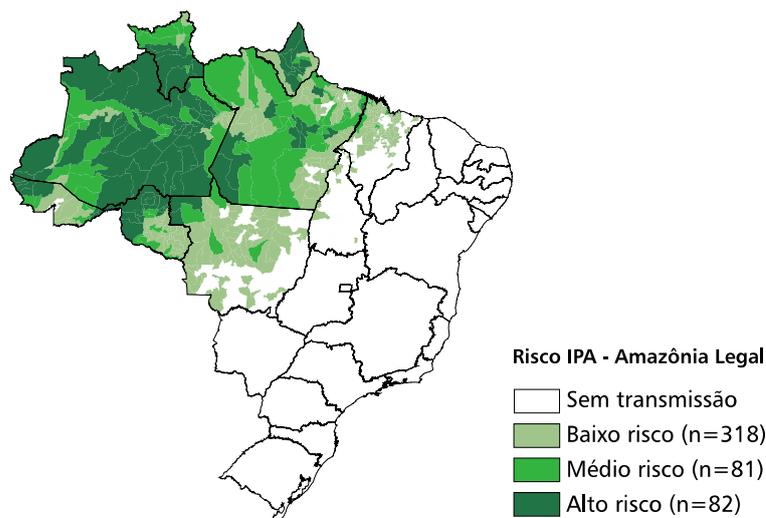
A malária ocorre em muitos países do mundo, mas frequentemente é encontrada em países em desenvolvimento, em áreas tropicais e subtropicais (Figura 3). Os grupos mais vulneráveis à doença são crianças, que não possuem a imunidade para malária ainda desenvolvida e mulheres grávidas, no qual a imunidade está diminuída. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 3.3 bilhões de pessoas habitam áreas de risco de transmissão da doença, em 109 países e territórios (CDC, 2011c).



Fonte: Ilustração de *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC, 2011c)

Figura 3 - Distribuição da malária no mundo (CDC, 2011c) – São Paulo - 2012

No Brasil, aproximadamente 99% dos casos de malária se concentram na Região Amazônica, área considerada como endêmica no país para a doença. A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, mas há registro da doença também em áreas urbanas (Figura 4). Na região Extra-Amazônica, 92% dos casos registrados são importados dos estados pertencentes à área endêmica e da África (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).



Fonte: Siven-Malária/SVS/MS

Figura 4 - Mapa de risco da malária, por município de infecção. Amazônia legal, 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) – São Paulo - 2012

Casos autóctones esporádicos ocorrem em áreas focais restritas desta região, destacando-se os municípios localizados às margens de lagos como, por exemplo, os da usina hidrelétrica de Itaipu, bem como áreas remanescentes de Mata Atlântica nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia; a Região Centro-Oeste, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul; e a Região Nordeste, nos estados do Piauí, Pernambuco e Ceará (BRASIL, 2005) (Figura 5).

Na década de 80, o país teve um aumento no número de casos da doença, e isto também se refletiu no estado de São Paulo, onde os índices de ocorrência de casos importados e autóctones elevaram-se significativamente. O registro anual médio foi de 40 casos de autoctonia entre 1983 e 1993. Já em 2006, 42% dos casos notificados na região extra-amazônica ocorreram em São Paulo (COUTO et al., 2010).

Pouco ainda se sabe sobre os fatos envolvidos na cadeia de transmissão da malária na região de Mata Atlântica (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Contudo, acredita-se que a autoctonia da malária em São Paulo está relacionada a duas

regiões geográficas distintas. A primeira é a região de Mata Atlântica, como a da Serra do Mar, onde anofelinos (subgênero *Kerteszia*) podem ser encontrados em alta densidade e tem as bromélias como um ambientes para reprodução. Nestes regiões, estes casos também são chamados de “malária das bromélias”. Nestas regiões, acredita-se ser os primatas hospedeiros reservatórios naturais, aliando-se este fato a presença de algumas espécies de vetores anofelinos que usam os bromélias para se reproduzirem (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A outra região é o oeste do estado, próximo às bacias hidrográficas dos rios Paraná, Paranapanema e São José dos Dourados. Nestas regiões, além de haver a presença de vetores (subgênero *Nyssorhynchus*), há a associação com o fluxo de portadores da doença provenientes da região Amazônica. Na maioria dos casos a espécie encontrada é o *P. vivax*, com baixas parasitemias e infecções assintomáticas e oligossintomáticas (COUTO et al., 2010).

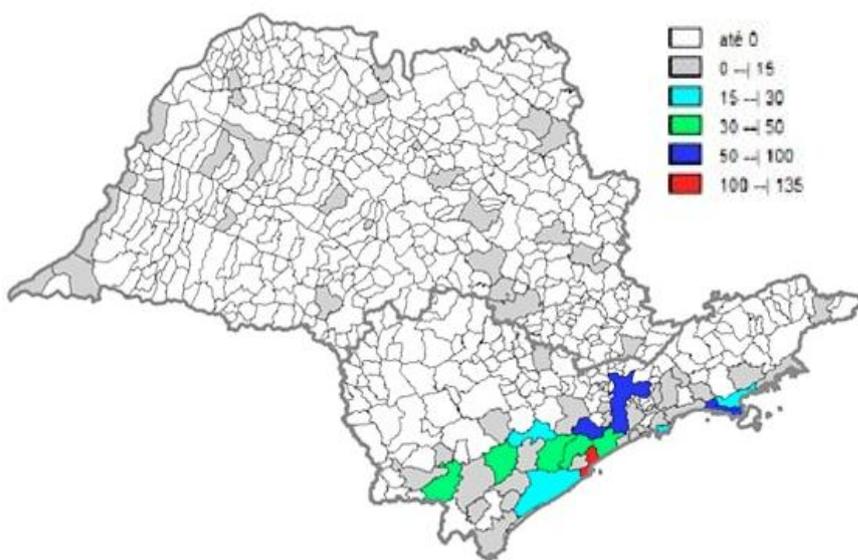


Figura 5 - Número de casos de malária autóctone, estado de São Paulo, 1980 a 2007 (COUTO et al., 2010) – São Paulo - 2012

No Brasil, 83,7% dos casos de malária humana são causados pelo *P. vivax*, enquanto o *P. falciparum* é responsável por 16,3% e o *P. malariae* é raramente observado. Entretanto, autores apontam para o fato deste último ser subestimado devido as falhas de diagnósticos (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A identificação das espécies de *Plasmodium* que ocorrem em uma determinada área implica diretamente na manutenção da saúde humana e conseqüentemente, na capacidade de se controlar a doença nestas áreas afetadas (DEANE, 1992).

3.4.1.4 Epidemiologia

A transmissão da Malária está relacionada à fatores biológicos (presença de alta densidade de mosquitos vetores); geográficos (altos índices de pluviosidade, amplitude da malha hídrica e a cobertura vegetal; clima); antrópicos (desmatamentos, construção de hidrelétricas, estradas e de sistemas de irrigação, açudes); sociais (presença de numerosos grupos populacionais, morando em habitações precárias e trabalhando próximo ou dentro das matas) (BRASIL, 2006).

O relatório anual de 2011 da *World Health Organization* (WHO, 2011) apontou melhora na redução do número de casos no mundo. O esforço global de controle da Malária resultou na redução de óbitos em decorrência a doença. Por exemplo, a região africana, onde a WHO atua, mostrou redução de 50% tanto na prevalência de casos confirmados quanto no número de óbitos. Entretanto, em países com um deficiente sistema de controle, estes números e índices não mostraram diminuição significativa.

Estima-se que, em 2010, houve 216 milhões de episódios de malária sendo que 81% ocorreram nas regiões Africanas e 13% no sudeste da Ásia. Além disso, houve 655 mil casos de óbito (91% com ocorrência na África), sendo 86% em crianças menores de 5 anos (WHO, 2011).

No Brasil, na década de 70, foi observada uma significativa redução dos casos de malária nas áreas endêmicas. Entretanto, a prevalência da doença aumentou na década de 80, com registro de 169.871 casos novos.

Devido a política de assentamento rural e extrativismo na região Amazônica na década de 90, foi observado um novo aumento do número de casos no país. De 2000 a 2007, o número de casos variou de 615.247 a 458.624 (COUTO et al., 2010).

No período de 1999 a 2006, os estados da região Extra-Amazônica apresentaram média anual de 211 casos autóctones. Apesar do número reduzido de casos, tem sido observada a ocorrência de surtos localizados em alguns municípios desta região (BRASIL, 2008).

Em 2006, o estado de São Paulo notificou 57 casos autóctones de malária, que representam 42% do total de casos notificados em 2006 na região, um aumento de 90% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2007). Já em 2007, foram relatados 237 casos positivos para malária no estado, destacando-se em sua maioria os processos causados pelo *P. vivax*. Entre estes casos confirmados, 210 (89%) pacientes eram residentes no próprio estado. Porém, a grande parte destes casos foi importada, trazida de outros países e de outros municípios e estados. Apenas 19,4% foram autóctones de São Paulo, sendo que a maioria ocorreu nos municípios de São Paulo, Juquitiba e Bertioga (BEP, 2008).

3.4.1.5 Malária Simiana

Com relação aos PNH, sabe-se que estes podem albergar parasitas como *P. brasilianum* e *P. simium*, entre outros. A identificação das espécies de plasmódios tem claras implicações para o controle da malária nas áreas afetadas (DEANE, 1992), uma vez que a origem dos plasmódios humanos está relacionada com as espécies de plasmódios que infectam certos primatas, hipótese que é suportada pela semelhança existente entre os primeiros (*P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*) e os últimos (*P. reichenowi*, *P. simium* e *P. brasilianum*) (ESCALANTE; BARRIO; AYALA, 1995; AYALA; ESCALANTE; RICH, 1999; FAUNDEUR et al., 2000; TAZI; AYALA, 2011). Esta similaridade ocorre tanto em termos morfológicos quanto em níveis genéticos e imunológicos (COATNEY, 1971; COATNEY et al., 1971; DEANE, 1992)

Desta forma, de acordo com alguns autores, a malária pode ser considerada uma zoonose sendo os primatas os hospedeiros reservatórios (COATNEY et al., 1971; DEANE, 1992; ESCALANTE et al., 1995; FAUNDEUR et al., 2000).

Em 1965, no Brasil, pesquisadores, estudaram os primatas da Mata Atlântica, especificamente no Horto Florestal, região do Parque da Cantareira, Zona Norte de São Paulo. Neste trabalho, o *Callithrix aurita* (sagui-caveirinha), o *Cebus apella* (macaco-prego) e o *Alouatta fusca* (bugio-ruivo) foram investigados quanto à presença do parasita, entretanto somente neste último a infecção foi observada (DEANE et al., 1995).

Deste período em diante muitos outros estudos foram realizados. Neto e Deane (1973) encontraram, no estado do Acre, a presença de *P. brasilianum* em *Callicebus moloch cupreus*, *Cebus macrocephalus*, *Saimiri sciureus*, *Cacajao rubicundus*, *Alouatta seniculus* e *Lagothrix poeppogii*. Os mesmos autores também evidenciaram a mesma espécie de *Plasmodium* em *Alouatta caraya* da região de Goiás; em monos-carvoeiros (*Brachyteles arachnoides*) dos estados de Santa Catarina e São Paulo, e em *Alouatta seniculus* e *Ateles paniscus* provenientes do Amapá (DEANE; NETO; SITÔNIO, 1968; DEANE; NETO, 1969; DEANE; NETO, 1973).

Estudos realizados em 1992 mostraram que 14% dos símios pesquisados no Brasil apresentavam-se infectados com plasmódios (DEANE, 1992). Além disso, os autores encontraram mosquitos anofelinos (*A. cruzii*) positivos para esporozoítos de *P. simium*, e os mesmos concluíram ser o bugio-ruivo (*A. fusca*) o hospedeiro reservatório nesta região.

Recentemente, Faunder et al. (2000), avaliaram 214 primatas provenientes de um resgate de fauna na Guiana Francesa e através de técnicas moleculares encontraram *P. brasilianum* em *Alouatta seniculus macconnelli*, *Saguinus midas midas*, *Pithecia pithecia* e *Ateles paniscus paniscus*, e utilizando sequenciamento genético de genes como SSurRNA (*small subunit ribosomal RNA*) e o gene da proteína de superfície do merozoíto (MSP-1), concluíram haver alta similaridade entre o *P. brasilianum* e o *P. malariae*, sugerindo serem estes uma única espécie. Isto reforça a hipótese dos primatas serem reservatórios naturais para a malária humana e símia.

Em 2008, no Brasil, Duarte et al. (2008) investigaram a ocorrência de *Plasmodium* em PNT das regiões de Mata Atlântica, Mata Atlântica Semidecidual e Cerrado de diversos estados brasileiros. Nos dois primeiros biomas foram encontrados animais positivos na análise molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), principalmente em animais do gênero *Alouatta*. O estudo apontou a relevância do encontro de primatas infectados, em área não endêmica, porém com relatos de casos humanos autóctones, para o parasita e com a presença der resposta imune à proteína circumsporozoíta (CSP), uma vez que tal resultado evidencia a possibilidade de transmissão zoonótica.

Em outros continentes, como os asiático e africano muitos estudos também foram realizados tentando compreender a inter-relação entre a malária símia e a malária humana. Neste contexto, um importante exemplo da infecção em humanos causada por um *Plasmodium* símio foi o surto de malária ocorrido na Ásia e causado pelo *P. knowlesi*. Este é considerado um parasita de primatas que pode afetar humanos, sendo capaz de produzir uma severa doença com alta taxa de mortalidade (TEK NG et al., 2008; GALINSKI et al., 2009; WHO, 2011).

O primeiro caso humano de malária por *P. knowlesi* foi reportado em 1965, na Península da Malásia, e desde então outros países no sudeste asiático relataram a ocorrência de novos casos (como Camboja e as Filipinas). A sua importância em saúde pública tem crescido embora esteja limitado a pessoas que visitem ou morem próximas às regiões florestais (WHO, 2011).

A Organização Mundial da Saúde aponta que para se ter um correto diagnóstico e certeza da infecção por este parasita é necessária a execução da PCR, pois no exame direto (gota espessa) podem ocorrer muitos erros uma vez que este parasita é morfologicamente muito parecido ao *P. malariae* (WHO, 2011).

Os primatas considerados reservatórios, na Malásia (Sarawak), para esta espécie de *Plasmodium* são os *Macaca fascicularis* e o *M. nemestrina*. Na Península da Malásia é o macaco da espécie *Presbytis melalophus* (WHO, 2011). Tais dados corroboram a necessidade de proceder-se à continuidade da investigação epidemiológica da malária em PNT do Brasil

3.4.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da malária é realizado tanto por diagnóstico clínico quanto por testes laboratoriais que podem ser diretos e indiretos. Em áreas em que o acesso da população aos sistemas de saúde é precário ou em situações de epidemia, os indivíduos febris devem ser considerados portadores de malária. Entretanto, os sintomas e sinais da malária são extremamente inespecíficos, prejudicando a distinção entre a malária e outras infecções agudas. Além disso, indivíduos semi-imunes ao plasmódio podem ter parasitos da malária, porém não apresentam sinais clínicos, ou seja, são assintomáticos (BRASIL, 2005).

Outro ponto importante em um exame clínico é o resgate de informações como local de residência e viagens recentes, para poder, desta forma, indicar a possível exposição ao parasito.

Quanto aos testes laboratoriais, o chamando “padrão ouro” para a confirmação específica da doença é o teste parasitológico direto da Gota Espessa. Esta técnica consiste em se retirar uma pequena quantidade de sangue periférico do paciente e distribuir de forma adequada em lâmina de vidro. Após coloração adequada (Giemsa) visualiza-se o parasita em microscópio ótico. O exame da gota espessa deve ser realizado lendo-se de 100 a 200 campos microscópicos (BRASIL, 2005). Os esfregaços sanguíneos também podem ser realizados, porém, em comparação à Gota Espessa, há a diminuição da sensibilidade em cerca de dez vezes.

Dentre os exames diretos (parasitológicos), a PCR é de grande importância, apresentando maior sensibilidade que o método de gota espessa. Porém, seu uso não é indicado para se realizar de forma rotineira devido aos altos custos e necessidade de laboratórios equipados com pessoas habilitadas e treinadas.

Existem diversas técnicas moleculares que visam identificar o parasita, técnicas estas que variam em termos de sensibilidade e especificidade. Alguns pesquisadores realizaram estudos utilizando a PCR para diferentes porções da região 18S do DNA ribossomal (SSUrRNA), ou seja, a porção menor do DNA ribossômico dos plasmódios. Uma das metodologias mais utilizadas foi a descrita

por Snounou et al. (1993), mas existem diferentes protocolos de amplificação do 18S que também são utilizados (KIMURA et al., 1997; RUBIO et al., 1999; SINGH et al., 1999).

Desta forma, foi proposto a realização da *nested* PCR, que possui alta especificidade e com melhora a sensibilidade, pois esta técnica utiliza duas etapas: a primeira amplifica um fragmento gênero-específico e a segunda reação utiliza pares *primers* que são espécie-específicos, e geram diferentes tamanhos de fragmentos, sendo necessária uma reação individual para cada espécie (SNOUNOU et al., 1993), ou ainda uma outra técnica proposta, na qual a segunda reação amplifica fragmentos de 110bp (KIMURA et al., 1997).

Em 2008, Santos et al., realizaram a PCR para identificar plasmódios de capivaras. Os animais selvagens, por serem reservatórios, geralmente, apresentam baixa parasitemia e desta forma, é necessário método molecular com alta sensibilidade. Sendo assim, estes autores empregaram o uso da *nested* PCR, com o objetivo da identificação gênero-específico. Este procedimento usa oligonucleotídeos de uma sequência conservada, flanqueando regiões de sequência variáveis da SSUrRNA e amplificando um fragmento final de ~240 pb para todas as espécies de *Plasmodium* (SANTOS et al., 2008). Devido a este reduzido tamanho consegue-se uma maior sensibilidade no teste.

Em seguida, para se conseguir diferenciar as diferentes espécies de plasmódios, das amostras encontradas como positivas, pode-se empregar o uso de outra *nested* PCR, que amplifica um fragmento maior de ~1.1 kb, porém da região do gene Citocromo b mitocondrial (*cytb*), de acordo com o proposto por Perkins e Schall (2002). Este tamanho maior de fragmento permite um sequenciamento adequado e a identificação das diferentes espécies.

Os testes sorológicos, ou métodos diagnósticos indiretos, como o ELISA e a imunofluorescência indireta (IFI), podem ser utilizados no diagnóstico da malária. Estes testes são de grande valia em estudos epidemiológicos, devido à rapidez do mesmo. A identificação de anticorpos indica infecção, embora não evidencie que o indivíduo esteja parasitado. Já, um teste sorológico negativo não exclui a possibilidade de infecção, pois os anticorpos nem sempre são detectados no início

da doença ou ainda pode haver um quadro de imunossupressão associado.

Existem também, os testes imunocromatográficos, ou testes rápidos, que vem sendo bastante utilizados a campo devido a alta rapidez do resultado e facilidade na execução, porém com custos ainda elevados. Estes testes podem tanto averiguar a presença de anticorpos no soro do paciente como o antígeno (parasito) no sangue do mesmo (BRASIL, 2005).

No mercado, está disponível um deste testes rápidos, (SD Bioline Malária Pf/Pv- Standard Diagnostics, Inc.) que é um ensaio para detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos contra *P. falciparum* e *P. vivax* com antígenos de captura recombinantes MSP para estas duas espécies de plasmódio em sangue total, soro ou plasma. Em estudo realizado por Costa-Nascimento et al. (2007), com amostras de soro de pacientes com gota espessa ou PCR positiva, este teste apresentou sensibilidade de 94% (LIMA, 2011).

3.4.2 *Leishmania* spp. - Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários da Ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (REI, 2008a,b; WHO, 2010).

São zoonoses de grande importância pelo impacto que causam na saúde pública, devido às altas taxas de incidência, morbidade e letalidade. Tais características resultam em sério problema sanitário, com desdobramentos econômico-sociais para os países no qual estas doenças ocorrem (BRASIL, 2007,2006b).

De acordo com as diferentes formas clínicas encontradas em humanos, a doença é classicamente dividida em dois grandes grupos: a leishmaniose visceral (LV), com acometimento das vísceras e a leishmaniose tegumentar (LT), podendo

ser esta última subdividida em leishmaniose cutânea, muco-cutânea, cutânea difusa e disseminada (SILVEIRA; LAINSON, CORBETT, 2004; REI, 2008a).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010), as leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo, afetando, em particular, as populações mais pobres. Está associada a diversos fatores como os sociais (nutrição, extrativismo) e os ambientais (desmatamentos, construção de barragens, urbanização, migração e mudanças climáticas) (DESJEUX, 2001). Estas enfermidades têm ampla distribuição mundial, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas (BRASIL 2006b; WHO, 2010).

Atualmente, dos 88 países onde as doenças estão presente, somente em 32 as leishmanioses são considerada doenças de notificação compulsória (READY, 2008). Apesar da falha na notificação, 12 milhões de pessoas são consideradas infectadas, 350 milhões de pessoas convivem com o risco de contrair a doença e 1 a 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente (1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 de leishmaniose visceral) (DESJEUX, 2001).

Segundo diversos autores, além do homem e dos animais domésticos (cachorro, gato, cavalo) (GRAMICCIA, 2001), diversas espécies de animais selvagens são acometidas, sendo algumas consideradas hospedeiros reservatórios para diferentes espécies de *Leishmania*. Estes animais pertencentes às ordens: Marsupialia, Cingulata, Pilosa, Primates, Carnívora, Rodentia, Perissodactyla e Chiroptera (ASHFORD, 1996; LAISON; ISHIKAWA; SILVEIRA, 2002; COURTENAY; QUINNELL; GARCEZ, 2002; QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Dependendo do reservatório as leishmanioses podem ser classificadas em (WHO, 2010; GRAMICCIA, 2011):

- Leishmaniose zoonótica, na qual os hospedeiros reservatórios são os animais selvagens, comensais ou animais domésticos sendo o homem o hospedeiro acidental;
- Leishmaniose antroponótica, quando o homem é o hospedeiro vertebrado e principal reservatório e fonte de infecção do vetor.

De acordo com as diferentes formas clínicas encontradas em humanos, a doença é classicamente dividida em dois grandes grupos: a leishmaniose visceral (LV), com acometimento das vísceras e a leishmaniose tegumentar (LT), podendo ser esta última subdividida em leishmaniose cutânea, muco-cutânea, cutânea difusa e disseminada (SILVEIRA, LAINSON, CORBETT, 2004; REI, 2008a).

3.4.2.1 Agente etiológico – *Leishmania*

Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar a doença e ainda existem discussões sobre a correta classificação taxonômica das mesmas. Autores, como Lainson e Shaw (1978), classificaram as *Leishmania* em 2 grandes subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (Figura 6), de acordo com as características do desenvolvimento do parasita no intestino do hospedeiro invertebrado (vetor). Deste modo, atualmente, as leishmanias são classificadas em complexos, de acordo com suas principais características (REI, 2008a):

- **Complexo *mexicana*:** fazem parte deste complexo muitas espécies de *Leishmania*, porém as mais bem caracterizadas são a *L. mexicana*, a *L. amazonensis* e a *L. pifanoi*. Os parasitas deste grupo localizam-se na pele e produzem a LT, caracterizada por lesões benignas, no homem, sem disseminação (metástases) nasofaríngeas;
- **Complexo *braziliensis*:** são encontrados apenas nas Américas (Região Neotropical). Fazem parte deste grupo a *L. braziliensis* e a *L. peruviana*. Parasitam a pele (LT), com lesões simples ou múltiplas, com caráter expansivo e tendência a metastização, com produção de novas lesões;
- **Complexo *donovani*:** estes parasitas acarretam diversos tipos clinico-epidemiológico de LV, pois invadem as vísceras, localizando-se preferencialmente no SMF do fígado, baço, órgãos linfóides e medula óssea. São descritos para este complexo as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. Alguns autores relatam que a *L. infantum* (encontrada no Velho

Mundo) e a *L. chagasi* (Novo Mundo) sejam a mesma espécie e, portanto, todas deveriam ser chamadas de *L. infantum*. Ou que a *L. chagasi*, que ocorre somente nas Américas, devesse ser chamada de *L. infantum chagasi* (COURTENAY et al., 2002). Nesta tese, será considerada a nomenclatura de *L. (L) chagasi* ou *L. chagasi* para se referir a espécie causadora de Leishmaniose Visceral no novo mundo.

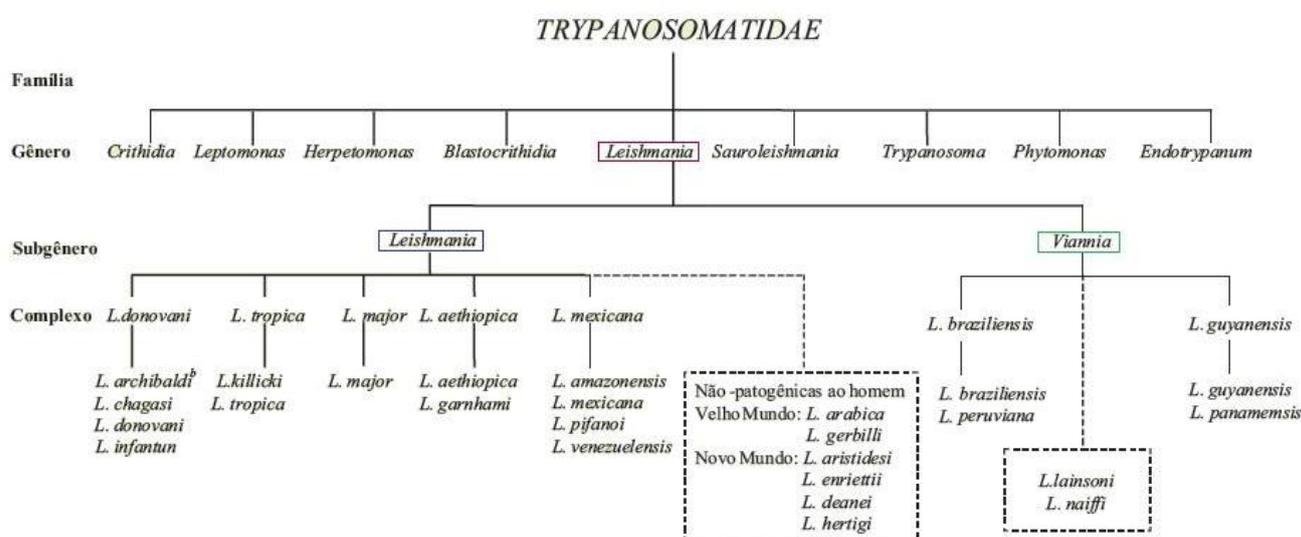


Figura 6 - Chave taxonômica de *Leishmania* (WHO, 2010) – São Paulo - 2012

Portanto, no Brasil, pesquisadores consideram que a LV seja causada pela *L. chagasi* e a LT, causada por diferentes espécies, entretanto as três principais são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em alguns estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007).

3.4.2.2 Ciclo biológico

As leishmânias são transmitidas por vetores, ou seja, pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyias* no Novo Mundo). O ciclo de vida das leishmanias apresenta características

semelhantes entre as diversas espécies de parasitas e incluem uma alternância regular de hospedeiros que varia entre o vetor flebotômico e o hospedeiro vertebrado (homens ou animais) (WHO, 2010). Desta forma, o protozoário apresenta duas formas durante o ciclo de vida (Figura 7) (LAINSON, 1978; LAURENTI, 2010; REI, 2011; WHO, 2011).

Forma promastigota metacíclica: apresenta uma forma alongada, flagelada que é sempre encontrada no tubo digestivo das fêmeas dos hospedeiros invertebrados (flebotômico) (Figura 8). O inseto vetor ao picar o animal ou o humano infectado adquire os parasitas (amastigotas), juntamente com o sangue ou com a linfa intersticial do vertebrado. Estas amastigotas se desenvolvem em promastigotas, por divisão binária, dentro do tubo digestivo do inseto. As promastigotas são alongadas e no polo anterior do parasita há o flagelo que é responsável pela movimentação. Possuem o corpo flexível e o tamanho variando entre 14 a 40 x 1,5-3,0 μm , incluindo o flagelo. O núcleo é central, ovoide ou esférico, e o cinetoplasto está localizado próximo da extremidade anterior. As promastigotas multiplicam-se por divisão binária longitudinal e após atingirem um grande número, invadem as porções anteriores do intestino e faringe dos flebotômicos fêmeas. Por ser as promastigotas a forma infectante, quando o inseto realizar o repasto sanguíneo (picada), estas são transmitidas aos hospedeiros vertebrados.

- a) **Forma amastigota:** as promastigotas, no hospedeiros vertebrados, são fagocitadas por células do SMF, onde, em dois a cinco dias, se transformam em amastigotas. Interações entre os receptores dos macrófagos e moléculas de superfície das promastigotas desencadeiam a entrada destas nas células fagocitárias. As amastigotas (Figura 8) apresentam formas pequenas, variando entre 2 e 5 μm , com formatos ovóides e sem motilidade, pois não possuem flagelo livre, somente um rudimento que está presente na bolsa flagelar, caracterizada como uma pequena invaginação da membrana do parasita. Dentro dos macrófagos, no interior dos vacúolos parasitóforos, as amastigotas se multiplicam por fissão binária e devido a sua grande quantidade no interior da célula e até mesmo pela destruição produzida nas mesmas, os macrófagos infectados

se rompem liberando-as no meio intercelular. As amastigotas liberadas são então fagocitadas por novos macrófagos ou podem invadir órgãos distantes, mantendo a infecção. O flebotomíneo ao picar o vertebrado infectado adquire as formas amastigotas fechando, desta forma, o ciclo do parasita.

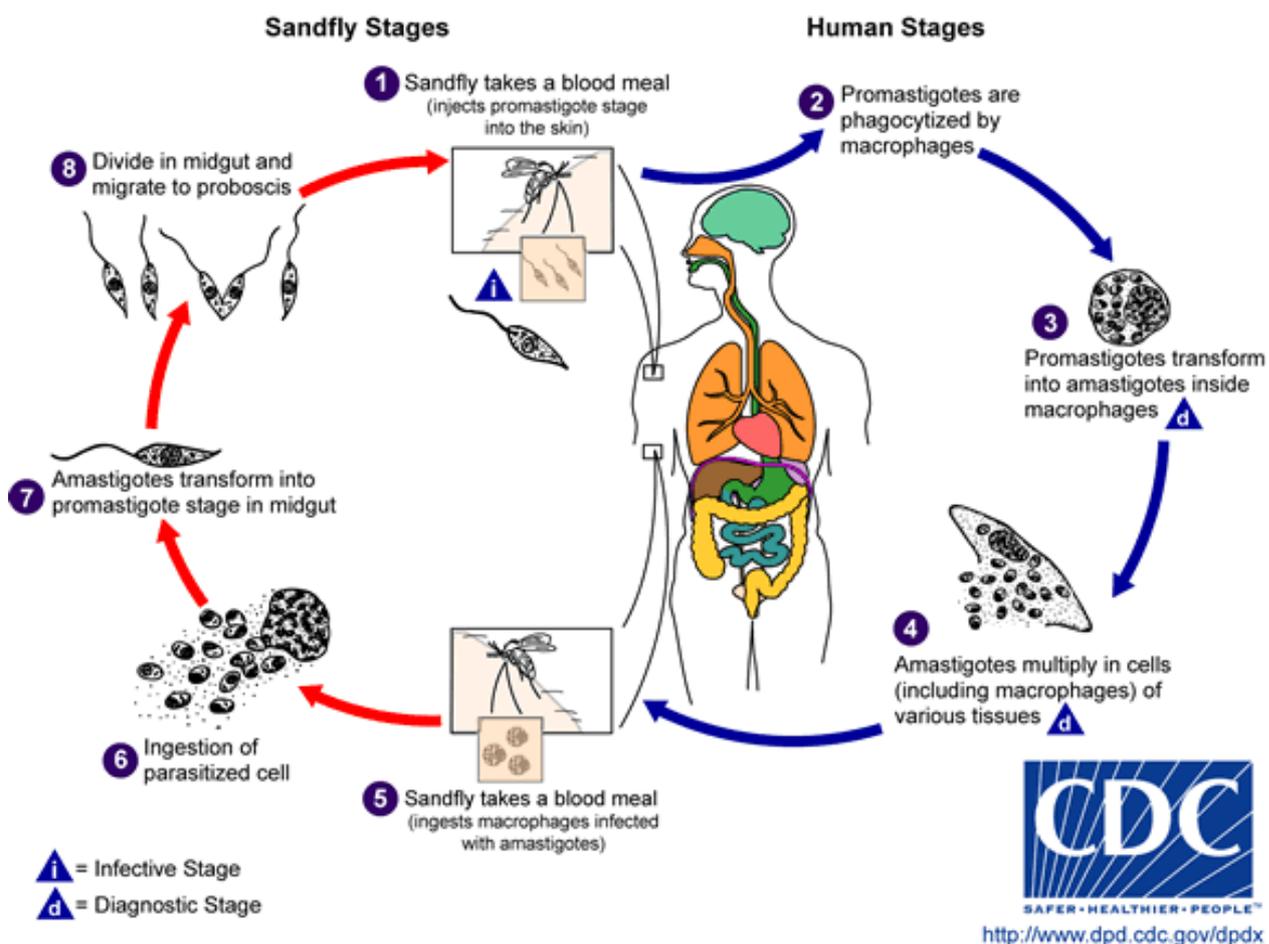


Figura 7 - Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*, demonstrando as duas formas evolutivas: promastigotas (vetor) e amastigotas (hospedeiro vertebrado) (CDC, 2011b) – São Paulo - 2012

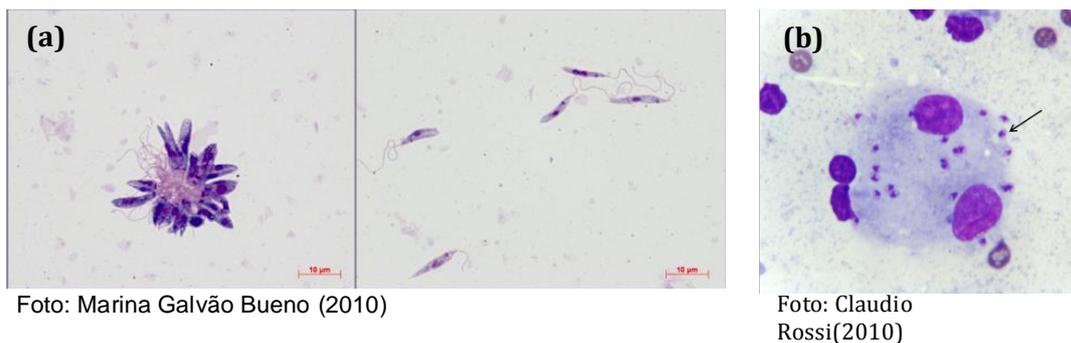


Figura 8 - (a) Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, oriundas de cultura, em fase estacionária de crescimento (Giemsa - 100x). (b) Formas amastigotas (seta) de *Leishmania* sp., no interior do citoplasma do macrófago (Citologia aspirativa de linfonodo de cão) (Giemsa - 100x) – São Paulo -2012

3.4.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

3.4.3.1 Agente e aspectos clínicos

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA), também conhecida como Úlcera de Bauru, Nariz de Tapir e Botão do Oriente, é uma importante zoonose que acomete o homem, diversos hospedeiros reservatórios (animais silvestres e domésticos), além de diversas espécies de vetores (flebotomíneos), podendo desta forma ocorrer em distintos ambientes, o que resulta em diferentes padrões de transmissão e em uma doença de alta complexidade, o que acaba dificultando o seu controle (BRASIL, 2007).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras da doença humana (LTA) e oito espécies descritas somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007).

O quadro clínico da LTA varia dependendo do comprometimento imunitário do hospedeiro e da virulência da espécie do parasita. A forma assintomática pode ocorrer em indivíduos com imunidade inata capaz de controlar a infecção logo no seu início ou naqueles com competente imunidade adquirida (LAURENTI, 2010). Já a forma sintomática manifesta-se com diferentes apresentações clínicas no homem, como pápulas que podem evoluir para úlceras, únicas ou múltiplas, mas indolores; placas verrucosas, papulosas ou nodulares, localizadas ou difusas, ou até mesmo com destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Assim, as diferentes lesões do tegumento podem ser classificadas como: lesões cutâneas localizadas (leishmaniose cutânea localizada - LCL), lesões cutâneas disseminadas (leishmaniose cutânea disseminada *borderline* - LCDB), lesões cutâneo-mucosas (leishmaniose cutâneo-mucosa - LCM), lesões mucosas isoladas (leishmaniose mucosa - LM) e lesões cutâneas difusas (leishmaniose cutânea anérgica difusa - LCAD) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; LAURENTI, 2010).

3.4.3.2 Distribuição geográfica

A Leishmaniose tegumentar tem um caráter praticamente cosmopolita uma vez que ocorre em todos os países das regiões tropicais e subtropicais, exceto na Nova Zelândia, Austrália e algumas Ilhas do Pacífico (JESUS; ARAUJO, 2007).

No continente Americano há registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (BRASIL, 2007) sendo que várias espécies de leishmanias estão envolvidas na transmissão.

No Brasil, a LTA está descrita em vários municípios de todas as unidades federadas (UF), sendo que o número de casos novos no Brasil é de 30.000 casos/ano (JESUS; ARAUJO, 2007) (Figura 9).

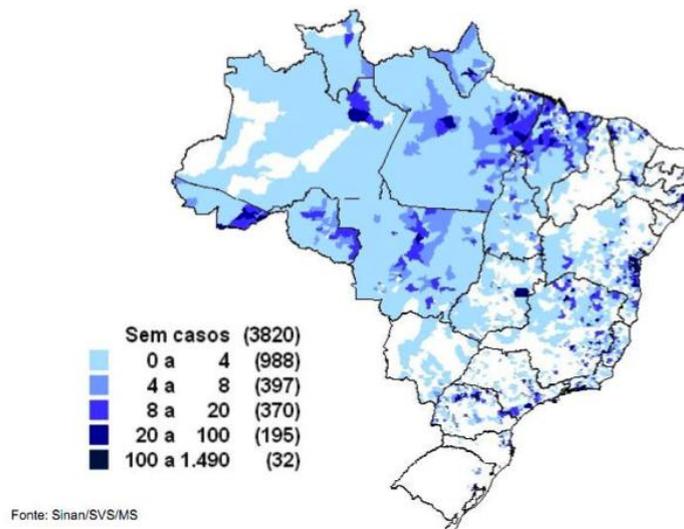


Figura 9 - Incidência de casos de Leishmaniose Tegumentar por município, no Brasil. Sinan, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2007 (BRASIL, 2007) – São Paulo - 2012

3.4.3.3 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. De 2000 a 2008 foram registrados 238.749 casos de LTA no país, com média anual de 26.528 casos novos. No entanto, vem se observando uma redução de casos, como por exemplo, em 2008 no qual está descrito uma queda em 41% dos, quando comparado a 2000 (BRASÍLIA, 2010).

As regiões Norte e Nordeste, de 2000 a 2008, apresentaram os maiores índices e os maiores percentuais de casos do país (39,4% para o Norte e 31,7% para o Nordeste), seguidas das regiões Centro-Oeste (15,9%), Sudeste (9,6%) e região Sul (2,6%) (BRASÍLIA, 2010).

De acordo com boletim do SINAN/SVS/MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde), em 2010, na Região Norte, foram notificados 7.108 casos humanos de LTA, sendo

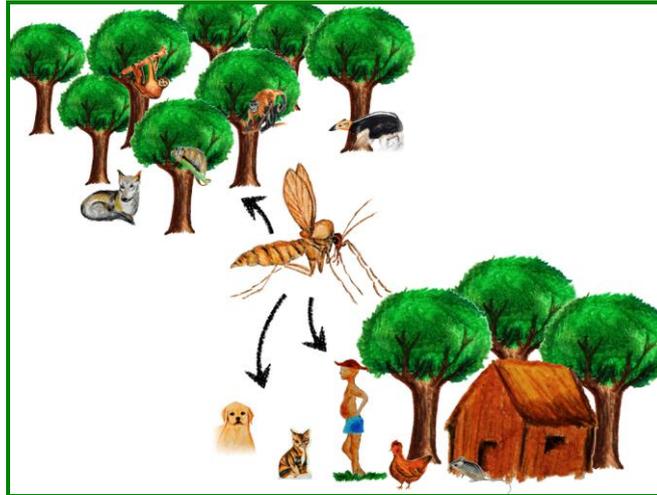
que Rondônia apresentou 922 casos humanos e o Amazonas 1.130 casos. Já na região Sudeste, foram relatadas a ocorrência de 2.428 casos e no estado de São Paulo o número de casos foi de 331 casos (SINAN, 2011a).

Salienta-se que uma mudança no padrão de transmissão vem sendo descrita nas Américas. Nos primórdios, esta ocorria somente entre animais silvestres. Com o adentramento do homem na mata, este passou a fazer parte do ciclo de transmissão como hospedeiro acidental. Fato mais atual refere-se à transmissão em ambiente rural ou mesmo periurbano em decorrência, principalmente, da adaptação do vetor ao peridomicílio (Figura 10). Sendo assim, são descritas a existência de três perfis epidemiológicos (BRASIL, 2007).

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

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

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



Desenho: Katia Haipek (2011)

Figura 10 - Representação dos diferentes ecossistemas, tanto silvestre quanto doméstico, que podem circular o vetor e ocorrer a Leishmaniose Tegumentar – São Paulo - 2012

Os hospedeiros vertebrados da LTA incluem grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos (*Felis catus*, *Canis familiaris*), como roedores (*Rattus rattus*, *Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) canídeos silvestres (*Cerdocyn thous*, *Speothos venaticus*), Xenarthras (*Tamandua tetradactyla*, *Bradypus variegatus*) marsupiais (*Didelphis albiventris*) e equídeos (*Equus caballus*, *E. asinus*) (JESUS; ARAUJO, 2007). O cão doméstico, por exemplo, já foi encontrado infectado com *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. braziliensis* (WHO, 2010). Entretanto o papel dos animais domésticos na manutenção do parasito no meio ambiente e como reservatório ainda não foi definitivamente esclarecido (BRASIL, 2007).

3.4.4 Leishmaniose visceral americana (LVA)

3.4.4.1 *Agente e aspectos clínicos*

A LVA, também conhecida como Calazar, é causada pela *Leishmania (L.) chagasi*, e o vetor de transmissão nas Américas é um flebotomíneo, conhecido como mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) (BRASIL, 2006b). Entretanto, alguns estudos confirmaram a transmissão do cão infectado para carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*) e pulgas (*Ctenocephalides* spp.). Porém, ainda não foi comprovada a transmissão de cão para cão, através do carrapato e da pulga, e nem a transformação da forma amastigota em promastigota nestes ectoparasitas (QUINNELL, 2009). Outras formas descritas de transmissão entre os cães domésticos são a sexual e a congênita; todavia acredita-se que estas vias não sustentam a transmissão em uma área onde não haja a presença dos flebotomíneos.

A principal espécie de flebotomíneo, envolvida com a transmissão da LVA, nas Américas, é a *L. longipalpis* (LAISON; SHAW, 1978; WHO, 2010). São também conhecidos como mosquito-palha, birigui e asa-dura. As principais características destes insetos são: tamanho pequeno, coloração amarelada ou de cor palha e, em posição de repouso, suas asas permanecem eretas e semiabertas (BRASIL, 2006b).

O cão doméstico é considerado o principal reservatório, porém animais selvagens, principalmente os canídeos (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) também estão envolvidos no ciclo epidemiológico (HERWALDT, 1999; BRASIL, 2006b; WHO, 2010).

A infecção canina pode ser assintomática ou sintomática com sinais clínicos diversos por ser uma doença multissistêmica, assim como o é a doença humana que se caracteriza por febre, fraqueza, emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia, mucosas com sangramento espontâneo e diarreia (SILVEIRA et al., 2010)

Salienta-se que a infecção canina se difere da humana em três pontos principais: o acometimento da pele que pode mostrar lesões, ulceradas ou não, descamação, seborréia e alopecia; o acometimento da conjuntiva em parte dos casos, o crescimento exagerado das unhas (onicogribose) e linfadenomegalia (ALMEIDA et al., 2005).

3.4.4.2 *Distribuição geográfica*

A LVA apresenta ampla distribuição mundial e é uma das seis doenças endêmicas mais importantes no mundo por apresentar altas incidência e mortalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas ou quando associada a infecções concomitantes, que levam a imunossupressão, como o HIV (BRASIL, 2006b).

No Brasil, a LVA é responsável por 90% dos casos de leishmaniose, sendo observada principalmente no Nordeste, região que concentra 74% do total de casos do país (Figura 11). Ocorre em zonas rurais, periurbanas e urbanas de grandes centros como Rio de Janeiro e Belo Horizonte, sendo, atualmente, relatada em todas as regiões do país (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; SINAN/SVS, 2011b).

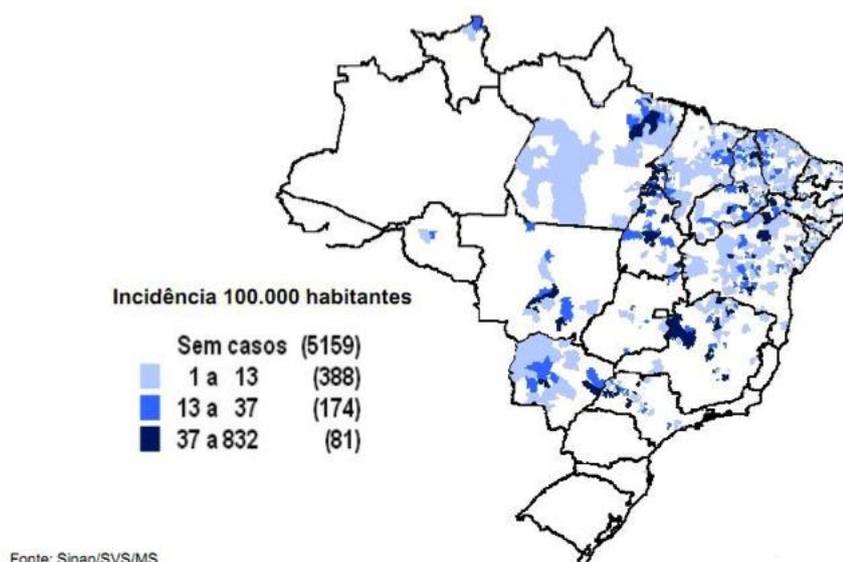


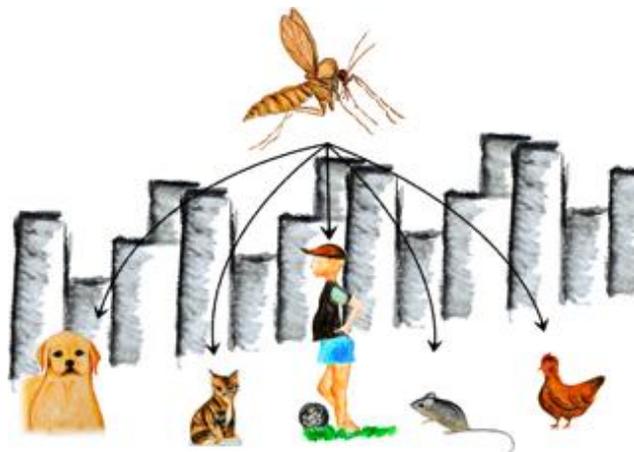
Figura 11 - Incidência de casos de Leishmaniose Visceral por município, no Brasil. Sinan, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (BRASIL, 2006) – São Paulo - 2012

No sudeste, principalmente no estado de São Paulo a LVA está em grande expansão. Até 1998, no estado de São Paulo a LVA era conhecida pela detecção de casos importados, oriundos de outras regiões endêmicas do país. Porém, em 1999, registrou-se o primeiro caso humano autóctone de LVA neste Estado e desde então a doença vem ocorrendo em municípios situados na região do Planalto Ocidental Paulista. Posteriormente, foi detectada em outras regiões como a de Bauru, Marília e Presidente Prudente, seguindo pelos grandes eixos rodoviários e ferroviários. Estas regiões apresentam características topográficas e climáticas diferentes das observadas no Planalto Ocidental Paulista, o que evidencia a plasticidade do protozoário em adaptar-se em ambientes antrópicos (CAMARGO-NEVES, 2007).

3.4.4.3 *Epidemiologia*

A LVA, nas Américas, tem apresentado mudanças epidemiológicas importantes, uma vez que esta ocorria predominantemente em ambientes rurais e periurbanos, na vigência de baixo nível socioeconômico, pobreza e promiscuidade.

Porém, mais recentemente, esta característica vem mudando, passando a LVA a ocorrer em grandes centros urbanos (Figura 12) (BRASIL, 2006; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).



Desenho: Katia Haipek (2011)

Figura 12 - Representação da Leishmaniose Visceral encontrada em grandes centros urbanos e os animais que podem vir a fazer parte do ciclo epidemiológico nestes locais – São Paulo - 2011

Este fato deve-se as diversas transformações no ambiente, como processo migratório, esvaziamento rural, processo de urbanização crescente, desmatamento, pressões econômicas ou sociais, empobrecimento decorrentes da má distribuição de renda etc., elevando a uma redução do espaço ecológico da doença que facilita a ocorrências de epidemias (BRASIL, 2006).

Até 1998, a doença no estado de São Paulo era conhecida pela detecção de casos importados, oriundos de outras regiões endêmicas do país. Porém, em 1999, registrou-se na cidade de Araçatuba o primeiro caso humano autóctone de LVA e, desde então, esta vem ocorrendo em municípios situados na região do Planalto Ocidental Paulista. Posteriormente foi detectada em outras regiões como a de Bauru, Marília e Presidente Prudente, seguindo pelos grandes eixos rodoviários e ferroviários. Estas regiões apresentam características topográficas e climáticas diferentes das observadas no Planalto Ocidental Paulista, o que evidencia a plasticidade do protozoário em adaptar-se em ambientes antrópicos (CAMARGO-

NEVES, 2007). Salienta-se que desde 1999 até 2011 foram registrados 1875 casos humanos autóctones no estado, com 159 óbitos, embora a maior prevalência de LVA na região Sudeste seja encontrada em Minas Gerais (SINAN, 2011b), no ano de 2010 o Brasil registrou 3.526 casos da doença, a maioria (1.662) proveniente da região Nordeste (SINAN, 2011b).

O cão doméstico acima mencionado, apresenta importante papel na transmissão da infecção humana, representando o perfil epidemiológico zoonótico, com a transmissão peridomiciliar e/ou domiciliar, realizada principalmente, no Brasil, pelo vetor flebotomíneo, *Lutzomyia longipalpis* (LAISON; ISHIKAWA; SILVEIRA, 2002). A leishmaniose canina também pode ser encontrada no Mediterrâneo, Ásia, Oriente Médio e outras regiões das Américas (GRAMICCIA, 2001), o que evidencia sua versatilidade, pois além disso, pode ser transmitida por vetores de diferentes espécies, subgêneros e até mesmo gênero (WHO, 2010).

Atualmente, no Brasil, o controle da leishmaniose canina se faz através da erradicação de animais soropositivos, mas segundo alguns autores (LAISON; ISHIKAWA; SILVEIRA, 2002) a existência de animais silvestres reservatórios claramente complica a situação e provavelmente torna a erradicação completa da doença impraticável.

A leishmaniose canina apresenta sinais clínicos diversos por ser uma doença multissistêmica. Os sinais clínicos no cão doméstico variam de acordo com os órgãos atingidos e os mecanismos imunológicos ativados. Há uma forma aguda, que pode levar o animal a óbito em pouco tempo, e uma forma crônica, latente, que pode permanecer assintomático. Os animais acometidos, geralmente apresentam apatia, hipertermia, hiporexia ou anorexia, anemia, linfadenomegalia, perda progressiva de peso e caquexia, êmese, diarreia, coriza, alterações dermatológicas (alopecia, úlceras cutâneas, descamação, hiperqueratoze), onicogribose, alterações oculares (blefarite, ceratoconjuntivite), alterações renais e hepáticas, pneumonia, miocardite, mioatrofia e diáteses hemorrágicas (ROSSI, 2007; BANETH et al., 2008; LAURENTI, 2010).

No exame histopatológico, encontra-se nos tecidos uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença de amastigotas no interior de macrófagos. Proporcionalmente a severidade das lesões, observa-se, na matriz extracelular, de

cães sintomáticos, uma diminuição de colágeno tipo I e um aumento de fibras de colágeno tipo III (BANETH; KOUTINAS; SOLANO-GALLEGO, 2008).

Os felinos domésticos também podem ser acometidos, apesar da ocorrência de infecção ser esporádica e os animais não serem considerados um importante reservatório da doença. Devido a fatores genéticos e imunológicos acredita-se que gatos infectados possuem certo grau de resistência natural à enfermidade (ROSSI, 2007; COSTA et al., 2010).

No homem, a doença também pode ser assintomática, aguda ou crônica caracterizando-se, geralmente, por febre, fraqueza, emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia, mucosas com sangramento espontâneo e diarreia (REI, 2008).

De acordo com boletim do SINAN/SVS/MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde), em 2010, na Região Norte, foram notificados 636 casos humanos de LVA. Já na região Sudeste, foram relatadas a ocorrência de 629 casos humanos e no estado de São Paulo o número de casos foi de 157 casos (SINAN, 2011b).

No estado de São Paulo, a Leishmaniose está em grande expansão. Desde a introdução da leishmaniose visceral americana (LVA) no estado de São Paulo, em 1999, até outubro de 2011, foram confirmados 1.875 casos humanos autóctones, com 159 óbitos.

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) do estado segue a classificação epidemiológica preconizada no Programa de Vigilância e Controle da doença, conforme demonstrado na figura 13.

Segundo este programa, o estado apresenta 100 municípios com transmissão de LVA (Figura 14): 66 municípios apresentam casos humanos e caninos autóctones, 05 municípios registram casos humanos autóctones, embora sem detecção de autoctonia canina (Álvaro de Carvalho, Jaú, Marília, Parapuã e Quintana) e 29 municípios apresentam somente transmissão canina. Já a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* foi confirmada em 125 municípios. Destes, 92 apresentam transmissão canina e/ou humana de LVA, porém, os outros 33 não registram casos caninos e/ou humanos da doença (BEP, 2011).

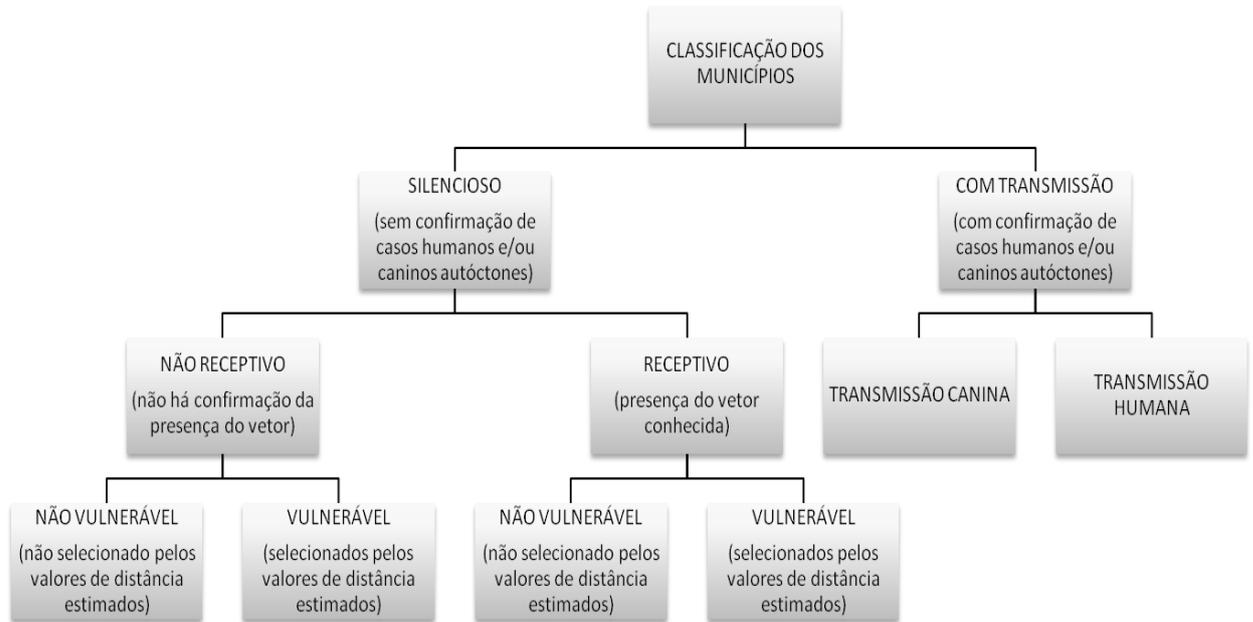
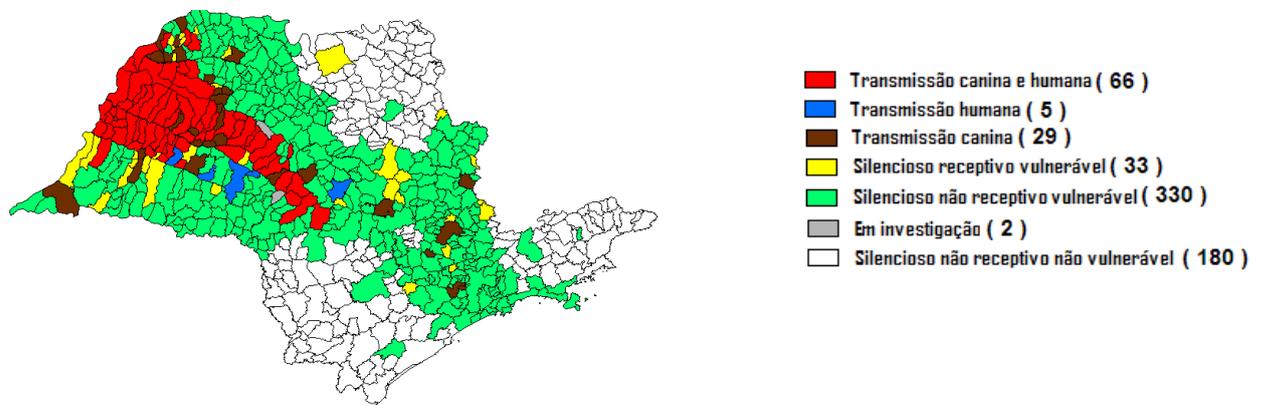


Figura 13 - Classificação epidemiológica da AA pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BEPA, 2011) – São Paulo - 2012



Fonte: Sucen/SES-SP

Figura 14 - Distribuição de municípios do estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral americana, novembro de 2011 (BEPA, 2011) – São Paulo - 2012

3.4.4.4 *Leishmania spp. em primatas não humanos*

Como dito anteriormente, muitos animais selvagens (cachorro-do-mato, gambás, tamanduás, preguiças, tatus, roedores etc) são tidos como reservatório das

leishmanias. A maioria dos animais nos quais foram relatadas a ocorrência de *Leishmania* spp. aparentemente apresentavam-se assintomáticos. Entretanto, alguns mamíferos, domésticos ou silvestres, podem eventualmente vir a óbito devido à infecção, como por exemplo, os cães domésticos, acometidos pela leishmaniose canina, causada pela *L. (L.) chagasi* (WHO, 2010).

A localização do parasito (derme ou víscera) no hospedeiro reservatório não corresponde necessariamente à localização encontrada nos humanos. Por exemplo, a *L. (L.) guyanensis*, infecta órgãos internos de preguiças, com pouco envolvimento da pele, enquanto a mesma infecção nos humanos é caracterizada por lesões cutâneas (WHO, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), a mera presença de infecção em uma determinada espécie animal, mesmo em grande número, não necessariamente indica tratar-se de um reservatório. Segundo os autores, existem alguns critérios que devem ser considerados para classificar um animal como reservatório, tais como:

- a população de hospedeiro deve ser suficientemente abundante e sobreviver a um grande período de tempo para servir como fonte de alimento aos vetores.
- É necessário haver um intenso contato entre hospedeiro e o vetor para que o vetor possa picar um hospedeiro infectado e subsequentemente poder picar outro indivíduo, transmitindo o parasita à população hospedeira.
- A proporção de indivíduos que se tornam infectados durante o seu período de vida deve ultrapassar 20%, embora a prevalência possa variar de acordo com o período da estação (sazonalidade).
- O curso da infecção em um hospedeiro reservatório deve ser longo e a infecção deve ser suficientemente não patogênica para permitir que o parasita sobreviva a qualquer período sem haver transmissão.
- Os parasitas devem permanecer na pele ou no sangue em número suficiente para serem transmitidos ao vetor.

Além dos animais silvestres citados como possíveis reservatórios das leishmanioses, os primatas também podem fazer parte do ciclo epidemiológico desta

doença, uma vez que já foram descritos albergando o parasita, como por exemplo, em 1989, no qual Laison et al. (1989) descreveu a ocorrência de *Leishmania (Viannia) shawi*.

Estudos experimentais revelaram que os primatas podem ser acometidos pela doença, manifestando enfermidade de forma semelhante aos humanos, especialmente no que diz respeito ao curso da resposta primária à infecção, (SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990). Devido a este fato, alguns primatas (*Macaca mulata*; *Saimiri* sp., *Aotus* sp., *Cebus* sp., *Callithrix* sp.) têm sido utilizados em modelos experimentais, como por exemplo, para o desenvolvimento de vacinas, por serem bons modelos biológicos para se obter mais conhecimentos sobre a doença humana (SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990; GRIMALDI, 2008). Porém, os primatas possuem variações na susceptibilidade aos parasitas que causam as leishmanioses e a doença específica depende da carga parasitaria e da espécie hospedeira (SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990; GRIMALDI, 2008).

Estudo experimental realizado em macaco prego (*C. apella*), no qual os pesquisadores inocularam promastigotas de *L. (L.) amazonenses*, mostrou que os animais desenvolveram lesões cutâneas no local do inoculo e em outras áreas, mas apresentaram cura completa das lesões após 3 meses. Entretanto, quando inoculados com *L. (V.) braziliensis* o parasitismo e a lesão duraram um período maior, variando entre 150 a 300 dias (SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990).

Apesar destas características, poucos estudos epidemiológicos sobre a ocorrência de LVA e LTA foram realizados em PNH, sejam de vida livre, sejam mantidos em cativeiro.

No velho mundo, há relatos de infecção por *L. major* em macaco-verde-africano (*Cercopithecus sabaenus*) de vida livre. Em 2009, pesquisadores do Kenya investigaram, por teste sorológico (ELISA e Western blot), a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em área endêmica e encontraram uma taxa de 66,1% de positividade em animais assintomáticos (GICHERU et al., 2009).

No Panamá foi descrito, em 1973, a ocorrência natural de *L. (V.) braziliensis* em macaco-da-noite (*Aotus trivigatus*) e em sagui (*Saguinus geoffroyi*) (HERRER; CHRISTENSEN; BEUMER, 1973; GRIMALDI, 2008).

No Brasil, alguns estudos tem sido realizados para entender o papel dos primatas selvagens no ciclo das leishmanioses. Em 1989, Lainson et al. (1989) identificaram *Leishmania* (V.) *shawi* em macaco-prego (*C. apella*) e cuxiú (*Chiropotes satanas*) no estado do Pará. No Paraná, quatro *C. apella* de vida livre foram positivos para anticorpos anti-*Leishmania*, pelo teste de aglutinação direta (VOLTARELLI, 2009).

Bueno et al. (2010) avaliaram a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em primatas neotropicais de vida livre e mantidos em alguns CETAS no estado de São Paulo e os dados obtidos afirmam a necessidade de monitorar esta doença em primatas de vida livre. Através da técnica de ELISA, foi encontrado um sagui-de-tufo-branco (*C. jacchus*), proveniente de um CETAS, soropositivo, enquanto que 7,5% dos animais de vida livre foram positivos, sendo todos estes da espécie sagui-de-tufo-preto (*C. penicillata*). Os dados obtidos sugerem a necessidade de monitorar infecção por *Leishmania* sp. em primatas de vida livre e nos cativos.

Em cativeiro, assim como descrito para os canídeos, os PNH também podem ser acometidos pelas leishmanioses, principalmente em área endêmica. Pesquisadores (MALTA et al., 2010), relataram a ocorrência de leishmaniose visceral em PNH presentes na Fundação Zoo-Botânica, em Belo Horizonte, sendo que 17 destes foram positivos para *Leishmania* spp. pela PCR e um animal, da espécie guigó (*Callicebus nigrifrons*), veio a óbito. No exame necroscópico foram encontrados lesões características da doença, como esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenopatia, enquanto na avaliação histopatológica observaram-se granulomas e infiltrado histiocitário nos órgãos linfoides. A PCR e a imunistoquímica foram realizadas para confirmar o caso clínico.

O quadro 1 mostra a ocorrência de infecção natural em primatas não humanos e as localidades onde este fato ocorreu.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Espécies de Primatas		Doença no Homem	Distribuição Geográfica	Referência
	Nome Comum	Nome Científico			
Primatas					
<i>Leishmania</i> (V.) <i>shawi</i>	Cuxiú-preto	<i>Chiropotes satanás</i>	Leishmaniose cutânea	Brasil (região norte)	BRASIL, 2007; LAINSON, 1989.
	Macaco-prego	<i>Cebus apella</i>			
	Macaco-verde-africano	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Leishmaniose cutânea	Kenya	
<i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i>	macaco-da-noite	<i>Aotus trivigatus</i>	Leishmaniose cutânea	Panamá	GRIMALDI, 2008; MALTA et al., 2010
	sagui de geoffrey	<i>Saguinus geoffroyi</i>			
<i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>	Guigó	<i>Callicebus nigrifrons</i>	Leishmaniose visceral	Belo Horizonte, MG, Brasil	MALTA et al., 2010
	Bugio	<i>Alouatta guariba</i>			
	macaco-prego-de-peito-amarelo	<i>Cebus xanthosternos</i>			
	mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus crysomelas</i>			
<i>Leishmania</i> (L.) <i>major</i>	macaco-da-noite	<i>Aotus nigriceps</i>	Leishmaniose cutânea	Kenya, África.	ASHFORD et al., 1996; GICHERU et al., 2009
	macaco-parauacu	<i>Pithecia irrorata</i>			
	sagui-imperador	<i>Saguinus imperator</i>			
	macaco-verde-africano	<i>Cercopithecus aethiops</i>			
<i>Leishmania</i> spp.	sagui-de-tufo-branco	<i>Callithrix jacchus</i>	Leishmaniose	São Paulo, Brasil.	BUENO et al., 2010
	sagui-de-tufo-preto	<i>Callithrix penicillata</i>			
	macaco-prego	<i>Cebus apella</i>		Paraná, Brasil.	VOLTARELL et al., 2009.

Fonte: adaptado de Laison e Shaw (1978) e Ashford (1996).

Quadro 1 - Espécies de Primatas Não Humanos com ocorrência natural de *Leishmania* – São Paulo – 2012

3.4.4.5 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses podem ser realizados através de diferentes testes (parasitológicos, sorológicos, imunológicos e moleculares). Porém, não há um teste diagnóstico que apresente 100% de sensibilidade e especificidade. Para tanto, é de grande importância que se compreenda os diversos métodos diagnósticos e as suas respectivas limitações para, se possível, tentar agregar diferentes métodos no sentido de obter uma acurácia maior do resultado.

Abaixo estão descritos os principais métodos (direto ou indireto) para diagnosticar a doença de acordo com diferentes autores (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; LAURENTI, 2010; WHO, 2010).

- Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico das leishmanioses, tanto canina (animal) quanto humana, muitas vezes é difícil de ser realizado devido à variedade de sinais da doença. Muitas vezes os sinais clínicos são comuns a outras enfermidades, necessitando de testes laboratoriais para confirmação da doença.

Vale ressaltar que os casos assintomáticos acabam dificultando o correto diagnóstico, como por exemplo, na leishmaniose canina no qual os cães podem não desenvolver sinais ou podem apresentá-los após períodos entre três meses a alguns anos.

Em relação aos animais selvagens, muitos são considerados reservatórios assintomáticos, e pouco ainda se sabe sobre manifestações clínicas nestes animais. Entretanto, deve-se ter especial atenção para os animais em cativeiro (Jardins Zoológicos, Criadouros e Centros de Triagem), principalmente em área endêmica para a doença. Estes animais, nestas localidades, podem apresentar estresse elevado e consequente imunossupressão, o que poderia desencadear o aparecimento da doença.

- Diagnóstico Parasitológico Direto

Este diagnóstico baseia-se na observação de formas amastigotas do parasita (Figura 7) em esfregaços sanguíneos ou impressões citológicas (decalques) de medula óssea, linfonodo, fígado, aspirado esplênico e lesões cutâneas. Os decalques podem ser corados com Giemsa, Panótico ou coloração de Wright. Este ensaio é considerado como o teste ouro para o diagnóstico e apresenta a vantagem de ser de rápida execução e baixo custo, porém requer treinamento na análise citológica e a sensibilidade do teste depende do grau de parasitemia, do tipo de material colhido e do tempo de leitura da lamina. Além disso, em casos crônicos pode-se obter resultado falso negativo, pois em algumas circunstâncias a observação do parasita se torna muito difícil.

As biópsias de pele seguida da avaliação histopatológica e imunoistoquímica, são indicada para se obter o diagnóstico parasitológico, nos casos de lesões de pele, no qual há auto grau de parasitismo. Por exemplo, em estudo realizado em 2009 isolou-se, por cultura, parasitas de pele intacta de cães domésticos soro reativos e, desta forma, os autores sugerem ser a pele intacta um bom tecido para confirmação parasitológica, através de cultura e imunoistoquímica (MADEIRA et al., 2009).

Porém, em estudos com PNT, a IHQ realizada em pele íntegra não mostrou ser um bom teste diagnóstico, uma vez que este tecido em primatas mostrou-se pouco parasitado (dados não publicados)¹.

- Isolamento do parasita em cultura

O cultivo do parasita também pode ser uma ferramenta para o diagnóstico e identificação da *Leishmania*. As formas amastigotas presente no tecido, em meios

¹ informação retirada da publicação não publicada de Bueno 2011.

de cultura específicos, se transformam em promastigotas, podendo então ser identificadas. Os meios de cultura utilizados são o NNN (Novy, Mc Neal e Nicolle), RPMI-1640, LIT (Liver Infusion Triptose) e a HO-MEN. Este método tem a sua utilidade, entretanto requer laboratório especializado, longo período de realização (mínimo de 5 dias e máximo de 1 mês para confirmar resultado negativo) além de nem todas as espécies de *Leishmania* serem de fácil cultivo, como por exemplo, a *Leishmania braziliensis* que cresce pobremente em meio de cultura (BRASIL, 2007).

Como já aventado, o isolamento pode permitir também a identificação de *Leishmania* por suas características de crescimento em cultura (rápido/lento), tamanho das formas promastigotas, motilidade. Outras técnicas de identificação podem fazer uso deste isolamento. A caracterização isoenzimática baseia-se na análise do posicionamento das bandas de diversas isoenzimas no gel após eletroforese e comparação com perfis de corrida gerados com cepas-referência. A técnica que usa anticorpos monoclonais pode ser utilizada também com a mesma finalidade, assim como o corte com enzimas de restrição do DNA do cinetoplasto, gerando perfis de bandas no gel de agarose (PCR-RFLP). Além do isolamento, todas dependem do crescimento em massa do parasito na cultura. Outra limitação refere-se à produção de anticorpos monoclonais, técnica de domínio restrito a alguns laboratórios.

- Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos têm sido utilizados em grande escala para diagnóstico da doença e estudos epidemiológicos. Podem ser divididos em testes diretos, no qual se busca o antígeno, ou testes indiretos, no qual se busca os anticorpos anti-*Leishmania*. Muitos ensaios sorológicos já foram analisados, como por exemplo, a fixação de complemento, hemaglutinação indireta, aglutinação direta, imunoeletroforese, imunofluorescência indireta (IFI), ELISA e western blot.

Para o diagnóstico da leishmaniose canina o Ministério da Saúde recomenda a IFI e o ELISA, devido a alta sensibilidade dos testes, tanto em animais doentes, que desenvolvem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*, quanto em animais

assintomáticos. Estes testes são kits fornecidos por BioManguinhos – Ministério da Saúde, e empregam como antígeno formas promastigotas de *Leishmania major-like*. Entretanto, os resultados destes testes podem produzir falso-positivos e negativos, e desta forma, não permitem indicar infecção específica, uma vez que podem apresentar reações cruzadas com outros trypanosomatídeos e outros microrganismos.

Tanto para o diagnóstico da doença, seja em animais quanto em humanos, há no mercado testes imunocromatográficos, que utilizam anticorpos monoclonais anti-IgG de cão ou antígeno recombinante (rK39). Estes testes apresentam sensibilidade e especificidade similar ao ELISA, e apresentam a vantagem de serem rápidos e poderem ser utilizados a campo (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; DE LIMA et al., 2010).

- Teste intradérmico de Montenegro

O teste intradérmico de Montenegro, intradermo-reação ou teste de *Leishmania*, é um teste cutâneo, no qual inocula-se na derme antígenos (preparados de formas promastigotas mortas) e se faz a leitura da reação inflamatória (nódulo ou pápula) após 48 a 72 horas. Este teste avalia a resposta imune celular, ou seja, a reação de hipersensibilidade do tipo tardia, frente ao antígeno de *Leishmania*. É muito utilizado para avaliação do *status* imunológico em humanos com LTA assim como para fins diagnósticos. De maneira geral, o teste é positivo nos casos de leishmaniose cutânea, porém na forma cutânea anérgica difusa, assim com na leishmaniose visceral ativa, o resultado costuma ser negativo (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; LAURENTI, 2010).

Em cães, alguns estudos experimentais estão sendo realizados e sugerem que este teste possa vir a ser usado como método diagnóstico auxiliar. Entretanto, mais estudos ainda são necessários.

- Diagnóstico molecular

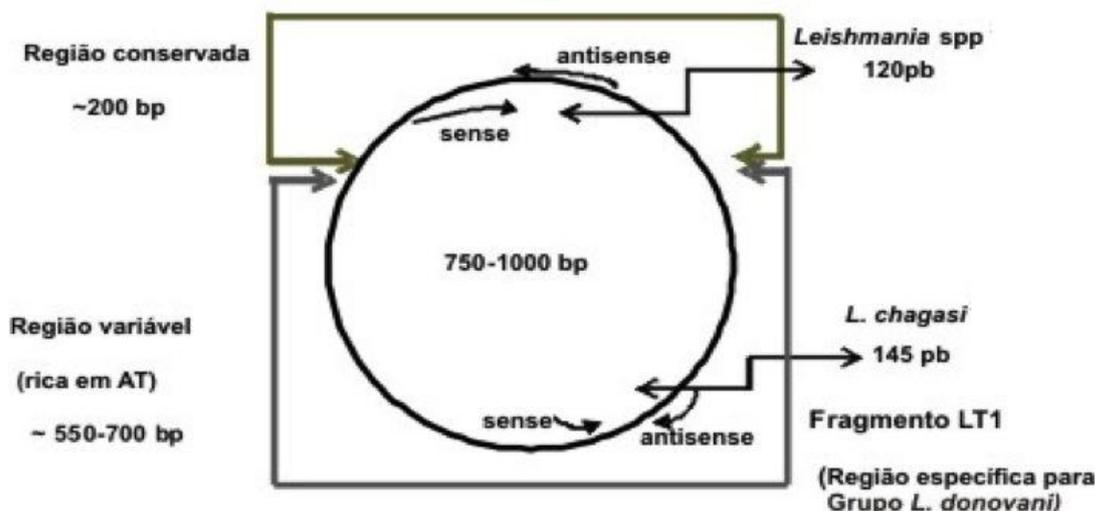
Os estudos moleculares têm sido cada vez mais empregados no diagnóstico das leishmanioses. A PCR permite a amplificação de sequências específicas do DNA do parasita. Podem ser utilizados DNA parasitário proveniente de uma grande variedade de tecidos do hospedeiro, como fígado, baço, pele, linfonodo, sangue, medula óssea, além de também poder ser utilizado cortes histológicos de tecido parafinado e até mesmo o próprio vetor.

De forma geral, os métodos moleculares são rápidos podendo ser utilizados em diferentes tipos de amostras biológicas de vetores, hospedeiros, reservatórios, como por exemplo, sangue, tecido a fresco ou congelado, tecido parafinado, culturas etc. Estas técnicas moleculares permitem a identificação da espécie do parasita e podem ser aplicadas em estudos epidemiológicos (envolvimento de reservatórios e vetores, por exemplo), filogenéticos, etc. As principais limitações destas técnicas são o alto custo, laboratório especializado, técnicos habilitados e a falta de padronização entre os laboratórios (BRASIL, 2007).

Muitas pesquisas já foram e ainda continuam a ser realizadas no sentido de encontrar um teste molecular em que altas sensibilidade e especificidade estejam juntas, porém até o momento, não há um teste em que se obtenha 100% destas características. Vários são os alvos que podem ser utilizados para o diagnóstico molecular, e a escolha deste dependerá do objetivo da pesquisa. Alguns deste alvos são: DNA do cinetoplasto (kDNA), sequências de DNA codificadoras de RNA ribossômico (rDNA), locus da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), locus do mini-exon, entre outras (LACHAUD, 2002; CASTILHO et al., 2002; MARFURT, 2003).

Um dos alvos mais utilizados no diagnóstico molecular das leishmanias é o DNA do cinetoplasto (kDNA). O kDNA situa-se na base do flagelo e é composto por uma rede de moléculas de DNA circulares, que possuem regiões variáveis e conservadas (com um tamanho de pelo menos 120 pb) e portanto podem ser divididas em dois grupos (Figura 15). O primeiro possui moléculas grandes, com cerca de 20-35kb, que são denominadas de maxicírculos e estão presentes em 20-50 cópias por cinetoplasto. A segunda é composta por moléculas menores,

chamadas de minicírculos e apresentam-se em grande quantidade (10.000 unidades / cinetoplasto) e com sequências heterogêneas entre os grupos sendo assim este alvo faz o teste ser mais sensível e tem sido utilizado para separar classes gêneros e espécies (DEGRAVE et al., 1994; PEREIRA-CHICCOLA, 2009).



Fonte: (PEREIRA-CHICCOLA, 2009)

Figura 15 - Minicírculo de *Leishmania* composto por uma molécula de DNA circular. Visualiza-se região conservada e variável - São Paulo - 2012

Apesar deste alvo ser uma ótima ferramenta diagnóstica, as vezes torna-se necessária a utilização de mais de um alvo para um adequado diagnóstico molecular, ou então a associação de técnicas, como por exemplo, a análise de restrição de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP) para possibilitar a detecção e identificação de *Leishmania* (MARFURT, 2003; VOLPINI et. al., 2004; ANDRADE et al., 2006).

Recentemente, pesquisadores têm empregado o uso da reação de PCR em tempo real (qPCR) na detecção, identificação e quantificação de organismos. Essa técnica é vantajosa em relação a PCR convencional, pois garante uma maior sensibilidade e risco menor de contaminação (FRANCINO et al., 2006).

- Xenodiagnóstico

Esta técnica se baseia em identificar o patógeno através do uso de vetores. Fêmeas de flebotomíneos criadas em laboratório e isentas de parasitas são colocadas em contato com o animal e, após o repasto, as mesmas são avaliadas quanto a presença do parasita, confirmando a infectividade ao vetor. Uma das principais dificuldades de se trabalhar com esta técnica é a necessidade de manutenção das colônias do vetor, porém é de grande valia para avaliar a infectividade dos flebotomíneos (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007).

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Colheita de amostras

4.1.1 Animais e locais de colheita

No período compreendido de 2008 a 2011, colheu-se material biológico de espécimes de PNT de vida livre (estado de São Paulo e de regiões Amazônicas, Figura 16) e mantidos por tempo variável em cativeiro (CETAS e Zoológico). Os locais previamente selecionados para a amostragem estão apresentados no Quadro 2.

Além disso, no Apêndice A e B estão registradas as informações mais relevantes referentes aos animais amostrados neste trabalho.

LOCAL DE COLETA	REGIÃO	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	BIOMA
DEPAVE - Ibirapuera	São Paulo/Capital	23°35'S e 46°39' W	<i>ex situ</i> / Mata Atlântica
DEPAVE - CRAS	São Paulo/Capital	23°24'S e 46°46'W	<i>ex situ</i> / Mata Atlântica
CETAS -Lorena	Lorena/ SP	22°43' S e 45°07' W	<i>ex situ</i> / Mata Atlântica
UNIMONTE	São Vicente/ SP	23°56'S e 46°23'W	<i>ex situ</i> / Mata Atlântica
CRAS – PET	Guarulhos/ SP	23°29'S e 46°31' W	<i>ex situ</i> / Mata Atlântica
Zoológico de Bauru	São Vicente/ SP	22°20' S e 49°01' W	<i>ex situ</i> / Cerrado
Horto Florestal de Bauru	Bauru/SP	22°18' S e 49°02' W	<i>in situ</i> / Mata Atlântica
Fazenda Sta. Cecília	Patrocínio Paulista/ SP	20°46' S e 47°14' W	<i>in situ</i> / Mata Atlântica
São Joaquim da Barra - PCH	São Joaquim da Barra/ SP	20°30' S e 47°51' W	<i>in situ</i> / Mata Atlântica
Abunã	Abunã / Rondônia	9°47'S e 65°16'W	<i>in situ</i> / Amazônia
BR-319	Amazonas	5°12'S e 61°50'W	<i>in situ</i> / Amazônia

Quadro 2 - Relação dos locais e regiões de coleta de amostras biológicas de PNT, coordenadas geográficas e tipo de local a que pertencem – São Paulo/Amazônia – 2008-2012

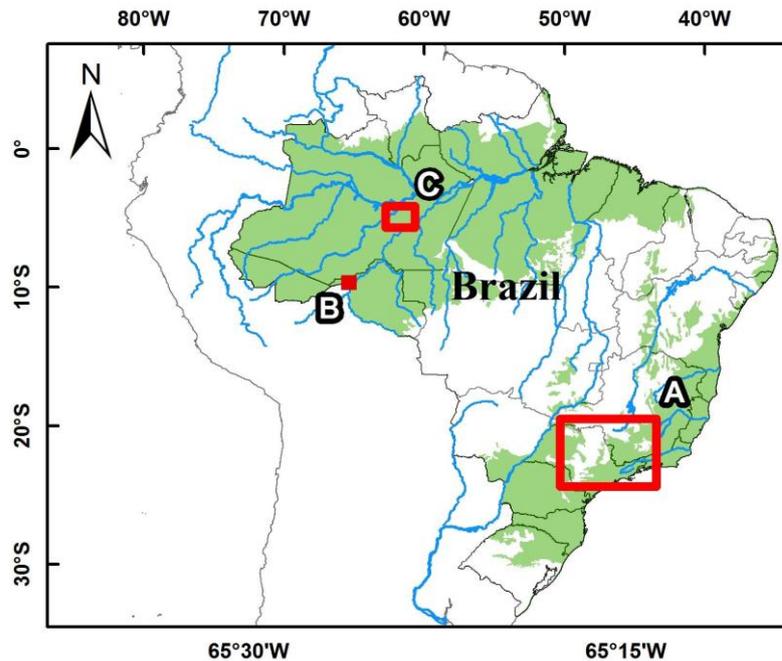


Figura 16 - Mapa do Brasil evidenciando os locais e as regiões usadas na colheita de amostras biológicas de PNT: (A) estado de São Paulo, (B) Rondônia e (C) Amazonas – São Paulo/Amazônia – 2008 - 2012

4.1.1.1 Locais de colheita - Ex situ

- DEPAVE

Um dos CETAS escolhido para o desenvolvimento do projeto foi o Departamento de Parques e Áreas Verdes - DEPAVE III, da Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, da Prefeitura de São Paulo, que até o momento das colheitas era dividido em duas unidades. Uma de suas atividades é a recepção de animais feridos ou provenientes do tráfico para destinação ao cativeiro ou retorno à natureza.

Uma destas unidades localiza-se próximo ao Parque do Ibirapuera, na zona sul da capital e foi denominado neste trabalho de DEPAVE-Ibirapuera. A outra unidade, DEPAVE-CRAS, localiza-se no Parque Anhanguera (Figura 17), Mata Atlântica, no bairro de Perus, zona leste da capital.



Fonte: google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 17 – Imagem aérea do Parque Anhanguera, no bairro de Perus, São Paulo (à esquerda), e foto de recinto externo para manutenção de saguis (*Callithrix* spp.) (à direita) localizado no DEPAVE-CRAS – São Paulo- 2009

- CETAS de LORENA

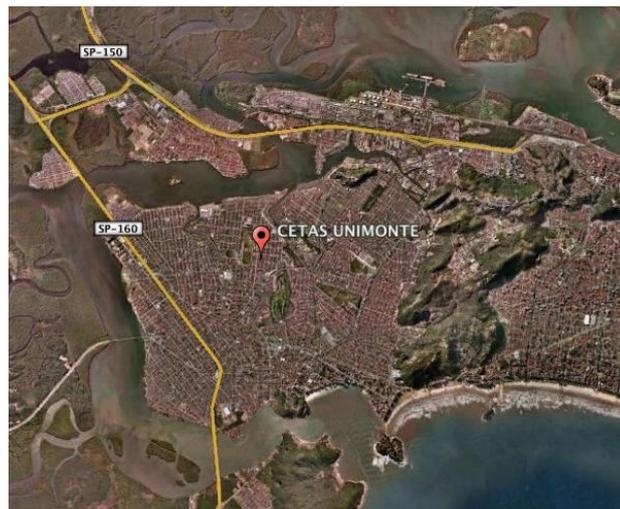
Este CETAS está localizado na cidade de Lorena, no estado de São Paulo. Pertence ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A sua finalidade é recepcionar, triar e tratar os animais silvestres resgatados ou apreendidos pelos órgãos fiscalizadores, assim como eventualmente, receber animais silvestres de particulares que mantinham os animais em cativeiros domésticos de forma irregular (Figura 18).



Figura 18 - Recinto externo (à esquerda) utilizado para abrigar primata, como *Cebus* e *Alouatta* spp., e gaiolas para manutenção de saguis (*Callithrix* spp.) (à direita) localizado no CETAS de Lorena - São Paulo- 2010

- CETAS de SÃO VICENTE (UNIMONTE)

O CETAS - Refúgio Mata Atlântica Lello – UNIMONTE fica localizado na cidade de São Vicente, (Figura 19) região litorânea do estado de São Paulo e tem a função tratar e reabilitar animais selvagens feridos. Atendem principalmente os locais próximos a região e os animais encaminhados pelos órgãos fiscalizadores.



Fonte: google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 19 - Imagem aérea da Cidade de São Vicente, Litoral de São Paulo. O ícone vermelho marca a localização do CETAS UNIMONTE na cidade - São Paulo- 2010

- CETAS - PARQUE ECOLÓGICO DO TIETÊ (PET)

O Centro de Recepção de Animais Silvestres - CRAS – “Orlando Vilas Boas” do Parque Ecológico do Tietê (Figura 20) fica localizado em Guarulhos, na zona leste da região metropolitana de São Paulo e sua função é receber e destinar animais doados ou apreendidos pela Polícia Ambiental e pelo IBAMA/SP.

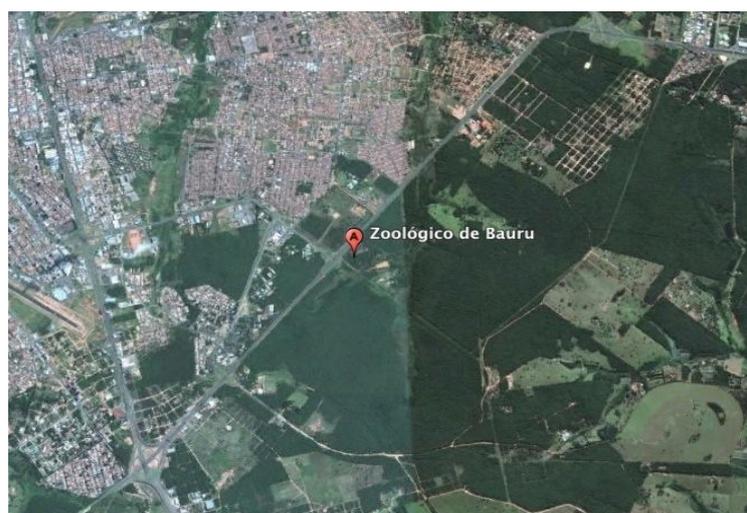


Fonte: google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 20 - Imagem aérea do Parque Ecológico do Tietê (PET), em Guarulhos, São Paulo, onde o CRAS está localizado - São Paulo- 2010

- PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU

O Parque Zoológico Municipal de Bauru, fica localizado na cidade de Bauru, no interior de São Paulo. Atualmente possui cerca de 880 animais de mais de 250 espécies diferentes entre mamíferos, aves répteis e peixes e está localizado próximo a cidade, região de cerrado (Figura 21).



Fonte: google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 21 - Imagem aérea da localização do Parque Zoológico Municipal de Bauru – São Paulo- 2011

4.1.1.2 Locais de colheita - In situ

- HORTO FLORESTAL DE BAURU

O Horto Florestal de Bauru, está localizado na região central da cidade de Bauru (Figura 22) é coordenado pelo Instituto Florestal (IF), em São Paulo. Neste local há presença de saguis híbridos (*Callithrix* spp.) que são considerados, na região, como espécies exóticas invasoras.



Fonte: google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 22 - Imagem da entrada do Horto Florestal de Bauru (à esquerda) e vista aérea da localização do Horto dentro da cidade de Bauru (à direita) – São Paulo- 2011

- PCH - SÃO JOAQUIM DA BARRA

A grande maioria do número de amostras deste trabalho é proveniente de primatas de vida livre resgatados pela equipe responsável de fauna da WLM (*Wildlife Management*), previamente a construção de uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH) (Figura 23 e 24) localizada entre os Municípios de São Joaquim da Barra e Guará, Região de Cerrado, no nordeste do estado de São Paulo. Nesta localidade há registros da ocorrência de *C. Penicillata* e do *A. caraya*.

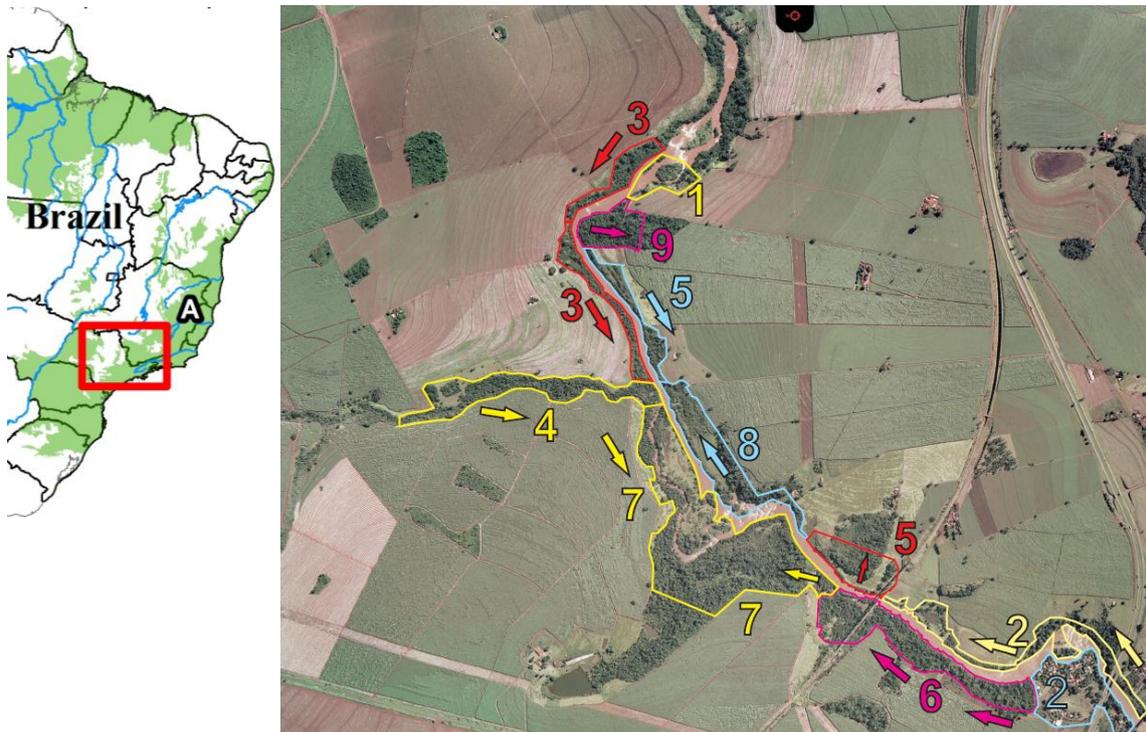


Foto: Celan, www.celan.com.br

Figura 23 - Localização da área de construção da PCH, entre os municípios de São Joaquim da Barra e Guará, nordeste do estado de São Paulo. A área diretamente afetada (ADA) foi dividida em 9 sub áreas, abrangendo os fragmentos de mata nas margens do rio Sapucaí-mirim. RA – Rodovia Anhanguera. – São Paulo – 2008 - 2010



Fonte: Celan, www.celan.com.br ; google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 24 - Área de construção da PCH Anhanguera, (a) área antes da construção do empreendimento. (b) área após a construção, evidenciando o alagamento na região. A seta branca representa a área obrigatória de reflorestamento.- São Paulo – 2008 - 2012

- PATROCÍNIO PAULISTA – Fazenda Sta. Cecília

Esta área (Figura 25) fica localizada em uma fazenda particular (Fazenda Sta. Cecília), próxima a Patrocínio Paulista, município ao nordeste do estado de São Paulo, região de Cerrado. O local, a princípio, foi escolhido pela equipe de fauna prestadora de serviço à da PCH Anhanguera para translocar alguns primatas provenientes do resgate de fauna da PCH. Devido ao fato desta área ter outras espécies de primatas nativos (*Cebus* spp.) optou-se por capturá-los para averiguar o perfil sanitário desta população. Desta forma, aproveitou o material colhido para o a execução do trabalho em tela.



Fonte: google Inc ©, 2011, Google Earth 5.1

Figura 25 – Imagem aérea, à direita, da localização da Fazenda Sta. Cecília (seta branca) em Patrocínio Paulista, bioma Cerrado, no Nordeste do estado de São Paulo. À foto da esquerda mostra a entrada da mata e a casa da fazenda em proximidade a mata - São Paulo – 2012

- RONDÔNIA - Município de Abunã

O município de Abunã, (Figura 26) fica em Rondônia, cerca de 200 km de Porto Velho (capital) sentido Bolívia. Esta região sofrerá impactos por conta da usina hidrelétrica que está sendo construída em Jirau/RO. A equipe do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), coordenada pelo Prof. Dr.

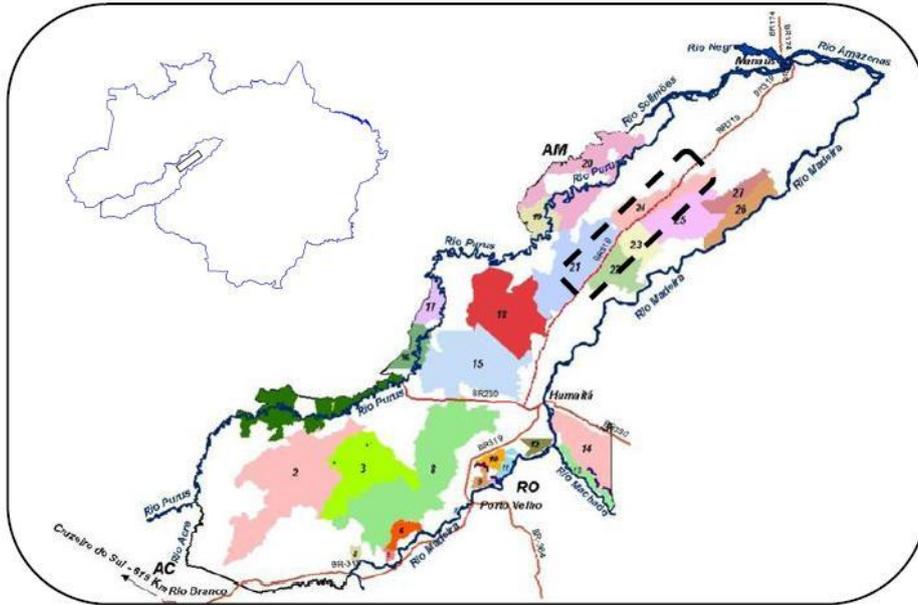
Luís Fábio Silveira, realiza um estudo de monitoramento da fauna no local. Desta forma, foi realizada uma parceria e acompanhou-se a equipe para obtenção de material biológico dos animais coletados.



Figura 26 – Localização geográfica da região de Abunã, Rondônia (B). À direita e ao centro, local de coleta dos primatas, região Amazônica preservada. No canto inferior, à direita, um exemplo de uma típica moradia da população local. Observar proximidade com a mata - Rondônia– 2010

- AMAZONAS - BR-319

Os animais foram coletados ao longo desta rodovia (Figura 27 e 28), mais especificamente a uma distância de 150 km de Manaus, devido ao estudo de taxonomia e levantamento de fauna presente nas áreas de impacto da BR-319, realizado pela *WildLife Conservation Society* (WCS-Brasil), sob coordenação do biólogo Fabio Hore, Da mesma forma que na localidade anterior, acompanhou-se esta equipe para colheita do material.



Mapa: Fabio Hore

Figura 27 – Localização geográfica da BR-319 (AM). Os pontos tracejados marca a área de coleta dos animais, ao longo da rodovia. As áreas coloridas representam as diversas unidades de conservação no qual a rodovia cruza - Amazonas – 2011



Figura 28 – Condição atual da BR-319 (à direita) e foto da vila de Igapó Açú, localizada próxima a área de coleta - Amazonas – 2011

4.2 Captura

A captura dos animais mantidos em cativeiro (*ex situ*) foi realizada por meio de contenção física, utilizando-se puçá e luva de raspa de couro, seguida de contenção química. Todos os procedimentos foram realizadas de acordo com as devidas licenças de captura, transporte e coleta de material biológico, fornecida pelos Órgãos Ambientais responsáveis (Documento de Remessa de Espécime do Museu de Zoologia de SP n° 03-2011; SISBIO n° 24319-3 e n°18861-3), e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP (n° 1617). Os animais *in situ*, provenientes da região Amazônica, foram coletados pelas instituições parceiras, devido aos trabalhos de taxonomia que os mesmos realizam e, sendo assim, após a colheita as carcaças foram encaminhada às respectivas coleções museológicas. A captura consistiu no abate do animal utilizando-se arma de fogo e, em seguida, procedeu-se a colheita de material biológico.

Nas regiões do estado de São Paulo, São Joaquim da Barra (local de construção da PCH), Patrocínio Paulista e Horto Florestal de Bauru, os animais foram capturados valendo-se gaiolas metálicas (tipo “Trampa” ou “Tomahawk”). Previamente à captura foi realizado um estudo prévio sobre a biologia, comportamento, deslocamento, local de captura e utilização do habitat por parte da população de primatas em estudo.

Primeiramente, os animais foram cevados (com frutas) e acostumados a entrar na armadilha (Figura 29) com a porta de entrada aberta, porém travadas. Quando o grupo já estava habituado a entrar para buscar o alimento, acionava-se a armadilha e em seguida realizava-se a imobilização.

Foram utilizadas dois tipos de armadilhas. Uma é era a armadilha tipo “Trampa”, que consiste em uma gaiola com uma corda para o controle da porta, que era fechada quando os animais fossem avistados se alimentando dentro da armadilha. A outra gaiola é a tipo “Tomahawk”, que possui o mesmo sistema, porém, ao pisar em uma pequena plataforma que está dentro da gaiola, a porta fecha sozinha, prendendo o primata no interior da mesma.

Alguns animais, como por exemplo, os *A. caraya*, foram capturados utilizando-se pistola projetora de dardo anestésico diretamente no indivíduo quando este estava próximo à ceva.

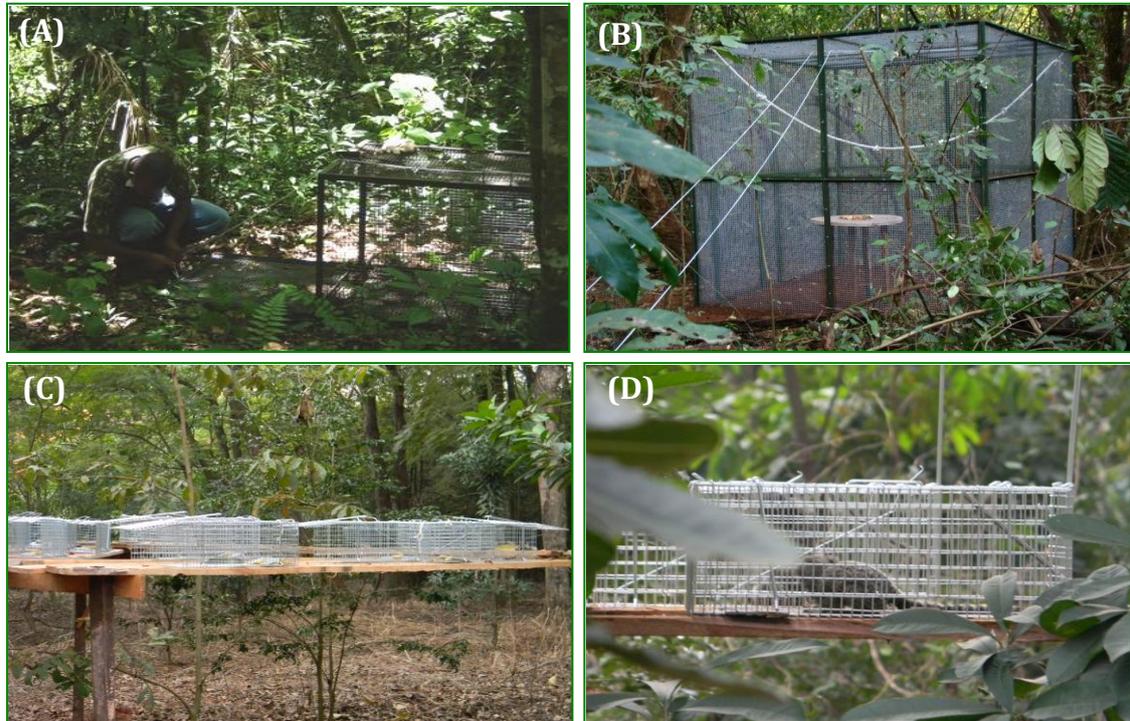


Foto: Renata C. F dos Santos

Figura 29 – Armadilhas metálicas utilizadas para captura de PNT. (A) e (B) representam armadilhas tipo “Trampa”. (C) e (D) armadilhas tipo “Tomahawk” - São Paulo – 2009-2011

4.3 Contenção química

Para os animais provenientes de cativeiro, os protocolos anestésicos adotados foram aqueles preconizados pelos técnicos do local, após avaliação do estado geral do animal por parte do médico veterinário da instituição. Todo o procedimento foram previamente discutido entre a equipe e a imobilização foi efetuada visando o mínimo estresse possível, como por exemplo, a cobertura dos olhos do animal.

Geralmente, foram realizados os seguintes protocolos de contenção: aplicação das drogas em uma única injeção, na mesma seringa, por via intramuscular após a adequada contenção física. Os fármacos utilizados foram a

associação de cloridrato de quetamina (10,0 a 15,0 mg/kg) ao midazolam (0,3 a 0,5 mg/kg) ou a tiletamina associada ao zolazepan (Zoletil®). A anestesia foi monitorada a cada 10 minutos e os animais ficaram em observação, sob responsabilidade de um médico veterinário, até a recuperação completa do plano anestésico.

4.4 Exame clínico

Após a obtenção do adequado plano anestésico, os animais foram submetidos a exame clínico, biometria e pesagem. A biometria foi realizada com fita métrica e incluiu o comprimento corpóreo (da extremidade rostral do mento com a cabeça voltada para trás até a articulação da primeira vértebra coccígea), o perímetro torácico e o perímetro abdominal.

Os animais foram avaliados clinicamente, por meio de inspeção física direta e indireta como, por exemplo, auscultação cardiopulmonar, hidratação, palpação abdominal e de linfonodos, aferição da temperatura e coloração das mucosas. Em seguida, o material foi colhido por veterinários ou por membros da equipe treinados e supervisionados por um veterinário.

4.5 Material biológico

Foram colhidas amostras de sangue, biopsias de pele e punção de linfonodo, somente quando este estava perceptível e aumentado de volume à palpação (Figuras 30 e 31). Após a correta assepsia da região, o sangue foi colhido, preferencialmente da veia femoral, com agulha 25 x 7 ou 30 x 8,5 por meio de uma seringa de 1 ou 5 mL e transferidos para tubos estéreis com anticoagulante (EDTA), tubos sem anticoagulante ou criotubos.

O volume sanguíneo colhido foi de 0,5 a 5 mL e este foi definido baseado no peso dos animais. O sangue foi dividido em alíquotas com volume necessário

para a realização dos diferentes exames e testes. Uma gota de sangue periférico foi retirada do coxim plantar do membro pélvico, utilizando-se uma agulha fina para corte da pele. Em seguida, foram realizados esfregaços e a gota espessa, aproximando-se a gota de sangue à lamina de vidro. Em seguida, no caso da gota espessa, espalhou-se o sangue até atingir formato retangular e espessura do filme de sangue desejada.

Os materiais foram transportados para os laboratórios nos quais foram processados. Os tubos contendo sangue foram centrifugados e soro, plasma, papa leucocitária (*buffy coat*) e a papa de hemácias foram armazenados em microtubos e, em seguida, congelados em nitrogênio líquido ou freezer -80°C , até o momento das análises laboratoriais.

Biópsia de pele (03 mm de diâmetro) foi realizada no terço médio da cauda do animal, colocada em formalina 10% e mantida em temperatura ambiente para realização de exame histopatológico e imunoistoquímico. Após a realização da biópsia, foi realizado curativo com cola cirúrgica ou sutura com fio absorvível no local da intervenção.

Ao ser detectada alguma linfadenomegalia durante o exame clínico, realizou-se a punção do linfonodo comprometido e o material aspirado foi armazenado em microtubo e congelado.

Para animais nos quais o método de captura foi o abate, procurou-se colher as amostras de sangue o mais rápido possível. Em seguida, o animal era encaminhado à base de trabalho, para então realizar a colheita da biópsia de pele e punção de linfonodo, se este estivesse perceptível e aumentado de volume à palpação.

O sangue foi colhido da veia femoral ou diretamente do coração, com agulha 25 x 7 ou 30 x 8,5 por meio de uma seringa de 1 ou 5 mL e transferidos para tubos estéreis da mesma forma acima descrita.

Após cada colheita, todos os materiais biológicos foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM) do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Durante o transporte

estes foram mantidos em caixas de isopor com gelo ou em galões de nitrogênio líquido.



Figura 30 – À esquerda, colheita de sangue venoso, veia femoral. No centro, realização de esfregaço sanguíneo. À direita, punção de linfonodo em sagui (*Callithrix* spp.) proveniente do DEPAVE-CRAS - São Paulo – 2008 - 2010



Figura 31 – Colheita de material biológico a campo - Amazônia – 2011

Sumariamente, a Figura 32 apresenta o fluxo e encaminhamento das amostras biológicas colhidas:

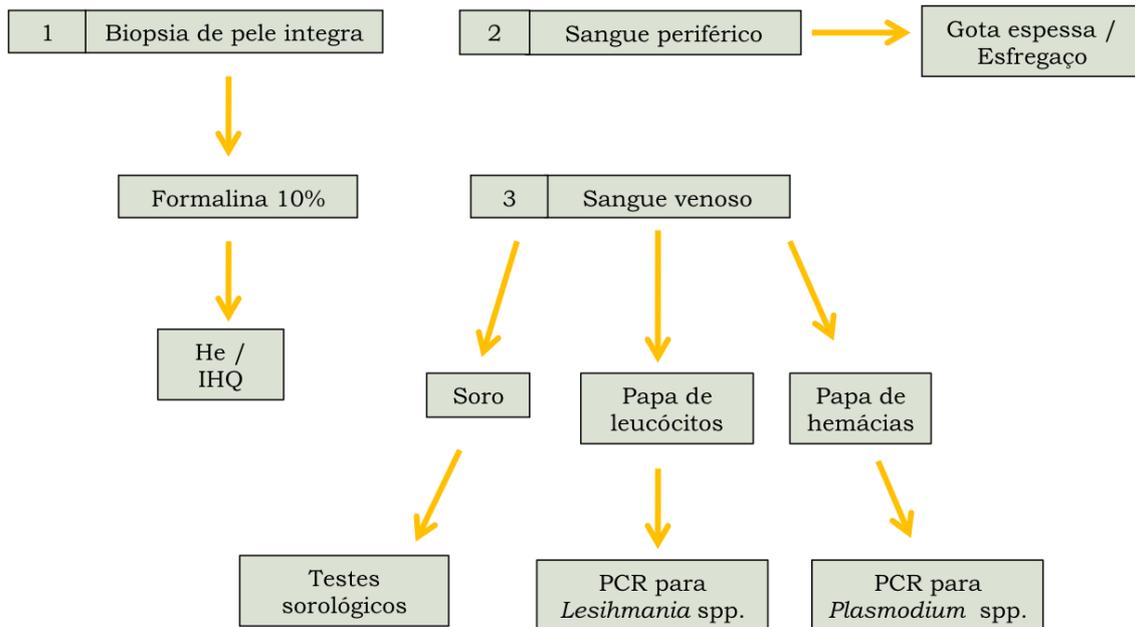


Figura 32 – Fluxograma do material biológico colhidos e os respectivos exames realizados - São Paulo – 2008 - 2012

4.6 Processamento e análises laboratoriais

4.6.1 Pesquisa de *Plasmodium* spp.

A pesquisa do plasmódio foi realizada no Núcleo de Estudos em Malária do Núcleo de Endemias da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical, sob a supervisão de Karin Kirchgatter, Silvia Maria Fátima Di Santi e Maria Carmen Arroyo Sanchez.

4.6.1.1 Diagnóstico parasitológico pela gota espessa

As lâminas de gota espessa foram coradas com azul de metileno e Giemsa, segundo a técnica de Walker (BRASIL, 2005), que brevemente consiste

em: mergulhar as lâminas em uma solução de azul de metileno por alguns segundos e em seguida mergulhar rapidamente em água destilada. Rapidamente, as lâminas são colocadas em uma placa para coloração e uma solução de Giemsa na proporção de uma gota de corante para 1 mL de água tamponada é depositada, deixando-se corar por 7 minutos. Após este período, retira-se o excesso de corante em água destilada e espera-se secar em temperatura ambiente.

Após a coloração as lâminas foram observadas em, pelo menos 200 campos microscópicos em aumento de 1000x com objetivas de 100x sob imersão em óleo para definição do resultado de cada lâmina (TRAPE, 1985). Cada lâmina foi examinada por, pelo menos, duas pessoas treinadas e habilitadas.

4.6.1.2 Ensaio Imuno Enzimático – EIE / ELISA

O Ensaio Imuno Enzimático, foi realizado utilizando-se a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) que teve por objetivo a pesquisa de anticorpos IgG anti-*P. falciparum* (*Pf*) e anti-*P. vivax* (*Pv*). Desta forma, foram utilizados como antígenos o extrato antigênico *Pf*-Zw e antígenos recombinantes *His₆-PvMSP1₁₉*, respectivamente (SANCHEZ et al., 1993; KUDÓ, 2006).

- Padronização

Previamente à execução do teste propriamente dito, foi preciso realizar a padronização do mesmo, pois esta técnica está padronizada para a utilização com amostras humanas.

Esta padronização consistiu em se realizar uma titulação em bloco, ou seja, se testar diferentes diluições dos soros controles (1/12,5; 1/25; 1/50; 1/100; 1/200; 1/400; 1/800) com diferentes diluições do conjugado (1:40.000, 1:80.000 e 1:100.000). Além disso, as reações foram testadas com dois conjugados

diferentes para efeito de comparação: Proteína A-peroxidase (Sigma[®]) e anticorpo específico ligado à peroxidase (Anti-IgG de Primata, A140-102P - Bethyl[®]).

Para realizar uma titulação em bloco são necessários soro sabidamente positivos e negativos para que se possa estabelecer o *cut-off* da reação. Desta forma, os controles negativos da reação foram provenientes de três primatas do gênero *Cebus* sp. oriundos do biotério do Centro Nacional de Primatas (CENP), em Ananindeua/PA, sadios e sem contato prévio com o patógeno. Devido ao fato de não obtermos soros de primatas não humanos sabidamente infectados com plasmódio, optou-se por realizar a padronização utilizando-se soros humanos positivos presentes no banco de soros do laboratório parceiro.

As escolhas das diluições dos soros e do conjugado foram feitas avaliando os resultados que melhor discriminaram os soros controles positivos dos negativos.

A mesma análise foi feita utilizando-se antígeno de *Pv*, com a diferença da escolha da diluição dos soros (1/100, 1/200 e 1/400).

- Determinação do limiar de reatividade (*cut-off*) e índice de reatividade (IR)

Após a determinação da diluição das amostras e dos conjugados, foram testadas amostras de humanos sadios, sem contato com malária (52 com *Pf* e 48 com *Pv*) para estabelecer a linha de corte do teste (*cut-off*). Este foi calculado para *Pv* e *Pf*, somando-se as médias das densidades ópticas (DO) das amostras mais 3 desvios padrões.

O índice de reatividade (IR) foi calculado tendo como base estes valores de corte, sendo: média das DO da amostra/*cut-off*, que para o *Pf*, com ambos os conjugados, foi de 0,09 e para o *Pv* foi de 0,145 utilizando-se a proteína-A e 0,110 com o conjugado Anti-IgG de Primatas.

- Teste das amostras

Desta forma, todas as amostras foram testadas nas condições padronizadas e de acordo com o protocolo descrito no Apêndice K.

4.6.1.3 *Imunofluorescência indireta (IFI)*

A IFI foi realizada conforme a metodologia descrita por Ferreira e Sanchez, 1988. Foram empregadas lâminas com antígenos de *Pf* obtidos de cultura *in vitro* com predominância de esquizontes obtidos por concentração com Plasmagel e de *Pv* e *P. malariae (Pm)* obtidos de sangue de pacientes primo-infectados. As amostras foram diluídas para a pesquisa de anticorpos IgG e a leitura foi feita em microscópio de fluorescência com aumento de 250x. Vale ressaltar que devido ao fato de pacientes infectados por *Pm* serem raros, optou-se por testar somente as amostras que haviam sido positivas no ELISA e/ou na IFI para *Pf* e *Pv*.

- Padronização

Da mesma forma que para o ELISA, foi preciso estabelecer a melhor diluição do soro e do conjugado. .

Sendo assim, soros humanos foram usados como controles positivos e negativos e testados nas diluições de 1:20 e 1:40 e o conjugado anti-IgG de primata ligado a FITC (anti-IgG de Primata, A140-102F - Bethyl[®]) testado nas diluições de 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

- Teste das amostras

Desta forma, todas as amostras foram testadas nas condições padronizadas e de acordo com o protocolo descrito no Apêndice L.

4.6.1.4 Teste imunocromatográfico

Além dos testes sorológicos acima descritos, as amostras foram testadas para pesquisa de anticorpo anti-*Plasmodium* (*Pf/Pv*), utilizando-se um teste imunocromatográfico, para fim de comparação.

O teste escolhido foi o *SD Bioline* Malária *Pf/Pv* (Standard Diagnostics, Inc.), que é um teste rápido utilizado para detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos contra *Pf* e *Pv* com antígenos de captura recombinantes, MSP, para ambas espécies do plasmódio.

O protocolo consiste em pingar 10 μ L da amostra (soro, plasma ou sangue total) no local indicado pelo fabricante e acrescentar 3 a 4 gotas do reagente fornecido no Kit. Após 10 a 20 minutos pode-se realizar a leitura, de acordo com o fabricante.

4.6.1.5 Diagnóstico molecular

- Extração de DNA genômico

As papas de hemácia foram utilizadas para extrair o DNA genômico. As extrações foram realizadas por meio da utilização de kit comercial *Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare®) conforme instruções do fabricante.

O DNA extraído foi eluído em 100 μL e armazenado a -20°C até o momento da realização da *nested* PCR.

Para amostras contendo um volume maior que 200 μL , foi realizada uma lise prévia das hemácias, utilizando-se saponina a 1%. Desta forma, o material foi concentrado a 200 μL e pode-se utilizar a totalidade da amostra colhida na extração com o kit Illustra. Através deste método, pretende-se maximizar as chances de obtenção do DNA do parasita em questão, visto que as parasitemias encontradas em símios costumam ser extremamente baixas.

- Reação da cadeia da polimerase (PCR)

Em todas as amostras foi realizada uma *nested* PCR para uma triagem preliminar quanto à presença de DNA de *Plasmodium*. O gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (*ssuRNA*) ou 18S foi utilizado como alvo. Oligonucleotídeos gênero-específicos foram empregados tanto na primeira como na segunda reação, utilizando uma metodologia modificada de Singh et al. (1999) (SANTOS et al., 2009). Nesta modificação, um fragmento de aproximadamente 600 pb é gerado na primeira reação, através da utilização dos oligonucleotídeos rPLU1 e rPLU6R. A segunda reação foi realizada como no protocolo original, com os oligonucleotídeos rPLU3 e rPLU4 (Figura 33), resultando em um fragmento de aproximadamente 240 pb.

As condições utilizadas na reação da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 25 ciclos a 95°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a segunda reação foram utilizadas as mesmas condições exceto a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos (64°C) e o número de ciclos (30).

Vale ressaltar que todas as amostras foram testadas em duplicata, em experimentos independentes. Em todas as reações foram acrescentados controles positivos (DNA de paciente infectado) e controles negativos (água ultrapura) que se apresentaram conforme o esperado, indicando que o teste foi

realizado adequadamente. Os amplificadores foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X, juntamente com 1 µL de GelRed (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium®). Após a corrida, os produtos foram visualizados e fotodocumentados.

1° REAÇÃO

rPLU1: 5' TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA 3'

rPLU6R: 5' CGT TTT AAC TGC AAC AAT TTT AA 3'

2° REAÇÃO

rPLU3: 5' TTT TTA TAA GGA TAA CTA CGG AAA AGC TGT 3'

rPLU4: 5' TAC CCG TCA TAG CCA TGT TAG GCC AAT ACC 3'

Figura 33 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na *nested* PCR que tem como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (*SSUrRNA*) do *Plasmodium* spp - São Paulo – 2012

Em seguida, com o intuito de realizar a identificação do parasita, procedeu-se outra *nested* PCR (somente com as amostras positivas), utilizando como alvo o gene mitocondrial citocromo b (*cytb*). Esta *nested* PCR foi realizada conforme previamente descrito por Perkins, Schall (2002), utilizando os oligonucleotídeos DW2 e DW4 (Figura 34) gerando um fragmento de aproximadamente 1 kb. As condições utilizadas nesta primeira reação da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 1,5 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A segunda reação foi realizada com os oligonucleotídeos DW1 e DW3 (Figura 34), resultando em um fragmento de aproximadamente 600 pb. Foram utilizadas as mesmas condições exceto a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos (50°C) e o número de ciclos (40). Procedeu-se da mesma forma que para a PCR de 18S, quanto às condições de repetibilidade das amostras e controles da reação.

1° REAÇÃO
DW2 : 5' TAA TGC CTA GAC GTA TTC CTG ATT ATC CAG 3'
DW4: 5' TGT TT'G CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG 3'
2° REAÇÃO
DW1: 5' TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG 3'
DW3: 5' TGC TGT ATC ATA CCC TAA AG 3'

Figura 34 - Sequências de oligonucleotídeos usados na *nested* PCR que tem como alvo o gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) do *Plasmodium* spp - São Paulo – 2012

Em seguida, os amplificadores foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X, juntamente com 1 µL de *GelRed* (*GelRed*TM Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in Water, Biotium®). Após a corrida, os produtos foram visualizados e fotodocumentados.

O fragmento amplificado foi purificado do gel e sequenciado diretamente com os oligonucleotídeos da PCR, através da utilização do kit Big Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit em Sequenciador Automático ABI (ABI, USA). As sequências foram identificadas por comparação com o banco de dados de sequências de DNA *GenBank* (National Center for Biotechnology Information, disponível on-line: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) através da utilização do programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). Identificação positiva foi encontrada quando sequências equivalentes exatas ou quase exatas (>95%) foram obtidas.

4.6.2. Pesquisa de *Leishmania* spp.

A pesquisa de *Leishmania* foi realizada no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob a supervisão da Dra. Márcia Dalastra Laurenti e da Dra. Vania Ribeiro da Matta.

4.6.2.1 Ensaio Imuno Enzimático – EIE / ELISA

O Ensaio Imuno Enzimático, foi realizado utilizando-se a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) e para tanto, inicialmente, foi necessário o preparo do antígeno bruto utilizado para sensibilizar as placas neste teste. Para tanto, promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram isoladas a partir de lesão cutânea de camundongos cronicamente infectado (CEPA EPM - MHOM/BR/73/M2269), em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 10 µg/ml de gentamicina e 100 UI/ml de penicilina.

Após 2-3 passagens em cultura, promastigotas em fase estacionária de cultivo (Figura 35) foram lavadas 3 vezes em PBS estéril, 1620 g (Eppendorf® 5804R) por 10 minutos, e estocadas em freezer -80°C. Para o preparo do antígeno, os *pellets* contendo as formas promastigotas do parasita foram congelados em nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente por 3 vezes consecutivas e então sonificado em PBS, banho de gelo, 1 ciclo de 1 minuto em potência 4 (Sorvall, USA). A suspensão foi alíquotada e estocada em freezer -80°C, sendo uma alíquota separada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

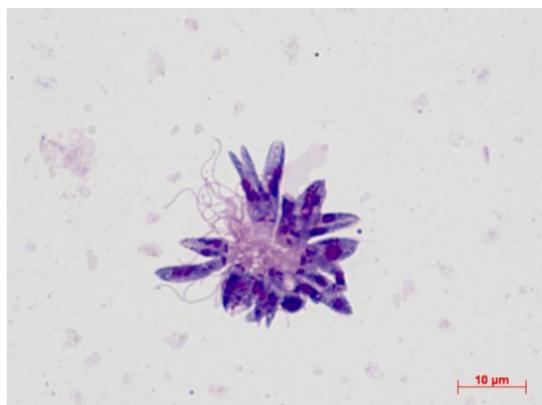


Figura 35 - Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* oriundas da cultura descrita acima, em fase estacionária de crescimento (Giemsa - 100X) – São Paulo - 2010

- Padronização

Previamente a execução do teste foi preciso realizar a padronização do mesmo. Desta forma, esta foi executada de forma similar ao descrito acima para o diagnóstico de *Plasmodium* sp., porém com algumas modificações.

Sendo assim, foi realizada a titulação em bloco, que consiste em testar diferentes concentrações do antígeno, com diferentes diluições dos soros controles e dos conjugados, em uma mesma placa.

De acordo com literatura disponível (CAMARGO et al., 1973) e a experiência do laboratório (LIM 50/ FMUSP), optamos por testar as concentrações de 10 e 20 µg/ml do antígeno. Quanto a diluição dos soros controles, primeiramente estes foram testados nas diluições de 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320, e após a observação de melhores resultados entre as diluições de 1:160 e 1:320, optamos por testar as diluições de 1:100; 1:200 e 1:400 no intuito de facilitar a padronização.

Além disso, a título de comparação, utilizamos como conjugado tanto a Proteína A (Sigma[®]) quanto o anticorpo específico (Anti-IgG de Primata *Rhesus*, A140-102P Bethyl[®]) ligados à peroxidase, nas diluições de 1:80000 e 1:100000.

Os soros controles positivos utilizados foram provenientes de primatas do gênero *Cebus* sp., oriundos do biotério do Centro Nacional de Primatas (CENP), em Ananindeua/PA. Estes animais, foram previamente inoculados com 10⁹ formas promastigotas de *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Leishmania) chagasi*, pela via intradérmica. Após três meses de infecção os animais foram anestesiados para colheita de sangue e avaliação clínica. O sangue foi centrifugado, e o soro foi estocado a -20°C. Para o controle negativo da reação foi coletado sangue de três *Cebus* sp., sadios e sem contato prévio com o patógeno. Estes soros foram utilizados para a padronização do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*.

A escolha da diluição foi baseada nas observações das densidades ópticas (DO) dos controles positivos e negativos, ou seja, escolheu-se a diluição que

melhor discrimina os positivos dos negativos. Para isto foi realizado o calculo do *cut-off* da reação, que é feito obtendo-se a média das densidade ópticas dos controles negativos mais 3 desvios padrões.

O índice de reatividade (IR) foi calculado tendo como base os valores de corte, ou seja o *cut-off* do dia da reação.

- Teste das amostras

Após a padronização e o estabelecimentos das diluições, as amostras (soros) foram testadas no ensaio imunoenzimático de acordo com o protocolo descrito no Apêndice M.

4.6.2.2 *Imunofluorescência indireta (IFI)*

A IFI foi realizada conforme o protocolo descrito em Vides et al. (2011), empregando-se os antígenos promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* que foram isoladas a partir de lesão cutânea de camundongos cronicamente infectado (CEPA EPM - MHOM/BR/73/M2269), em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 10 µg/mL de gentamicina e 100 UI/mL de penicilina.

Após duas a três passagens em cultura, as formas promastigotas em fase estacionária de cultivo foram então lavadas três vezes em solução salina tamponada (PBS) estéril, através de centrifugação a 1620g à 4°C. O precipitado no fundo do tubo foi ressuspendido em solução de formalina tamponada 2% e mantida à 4°C por 24 horas. Após a fixação das formas promastigotas, estas foram novamente lavadas em solução salina tamponada, e posteriormente contadas em câmara de Neubauer. A concentração de parasitas foi ajustada para 2×10^6 promastigotas/mL e aplicou-se 20µL por poço nas lâminas de

imunofluorescência. Estas lâminas foram armazenadas à -20°C até o momento da execução do teste.

- Padronização

Entretanto, da mesma forma que para o ELISA, foi preciso estabelecer a melhor diluição do soro a fins de evitar falso positivo e/ou falso negativo. Sendo assim, os mesmos soros controles, usados para padronizar o ELISA, foram utilizados para testar as diferentes diluições (1:20, 1:40, 1:80, 1:160), enquanto o conjugado anti-IgG de primata ligado a FITC (Anti-IgG de Primata, A140-102F - Bethyl[®]) foi usado em uma única diluição (1:100).

- Teste das amostras

Após a padronização, todas as amostras foram testadas nas condições estabelecidas e avaliadas em microscópio de fluorescência. Foram incluídos controles positivos e negativos em cada reação. Em seguida, as amostras positivas foram tituladas nas seguintes diluições: 1:80, 1:160, 1:320. O protocolo da IFI encontra-se descrito no Apêndice O.

4.6.2.3 *Diagnóstico imunoistoquímico*

- Histologia e reação de imunoistoquímica (IHQ)

O processamento histopatológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e no Laboratório de Anatomia Patológica do

Hospital das Clínicas. Do material fixado, após processado de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina, obtiveram-se cortes de 5 µm de espessura, que foram então corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

Em seguida, o teste de imunistoquímica foi realizado a partir dos blocos de parafina da biópsia de pele e realizado de acordo com o protocolo descrito por Moreira et al. (2007), com modificações, conforme consta no Apêndice N.

4.6.2.4 *Diagnóstico molecular*

- Extração de DNA

As papas de leucócito e os materiais provenientes do linfonodo foram utilizados como amostra para extrair o DNA. As extrações foram realizadas por meio da utilização de kit comercial Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare®) conforme estabelecido pelo fabricante. No caso das amostras de linfonodo, como havia pouco material devido ao método de coleta (punção aspirativa), optou-se por diluir as mesmas em PBS estéril até atingir o volume de 200 µL, que é o preconizado pelo fabricante. No final da reação, o DNA extraído foi eluído em 100 µL e armazenado a -20°C até o momento da execução da PCR.

Após extração, o DNA foi submetido à análise por espectrofotometria para quantificação do ácido nucléico e avaliação da relação 260/280 de cada amostra (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific®). Além disso, alguns produtos da extração foram testados em gel de agarose a 1% para averiguação da integridade do DNA. Todas as amostras obtiveram leitura com quociente de DO260 e DO280 entre 1,5 e 2, considerados com pureza adequada para análise, além de se mostrarem íntegras após visualização do gel de agarose 1%.

Além disso, todas as amostras que tiveram resultados negativos na PCR foram testadas para uma nova PCR convencional, porém, utilizando-se como alvo

o gene da β -actina. Este alvo está presente em todos os mamíferos e a sua amplificação indica uma adequada extração de DNA, evitando, desta forma, a possibilidade de haver falsos negativos. As condições e o protocolo utilizado foram feitos de conforme descrito por Francino et al.(2006).

- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Visando a obtenção das máximas sensibilidade e especificidade na detecção de *Leishmania* spp. nas amostras biológicas, escolheu-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-RFLP), dentre os possíveis métodos de detecção do parasito.

O alvo a ser amplificado foi a sequência conservada de 120 pb encontrada no DNA dos minicírculos do cinetoplasto de *Leishmania* sp., com cerca de 10 mil cópias por parasito. Com isso, utilizou-se os *primers* (iniciadores) **150 forward**: 5' GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (C/G)CG AA 3' e **152 reverse**: 5' (C/G)(C/G)(C/G) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C 3', que flanqueiam esta região e que já foram utilizados previamente por diferentes pesquisadores (DEGRAVE ET AL., 1994; PASSOS, ET AL., 1999; VOLPINI ET AL., 2004; QUARESMA ET AL., 2009).

As condições iniciais testadas seguiram as mesmas descritas em Quaresma et al.(2009), para a PCR convencional, que foram: 10,0 μ L de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega®), 1,0 μ L de cada *primer* (10 mM), 6,0 μ L de água DNAase free, e 2 μ L do DNA. Controles positivos contendo DNA extraído do parasito e de amostras clínicas (animais de laboratório infectados) foram incluídos em toda reação, assim como controles negativos (água ultrapura) em duplicata. As condições iniciais de ciclagem adotadas para o estabelecimento da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final à 72°C por 10 minutos.

Entretanto, devido ao encontro de bandas espúrias (Figura 36) e inconsistências nos resultados, optou-se por iniciar uma serie de padronizações para o estabelecimento de uma adequada PCR.

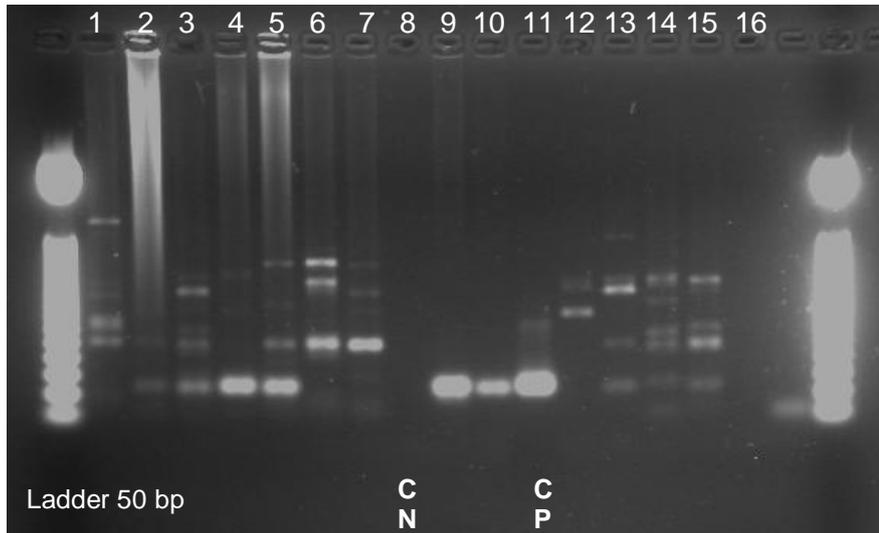


Figura 36 - PCR de amostras (1 a 16), selecionadas de sangue de primata. Gel de agarose 1,5%. Observar as bandas espúrias. CN = controle negativa, CP= controle positivo - São Paulo – 2011

- Padronização

Inicialmente optou-se por aumentar número de ciclos para 40, baseado na possibilidade de haver baixas parasitemias e de acordo com o descrito em outro trabalho (COURA-VITAL, et al., 2011).

Em seguida, mudou-se a quantidade de amostra utilizada na reação. Esta foi testada com diferentes quantidade de DNA (2 μ L, 3 μ L e 4 μ L), permanecendo com os 40 ciclos anteriormente utilizado.

Testou-se o gradiente de temperatura de anelamento dos primers, no qual foi utilizou-se 10 amostras provenientes de cultura (*L. chagasi*, *L. amazonensis*) com a mesma reação, porém com a temperatura de anelamento variando de 54 °C a 64 °C; ou seja, uma temperatura diferente para cada amostra.

Optou-se em seguida, por acrescentar à reação de PCR alguns aditivos (CHEVET, et al., 1995; KREADER, 1996). Foram testados separadamente: 2 µL DMSO (Dimetil Sulfóxido) a 10%; 2 µL de BSA (Albumina Sérica Bovina) (0,8 µg/µL); 2 µL de TMAC (Cloroeto de tetrametilamônio), concentração final de 50 mM (Sigma ®).

Além destes passos de otimização da PCR, optou-se por retirar das condições de ciclagem o passo de extensão final (72 C por, 10 minutos), diminuindo desta forma a amplificação de produtos maiores que o desejado (120 pb).

Realizou-se, ainda diluições seriadas do DNA provenientes de cultura para determinar sensibilidade analítica do teste. Para tanto, diluições na base 10 (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7) foram testadas a partir do DNA proveniente de culturas de *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/ 72/cepa 46).

- Teste das amostras

Com as condições padronizadas, todas as amostras foram testadas na PCR utilizando-se o alvo gênero-específico (KDNA da *Leishmania*).

- Digestão do produto de PCR- RFLP

O produto de PCR dos animais positivos foi submetido à digestão com a enzima *Hae* III (PCR-RFLP), baseando-se em Volpini et al. (2004), na tentativa de identificar a espécie ou o subgênero de *Leishmania* na amostra. Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose a 2,5%.

- Padronização

Após determinação do adequado tempo de digestão e volume de produto a ser digerido, estabeleceu-se o padrão de restrição de cepas existentes no laboratório (LIM-50).

Para tanto, foi realizado a PCR– RFLP de: *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), *L. (L.) braziliensis* (MHOM/BR/1999/M17593-PARA,Brasil), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408-PARA,Brasil), *L. (V.) guyanensis* (M4147-IEC-PARA,Brasil), *L. (V.) naiffi* (M5533-IEC-PARA,Brasil), *L. (V.) lindenberg* (M15733-IEC-PARA,Brasil) *L. (V.) lainsoni* (M6426-IEC-PARA,Brasil).

O perfil dos fragmentos gerados com cada espécie foi adotado como padrão para comparar as amostras clínicas.

Resumidamente, 15 µL do produto da PCR, foi digerido, após incubação por 1 horas a 37 °C seguido de 10 minutos a 80 °C, por 1 µL da enzima *Hae III* em seu tampão de uso 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água ultrapura, totalizando 20 µL. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 2,5%. A corrida eletroforética foi realizada a 70 volts, por 4 horas, em tampão TAE 1x (Tris, Acetato, EDTA).

- Teste das amostras

Após a obtenção dos padrões das cepas em condições padronizadas, todas as amostras positivas foram testadas por PCR-RFLP, após amplificação do alvo gênero-específico kDNA de *Leishmania*.

4.6.2.5 Pesquisa de *Trypanosoma* spp.

Considerando que nos ensaios sorológicos para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* podem ocorrer reações cruzadas com outras enfermidades, principalmente aquelas causadas por outros trypanosomatídeos (LAURENTI, 2010), investigou-se a possibilidade de infecções concomitantes através da avaliação dos esfregaços sanguíneos quanto a presença das formas tripomastigotas de *Trypanosoma* spp.

Para tanto, as lâminas foram coradas de acordo com o seguinte protocolo (BRASIL, 2005): as lâminas foram fixadas com álcool metílico por dois minutos, e após a secagem foram coradas por 15 minutos com Giemsa na proporção de duas gotas deste corante para 1 ml de água tamponada. Em seguida, as lâminas foram enxaguadas em água corrente e secas a temperatura ambiente até o momento da leitura em microscópio óptico.

Além disso, os soros positivos no ELISA para anticorpo anti-*Leishmania* foram testados pela reação sorológica de *immunoblotting* com antígenos de secreção e excreção de formas tripomastigota (TESA-blot), por ser este um teste de referência para o agente (*T. cruzi*). Este teste foi realizado no Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Investigação Médica de Protozoologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) segundo Umezawa et al. (1996). O seguinte protocolo foi utilizado:

- 1) O antígeno TESA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 5 a 7% e após sua separação, transferido para uma membrana de nitrocelulose com porosidade de 0,45 μm .
- 2) O soro dos primatas foi diluído a 1:100 em PBST e leite desnatado a 1% e incubado por duas horas a temperatura ambiente. Os anticorpos foram detectados pela adição de anticorpo específico ligado a peroxidase (Anti-IgG de Primata, A140-102P - Bethyl[®]), diluído a 1:10.000 em PBST e leite desnatado a 1% por duas horas à temperatura ambiente.
- 3) Os imune-complexos foram visualizados pela adição de 500 μL de uma solução reveladora (6mg de 4-cloro-naphthol, 2 mL de metanol, 10 mL de PBS e 10 μL de H₂O₂).
- 4) A reação foi interrompida por adição de água destilada após o aparecimento das bandas. As membranas foram então lavadas em água destilada e secas entre dois papéis de filtro.

5. RESULTADOS

5.1 Animais & condição clínica no momento da colheita

5.1.1 *Ex situ*

Foram colhidas amostras de PNT de diferentes gêneros, em 5 locais de cativeiros diferentes, no estado de São Paulo. Ao todo foram amostrados 71 primatas *ex situ*, sendo que destes, 46,5% (33/71) eram machos e 53,5% (38/71) fêmeas. Além disso, 87,3% (62/71) dos animais eram adultos, 8,4% (6/71) juvenis e 4,2% (3/71) filhotes (Quadro 3).

Do total de PNT amostrados, 70,0% (50/71) pertenciam a família Cebidae, 24% (17/71) à Atelidae e 6,0% (4/71) à Pitheciidae (Gráfico 1).

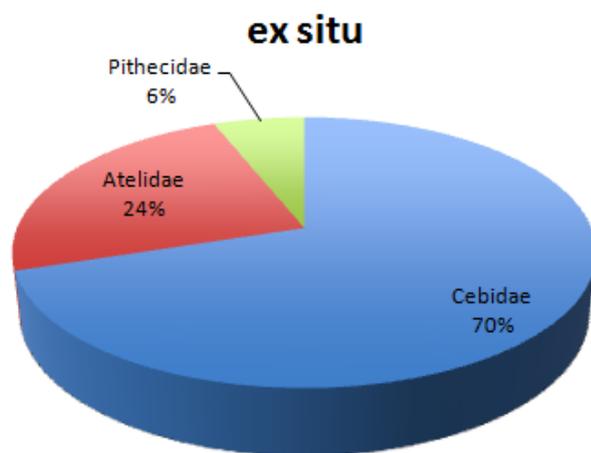


Gráfico 1 - Distribuição dos primatas neotropicais *ex situ* amostrados em função da classificação taxonômica, segundo Perelman, et al. (2011) - São Paulo – 2008 - 2012

Nome científico	Gênero	Faixa etária	Total
<i>Alouatta fusca</i>	3 M	3 A	3
<i>Alouatta belzebul</i>	1 F	1 A	1
<i>Alouatta caraya</i>	1 F	1 A	1
<i>Alouatta clamitans</i>	1 M	1 A	1
<i>Ateles chamek</i>	1 M	1 J	1
<i>Ateles paniscus</i>	2 M / 4 F	5 A / 1 J	6
<i>Brachyteles arachnoides</i>	1M	1 F	1
<i>Callicebus nigrifrons</i>	2F	2 A	2
<i>Callicebus personatus</i>	1 M / 1 F	2J	2
<i>Callithrix jacchus</i>	5 M / 3 F	8 A	8
<i>Callithrix penicillata</i>	12 M / 14 F	24 A / 2 F	26
<i>Callithrix spp.</i>	4 M / 6 F	10 A	10
<i>Cebus spp.</i>	1 M / 5 F	6 A	6
<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	2 M	1 A / 1J	2
<i>Lagothrix poeppigii</i>	1 F	1 J	1
Total	33 M / 38 F	62 A / 6 J / 3 F	71

Quadro 3 - Distribuição dos PNT amostrados de acordo com a espécie, gênero e faixa etária. M=macho, F=fêmea; A=adulto; J=juvenil e F=filhote – São Paulo/Amazônia – 2008- 2011

Dos 71 animais, 48% (34/71) apresentaram alguma alteração clínica que se encontram compiladas no Quadro 4. Vale ressaltar que alguns animais apresentaram mais de uma alteração clínica. Além disso, foram incluídos dentro da categoria Alteração Sistêmica alguns sinais clínicos muito específicos, como coloração de mucosa, hidratação e apatia.

Principais alterações clínicas	Número de animais	%
Alteração Dermatológicas	9	26,5
Alteração Odontológicas	8	23,5
Linfoadenomegalia	3	8,8
Emagrecimento	14	41
Alterações Respiratórias	3	8,8
Alterações Sistêmicas	7	20.6

Quadro 4 - Principais alterações clínicas encontradas nos PNT de cativeiro. Alguns animais tinham mais de uma alteração clínica – São Paulo – 2008 - 2012

DEPAVE

Foram amostrados 29 animais, todos do gênero *Callithrix* sp. Destes, nove estavam alojados no DEPAVE-Ibirapuera: seis *C. penicillata* (1M; 5 F), um *C. Jacchus* (1 F) e dois *Callithrix* sp., (2 F).

Os outros 20 animais estavam na unidade do Parque Anhanguera (DEPAVE-CRAS): 13 *C. penicillata* (10M; 3F); dois *C. jacchus* (1 M; 1 F) e cinco *Callithrix* sp. (1 M; 4 F).

Destes 29 animais, 37,9% (11/29) apresentavam alguma alteração clínica no momento do exame, tais como: emagrecimento (n=4; 13,7%), alterações odontológicas (n=3; 10,3%), alterações dermatológicas (n=4; 13,7%), aumento de linfonodo (n=1; 3.4%).

CETAS de LORENA

Neste local foram amostrados 17 animais, sendo cinco *C. penicillata* (1 M; 4 F), dois *Callithrix* sp. (1 M; 1 F), seis *Cebus* sp. (1 M; 5 F); um *Callicebus* sp. (1 F) e três *Alouatta fusca* (3 M).

Todos os animais apresentavam alguma alteração clínica. Dos 17 animais, 41,2% (7/17) apresentaram emagrecimento, 23,5% (4/17) alterações dermatológicas, 11,7% (2/17) alterações odontológicas, 11,7% (2/17) linfadenomegalia, e 5,8% (1/17) alterações respiratórias..

CETAS UNIMONTE

Nesta instituição foram amostrados nove animais, sendo um *Callithrix* sp. híbrido (1 M), cinco *C. jacchus* (4 M; 1 F), dois *C. penicillata* (2 F) e um *Brachyteles arachnoides* (1 M).

A maioria dos animais estava em boas condições de saúde, sendo que somente três apresentaram alterações clínicas, como: alterações dermatológicas (n=1; 11,1%); alterações odontológicas (n=1; 11,1%).

CETAS - PARQUE ECOLÓGICO DO TIETÊ (PET)

Os técnicos desta instituição receberam um *Callicebus nigrifrons*, fêmea, jovem, que apresentava infecção por *Plasmodium* spp., constatado no hemograma. Desta forma, foram colhidas amostras biológicas deste animal para posterior identificação do patógeno. Este animal apresentava descamação em pele na região do dorso, apatia, emagrecimento e mucosa oral hipocorada.

PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU

Neste local foram amostrados 15 PNT, sendo seis *Ateles paniscus* (2 M; 4 F), dois *Lagothrix cana* (M), dois *Callicebus personatus* (1 M; 1 F), um *Alouatta caraya* (1 F), um *Lagothrix poeppigii* (1 F), um *Alouatta belzebul* (1 F), um *Alouatta clamitans* (1 M), um *Alouatta chamek* (1 M).

Dos 15 animais amostrados, 40% (6/15) apresentavam alguma alteração clínica, tais como: emagrecimento (n=3; 20%), alterações odontológicas (n=2; 13,3%) e desidratação (n=2; 13,3%).

5.1.2 *In situ*

Foram amostrados PNT de diferentes gêneros, em 4 locais de vida livre distintos, dois no estado de São Paulo e dois na Região amazônica. Ao todo foram amostrados 120 primatas *ex situ*, sendo que destes, 50 % (60/120) eram machos e 50 % (60/120) fêmeas. Além disso, a maioria (67,5%, 81/120) dos animais era composta de adultos e somente 26,7% (32/120) eram juvenis e 5,8 (7/120) filhotes (Quadro 5).

Do total de PNT amostrados, 76,6% (92/71) pertenciam a família Cebidae, 17,6% (21/71) à Atelidae e 5,8 % (7/71) à Pitheciidae (Gráfico 2).

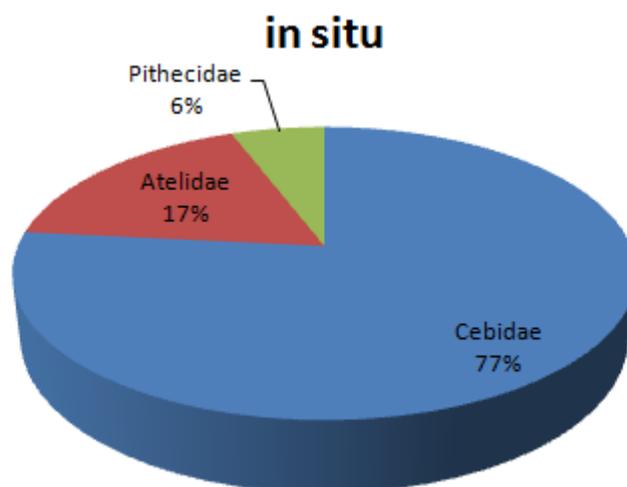


Gráfico 2 - Distribuição dos primatas neotropicais *in situ* amostrados em função da classificação taxonômica, segundo Perelman, et al. (2011) – São Paulo - 2008 - 2012

Dos 120 animais amostrados, 13,3% (16/120) apresentaram alguma alteração clínica (Quadro 6). Vale ressaltar que alguns animais apresentaram

mais de uma alteração clínica. Além disso, foram incluídos dentro da categoria Alteração Sistêmica alguns sinais clínicos muito específicos, como epistaxe.

Nome científico	Gênero	Faixa etária	Total
<i>Allouata caraya</i>	8 M / 10 F	11 A / 5 J / 2 F	18
<i>Aotus infulatus</i>	1 F	1 J	1
<i>Callicebus brunneus</i>	1 M / 1 F	2 A	2
<i>Callicebus caligatus</i>	2 M / 1 F	2 A / 1 F	3
<i>Callicebus dubius</i>	1 M	1 A	1
<i>C. penicillata</i>	35 M / 40 F	51 A / 21 J / 3 F	75
<i>Cebus apella</i>	1 F	1 J	1
<i>Cebus macrocephalus</i>	1 M / 1 F	1A / 1 J	2
<i>Cebus spp.</i>	5 M / 3 F	5 A / 2 J / 1 F	8
<i>Lagothrix cana</i>	2M / 1 F	3 A	3
<i>Pithecia spp.</i>	1 M	1 A	1
<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	1 M / 1 F	2 A	2
<i>Saguinus labiatus rufiventer</i>	1 F	1 A	1
<i>Saimiri boliviensis</i>	1 M	1 J	1
<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>	1 M	1 A	1
Total	60 M / 60 F	81 A / 32 J / 7 F	120

Quadro 5 - Distribuição dos PNT amostrados *in situ*, de acordo com a espécie, gênero e faixa etária. M=macho, F=fêmea; A=adulto; J=juvenil e F=filhote – São Paulo – 2008-2012

Principais alterações clínicas	N	%
Alteração odontológicas	1	6.25
Linfoadenomegalia	13	81,3
Emagrecimento	1	6.25
Galactorréia	3	18,75
Alterações sistêmicas	1	6.25

Quadro 6 - principais alterações clínicas encontradas nos PNT de vida livre. Alguns animais apresentavam mais de uma alteração clínica – São Paulo – 2008 -2012

HORTO FLORESTAL DE BAURU

Neste local foram amostrados oito PNT, sendo todos da espécie *C. Penicillata* (2M; 6 F).

Dois animais apresentavam galactorréia e um destes estava com aumento de volume inguinal. Os demais estavam hígidos.

PCH - São Joaquim da Barra

Foram amostrados 85 PNT, sendo que destes 67 eram da espécie *C. Penicillata* (33 M; 34 F) e 18 da espécie *A. Caraya* (10 M; 8 F). A maioria dos animais apresentava-se hígido, porém seis exibiam linfoadenomegalia em linfonodo inguinal, um galactorréia, um lesão cutânea e um epistaxe.

PATROCÍNIO PAULISTA – Fazenda Sta. Cecília

Foram amostrados oito PNT sendo todos da espécie *Cebus* spp. (5 M; 3 F). Todos os animais apresentavam-se clinicamente hígidos.

RONDÔNIA - Município de Abunã

Foram amostrados nove PNT no município de Abunã, Rondônia, sendo estes pertencentes a cinco gêneros. As espécies amostradas foram: dois *Callicebus brunneus* (1 M; 1 F), dois *Lagothrix cana* (1 M; 1 F), um *Saimiri boliviensis* (1M), um *Aotus infulatus* (1 F), um *Cebus apella* (1 F), um *Callicebus dubius* (1 F) e um *Pithecia* sp. (1 M).

Ao exame da carcaça os animais apresentavam-se, aparentemente, em bom estado geral.

AMAZONAS - BR-319

Foram amostrados dez PNT em distintos locais ao longo da rodovia BR-319, Amazonas. Os animais pertenciam a sete gêneros assim distribuídos: três *Callicebus caligatus* (2 M; 1 F), dois *Cebus macrocephalus* (1 M; 1 F), dois *Saguinus fuscicollis mura* (1 M; 1 F), um *Saguinus labiatus rufiventer* (1 F), um *Lagothrix cana* (1 M), um *Saimiri [ustus] madeirae* (1 M).

Ao exame da carcaça, os animais apresentavam-se, aparentemente, em bom estado geral, porém sete deles apresentavam linfadenomegalia em linfonodos inguinais.

5.2 Pesquisa de *Plasmodium* spp.

5.2.1 Diagnóstico parasitológico pela gota espessa

Foram avaliadas lâminas de 191 PNT, sendo 62,8% (120/191) de animais *in situ* e 37,2% (71/191) de animais *ex situ*. Do total de animais avaliados, 4,7% (9/191) foram positivos na gota espessa (Apêndice C e D). A figura 37 apresenta algumas das formas parasitárias encontrados nas lâminas de gota espessa.

Dos animais *in situ*, 5,8% (7/120) foram positivos para gota espessa, sendo que destes 42,8% (3/7) eram do estado de São Paulo (P71, P72, P98), todos da espécie *C. Penicillata*, de São Joaquim da Barra, e 57,2% (4/7) eram provenientes das regiões Amazônicas, sendo 50% (2/4) de Rondônia (P169, *C. dubius*; P171, *Pithecia* sp.), e 50 % (2/4) do Amazonas (BR-319) (P177, P182, ambos *C. caligatus*) (Apêndice F).

Dos animais *ex situ*, 2,8% (2/71) foram positivos, ambos de São Paulo (Capital). Um estava no CRAS-PET (P160, *C.nigrifrons*), zona norte, enquanto o outro animal positivo (P006, *C. penicillata*) estava alojado no DEPAVE-CRAS, zona Oeste.

Do total de PNT provenientes do estado de São Paulo (n=172), 2,9% (5/172) foram positivos, sendo 60% (3/5) de vida livre e 40% (2/5) em cativeiro. Para os animais da região amazônica (n= 19), 21,1% (4/19) foram positivos, 50% (2/4) em Rondônia e 50% (2/4) no Amazonas.

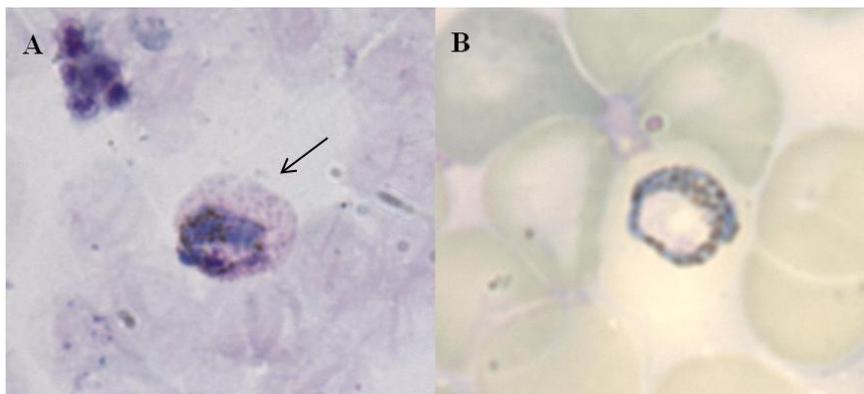


Figura 37 - Parasitas visualizados por microscopia ótica na gota espessa corada com Giemsa: (A) trofozoíto maduro (seta) ($\times 1000$) de *P. simium* em *Callicebus nigrifrons*, São Paulo, 2012; (B) gametócito ($\times 1000$) de *P. brasilianum* em *Callicebus dubius*, Rondônia. São Paulo/Amazônia - 2009 - 2011

5.2.2 Pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium* spp.

5.2.2.1 Ensaio Imuno Enzimático EIE / ELISA

- Padronização

Com base nos resultados encontrados, a escolha das diluições dos soros e do conjugado foram feitas avaliando aquelas que melhor discriminaram os soros controles positivos dos negativos.

Sendo assim, para o *Pf*, optou-se pela diluição do soro em 1:100 e com ambos os conjugados em 1:80.000 (Figura 38). Para o *Pv*, optou-se por diluir o soro em 1:100 e ambos os conjugados em 1:40.000 (Figura 39).

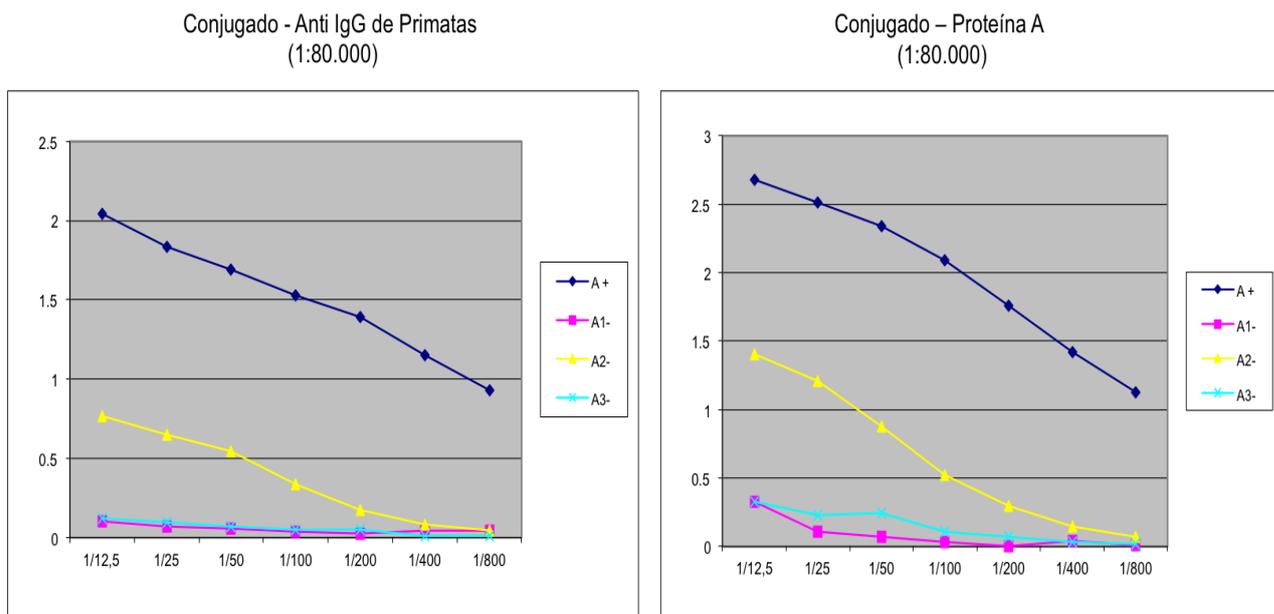


Figura 38 - Diluições seriadas dos soros controles (positivo: A+; e negativos: A1⁻, A2⁻, A3⁻) utilizando ambos os conjugados na diluição de 1:80.000 e antígeno de *P. falciparum* – São Paulo – 2008 - 2012

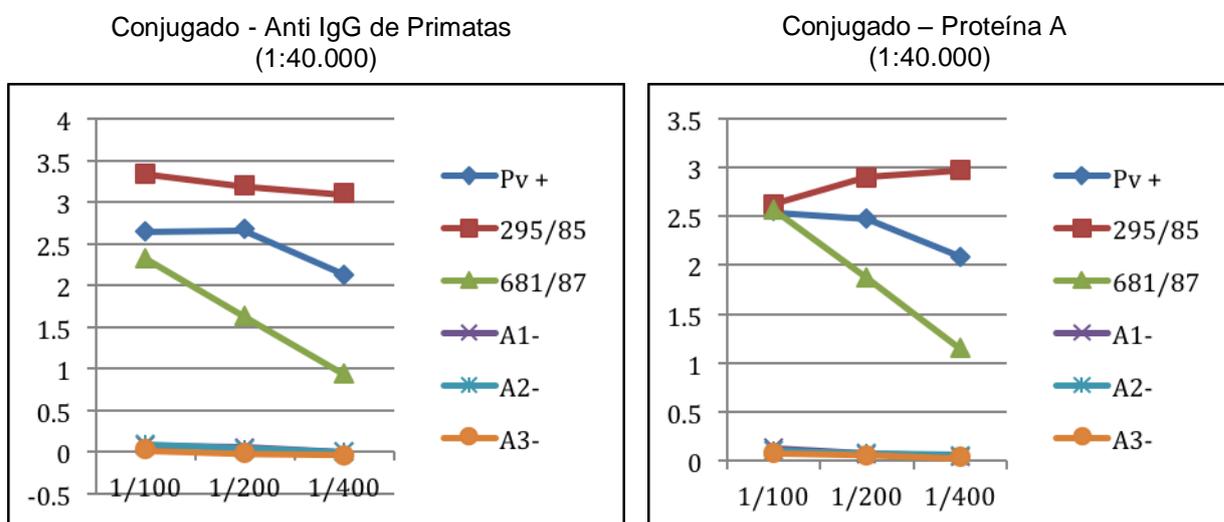


Figura 39 - Diluições seriadas dos soros controles (positivos: Pv+, 295/85 e 681/87 e negativos: A1⁻, A2⁻, A3⁻) utilizando ambos os conjugados na diluição de 1:40.000 e antígeno de *P. vivax* – São Paulo – 2008 - 2012

O *cut-off*, para o *Pf*, com ambos os conjugados, foi de 0,09, enquanto que para o *Pv* foi de 0,145 utilizando-se a Proteína-A, e 0,110 com o conjugado anti-IgG de primatas.

- Teste das amostras de primatas

Dos 120 animais de vida livre amostrados, somente 113 foram efetivamente testados, devido ao fato de termos conseguido pouco volume de soro de alguns animais. Desta forma, o N de amostras examinadas nesta prova foi de 184 (113 *in situ*; 71 *ex situ*) e os positivos foram considerados apresentando IR>1 (Figura 40). Dentre os de vida livre, 4,4% (5/113) dos animais foram positivos para IgG anti-*Pv* e 3,5% (4/113) para IgG anti-*Pf* (Tabela 1).

Dos animais de cativeiro, 7,0% (5/71) foram positivos para IgG anti-*Pf* usando como conjugado a proteína-A e nenhum destes foi positivo com o conjugado específico, Anti-IgG de Primata (Figura 43). Dos animais positivos, três animais eram do CETAS LORENA (P033-C. *penicillata*; P038-Cebus spp.; P047-A. *Fusca*); um do DEPAVE-Ibirapuera (P030- C. *penicillata*) e um do (P190-A. *belzebul*) do Zoológico de Bauru.

Além disso, 4,2% (3/71) dos animais foram positivos para IgG anti-*Pv*, sendo que todos (P047- A. *fusca* e P159-*Brachyteles arachnoides*, P160- C. *nigrifrons*) foram positivos usando o conjugado específico anti-IgG de primata e dois (P047, P159) positivos com a proteína-A (Apêndice E). Dos animais *in situ*, 3,5% (4/113), P166- L. *cana*; P173 - *Saguinus labiatus rufiventer*; P178- *Saimiri [ustus] madeirae*, P179-C. *macrocephalus* foram positivo para IgG anti-*Pf*, todos provenientes da região Amazônica. Destes, 100% (4/4) foram positivos utilizando ambos os conjugados. Nenhum animal foi positivo para IgG anti-*Pv*.

Do total de animais do estado de São Paulo, 166 foram testados no ELISA e destes, 3,6% (6/166) dos animais foram positivos para IgG anti-Pf e 1,8% (3/166) para IgG anti-Pv.

Para os animais da região amazônica, 22,2% (4/18) foram positivos para IgG anti-Pf, 1 em Rondônia e 3 no Amazonas, e nenhum foi positivo para IgG anti-Pv (Apêndice F).

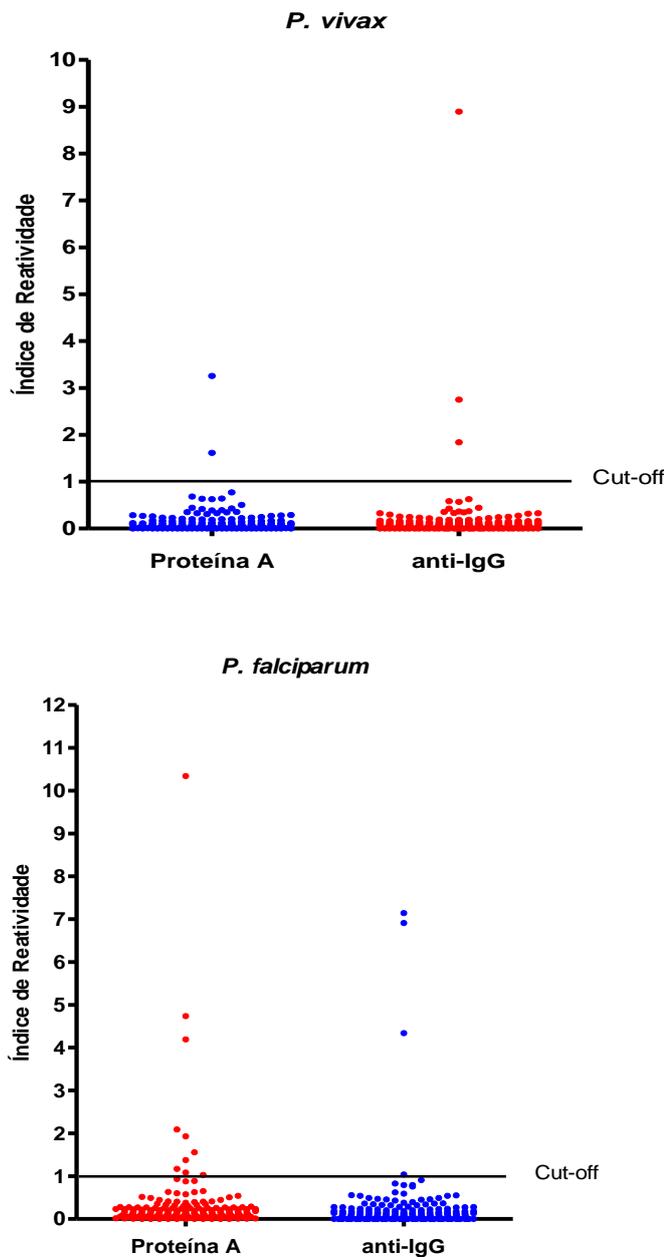


Figura 40 - Comparação entre o índice de reatividade (IR) encontrado no ELISA, usando como conjugado a proteína A e o anti-IgG de primata para *P. falciparum* e *P. vivax* – São Paulo, 2008- 2012

Tabela 1 - Comparação entre os resultados ELISA utilizando-se como conjugado a proteína-A e o Anti-IgG- primata em relação aos animais *in situ* e *ex situ* – São Paulo, 2008-2012

LOCAL	Nº animais	Pf - Proteína-A		Pf - Anti-IgG primata		Pv - Proteína-A		Pv - Anti-IgG primata	
		Nº animais positivos	%	Nº animais positivos	%	Nº animais positivos	%	Nº animais positivos	%
<i>in situ</i>	113	5	4,4 (5/113)	4	3,5 (4/113)	0	0	0	0
<i>ex situ</i>	71	5	7,04 (5/71)	0	0	2	2,8% (2/71)	3	4,2 (3/71)
Total	184	10	5,4 (10/184)	4	2,2 (4/184)	2	1,1 (2/184)	3	1,6 (3/184)

5.2.2.2 Imunofluorescência indireta (IFI)

- Padronização

Após avaliação optou-se por testar as amostras na diluição de 1:20 e o conjugado anti-IgG de primata na diluição de 1:100. O protocolo da IFI está descrito no Apêndice L.

- Teste das amostras de primatas

Para a pesquisa de IgG anti-Pf e anti-Pv, da mesma forma que para o ELISA, do total de 120 animais de vida livre, foram testados somente 113, devido ao fato de termos conseguido pouco soro de alguns animais. Por outro lado, para pesquisa de IgG anti- *P. malariae* (*Pm*), foram testados os soros de 35 animais de vida livre e 17 de cativeiro, devido a raridade do antígeno. Todos os animais de cativeiro foram testados para IgG anti-Pf e anti-Pv.

Na pesquisa de IgG anti-Pf nos animais *ex situ*, 4,2% (3/71), P047- *A. fusca*, do CETAS de LORENA (Figura 41), e o P197 e o P198 (ambos da

espécie *A. paniscus*), do Zoológico de Bauru, foram positivos com títulos variando entre 20 e 160.

Na pesquisa de IgG anti-*Pv* nos animais *ex situ*, 2,8% (2/71) foram positivos, sendo um o P047, *A. Fusca* e o outro o P159, *Brachyteles arachnoides*, do CETAS UNIMONTE, ambos apresentando títulos > 320 (Figura 42).

Por outro lado, na pesquisa de IgG anti-*Pm*, somente um animal foi positivo (P047).

Nos animais *in situ*, 5,3% (6/113) foram positivo na para IgG anti-*Pf*, sendo que um 0,8% (1/113), P102- *C. penicillata*, era do estado de São Paulo (PCH) e os outros 4.4% (5/113) de região Amazônica, sendo 80% (4/5) do Amazonas (P173, P178, P179 e P182) e 20% (1/5) de Rondônia (P170).

Do total de animais testados do estado de São Paulo, 2,4% (4/166) foram positivos para IgG anti-*Pf*, 1,2% (2/166) foram positivos para IgG anti-*Pv* e 0,6% (1/166) para IgG anti-*Pm* (Figura 43).

Para os animais da região amazônica, 27,7% (5/18) foram positivos para IgG anti-*Pf*, sendo 20% (1/5) em Rondônia e 80% (4/5) no Amazonas, enquanto 16,6% (3/18) dos PNT foram positivos para IgG anti-*Pm*. Nenhum animal foi positivo para IgG anti-*Pv*.

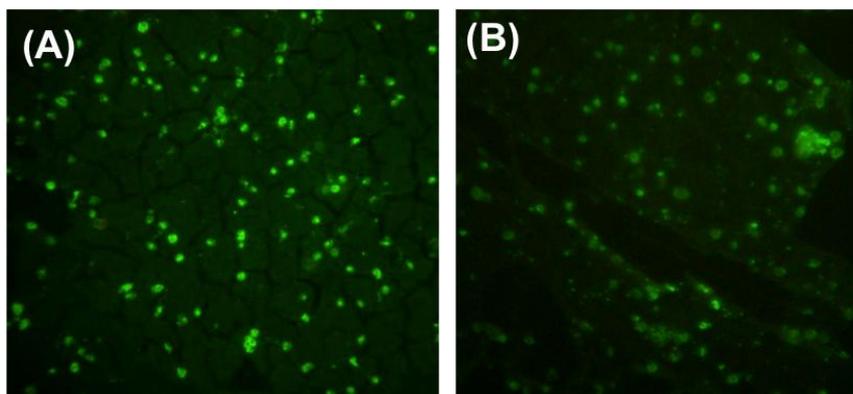


Figura 41 - Imunofluorescência indireta (IFI) para *P. falciparum*: (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P178), *Saimiri [ustus] madeirae*, proveniente de Amazonas (BR-319) - Rondônia - 2010

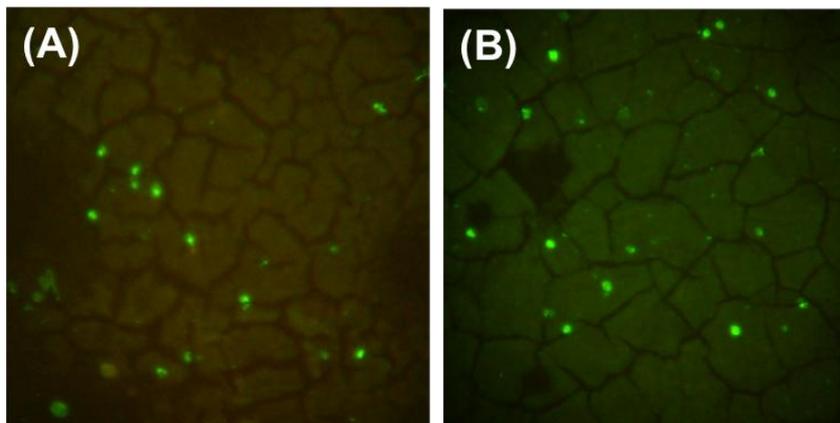


Figura 42 - Imunofluorescência indireta (IFI) para *P. vivax*: (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P047), *Alouatta fusca*, proveniente do CETAS LORENA - São Paulo – 2011 - 2009

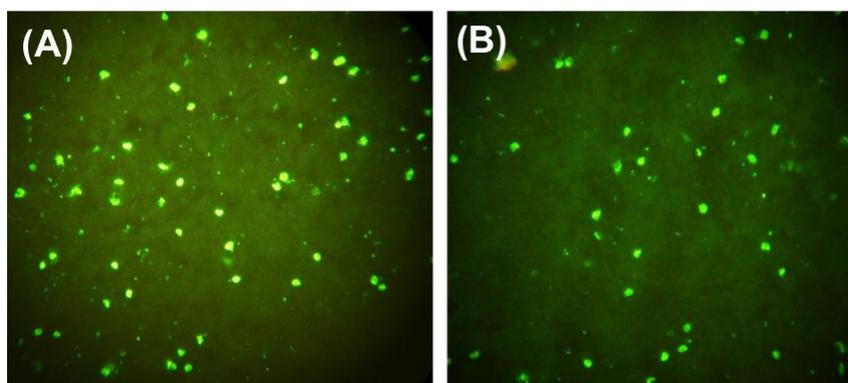


Figura 43 - Imunofluorescência indireta (IFI) para *P. malariae*: (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P047), *Alouatta fusca*, proveniente do CETAS LORENA, São Paulo – 2009

5.2.2.3 Teste imunocromatográfico

Este teste apresentou poucos resultados positivos. Em cativeiro, somente 2,8% (2/71) dos animais, o P047 (*A. fusca*) e o P159 (*B. arachnoides*), foram positivos para a marcação de Pv (Figura 44). Todos os animais *in situ* foram negativos.

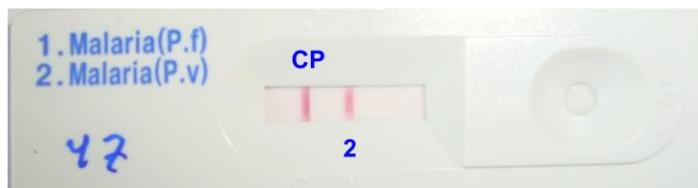


Figura 44 - Teste imunocromatográfico, SD Bioline Malária *Pf/Pv* (Standard Diagnostics, Inc.) evidenciando marcação positiva para Pv de soro de *Alouatta fusca* (P047), proveniente do CETAS LORENA - São Paulo – 2008-2012

5.2.3. Diagnóstico molecular

5.2.3.1 Reação da cadeia da polimerase (*Nested PCR*)

Após execução da *nested PCR* que tem como alvo parte do gene que codifica 18S (SSUrRNA, Figura 45), sequenciamento e comparação das sequências obtidas através de BLASTN no GenBank, encontramos 6 (3,14%) animais positivos de 191 animais testados (Figura 46).

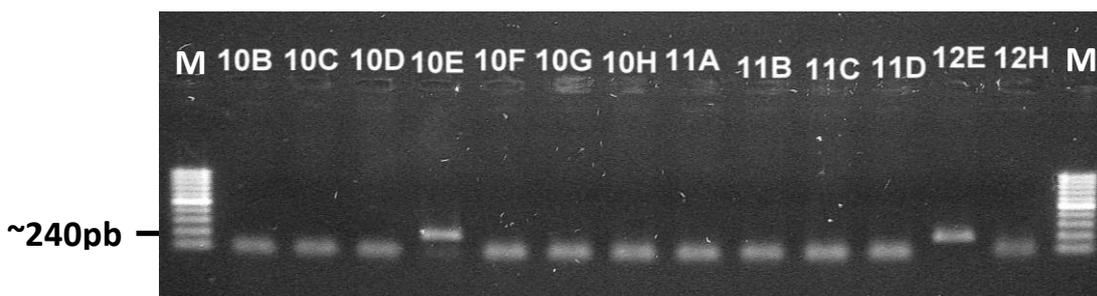


Figura 45 - Exemplo dos resultados obtidos com a *nested PCR* utilizando como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (SSUrRNA) ou 18S, para detecção de *Plasmodium* spp. Amostras clínicas negativas = 10B, 10C, 10D, 10F, 10G, 10H, 11A, 11B, 11C e 11D; Amostra clínica positiva = 10E; Controle positivo = 12E; Controle negativo = 12H. M = marcador de peso molecular (Fermentas 100pb). - São Paulo – 2012

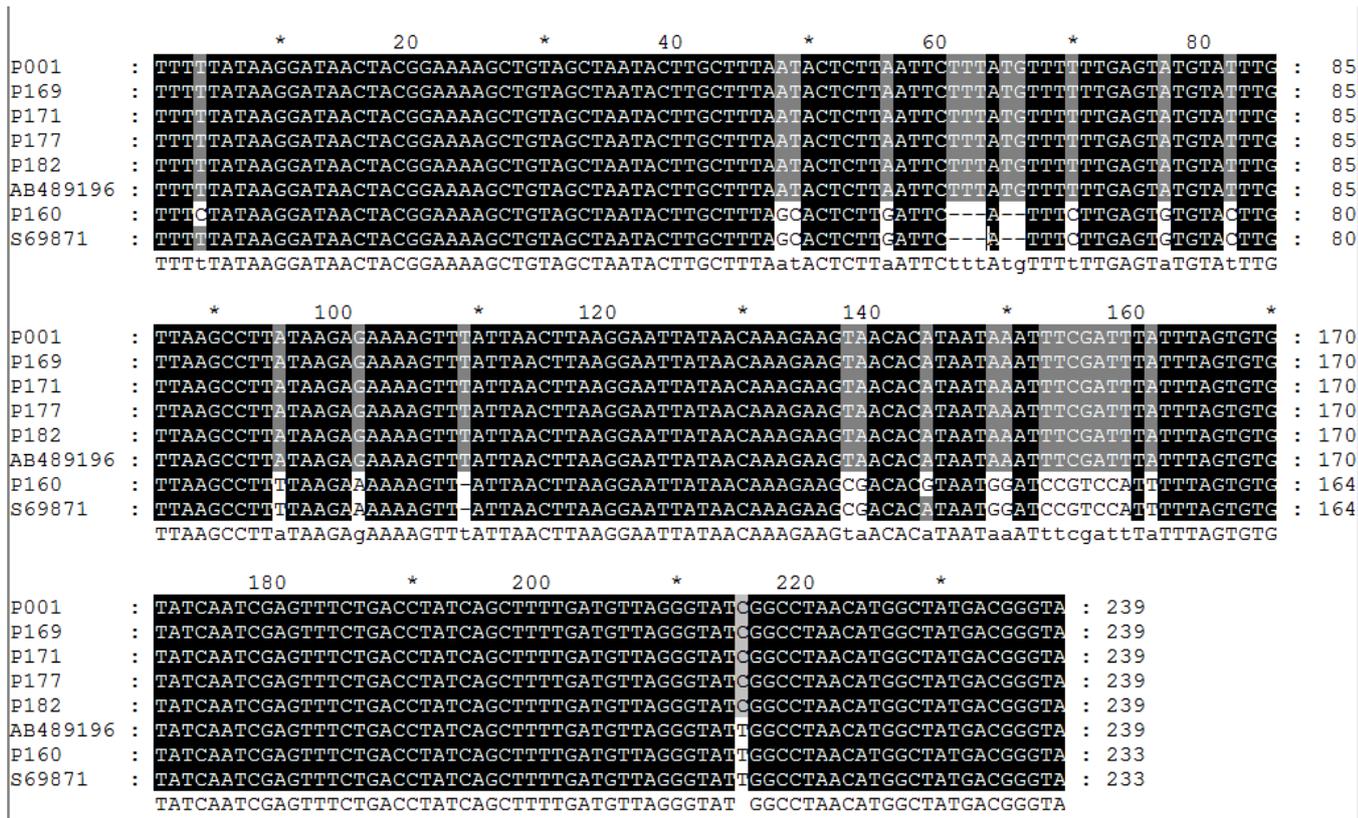


Figura 46 -.Alinhamento das seqüências nucleotídicas encontradas nas amostras positivas para *Plasmodium* na *nested* PCR de 18S – São Paulo - 2012

Quando as seqüências de SSU foram comparadas por BLASTN no GenBank, encontramos para cinco amostras positivas (P001, P169, P171, P177 e P182) uma similaridade de 99% com uma seqüência depositada para *P. malariae* (Isolado Oumu, GenBank AB489196) (Tabela 2). Esse isolado foi obtido de um chimpanzé fêmea (*Pan troglodytes verus*) nascido em 1976, importado ao Japão da África em março de 1977. Não há registro de *Plasmodium* em seu país de origem.

Possivelmente esse isolado veio do oeste africano, pois *P.t. verus* é uma subespécie desta região. A coleta do sangue foi realizada em exame de rotina em junho de 2003 (Hayakawa et al., 2009). Para uma amostra positiva (P160), encontramos uma similaridade de 99% com uma seqüência obtida em *P. vivax* (Isolado Yunnan, GenBank S69871)(Tabela 2). Essa sequencia foi depositada no GenBank em setembro de 1994 e foi obtida de isolado proveniente de paciente (amostra 9007) da província de Yunnan, China.

Tabela 2 - Matriz de similaridade entre as seqüências nucleotídicas de um fragmento de ~240 pb que codifica SSUrRNA, obtidas para as amostras positivas – São Paulo – 2008-2012

	P001	P169	P171	P177	P182	AB489196	P160	S69871
P001	239 0 0	100% 100% 0%	100% 100% 0%	100% 100% 0%	100% 100% 0%	99% 99% 0%	83% 83% 4%	84% 84% 4%
P169	239 239 0	239 0 0	100% 100% 0%	100% 100% 0%	100% 100% 0%	99% 99% 0%	83% 83% 4%	84% 84% 4%
P171	239 239 0	239 239 0	239 0 0	100% 100% 0%	100% 100% 0%	99% 99% 0%	83% 83% 4%	84% 84% 4%
P177	239 239 0	239 239 0	239 239 0	239 0 0	100% 100% 0%	99% 99% 0%	83% 83% 4%	84% 84% 4%
P182	239 239 0	239 239 0	239 239 0	239 239 0	239 0 0	99% 99% 0%	83% 83% 4%	84% 84% 4%
AB489196	238 238 0	238 238 0	238 238 0	238 238 0	238 238 0	239 0 0	84% 84% 4%	85% 85% 4%
P160	203 203 12	203 203 12	203 203 12	203 203 12	203 203 12	204 204 12	233 0 0	99% 99% 0%
S69871	205 205 12	205 205 12	205 205 12	205 205 12	205 205 12	206 206 12	231 231 0	233 0 0

Os resultados obtidos através da utilização da *nested* PCR que tem como alvo o gene citocromo b (*cytb*) também demonstraram 6 (3,14%) animais positivos (Figura 47 e 48).

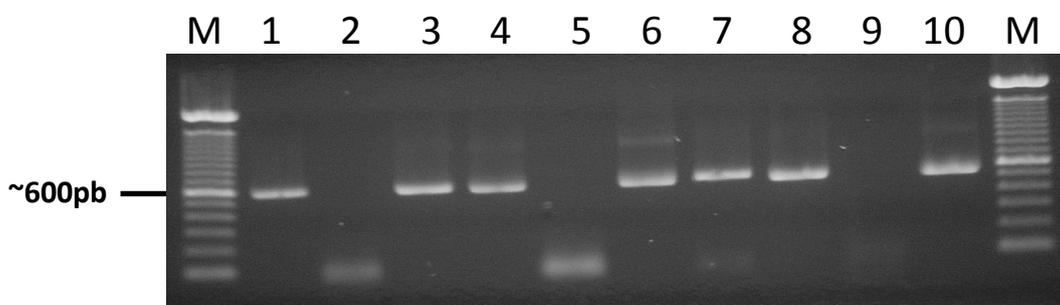


Figura 47 - *Nested* PCR utilizando como alvo o gene *cytb* de *Plasmodium* spp. Amostras clínicas negativas = 2 e 5. Controle negativo = 9. Controle positivo = 10. M = 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). - São Paulo – 2012

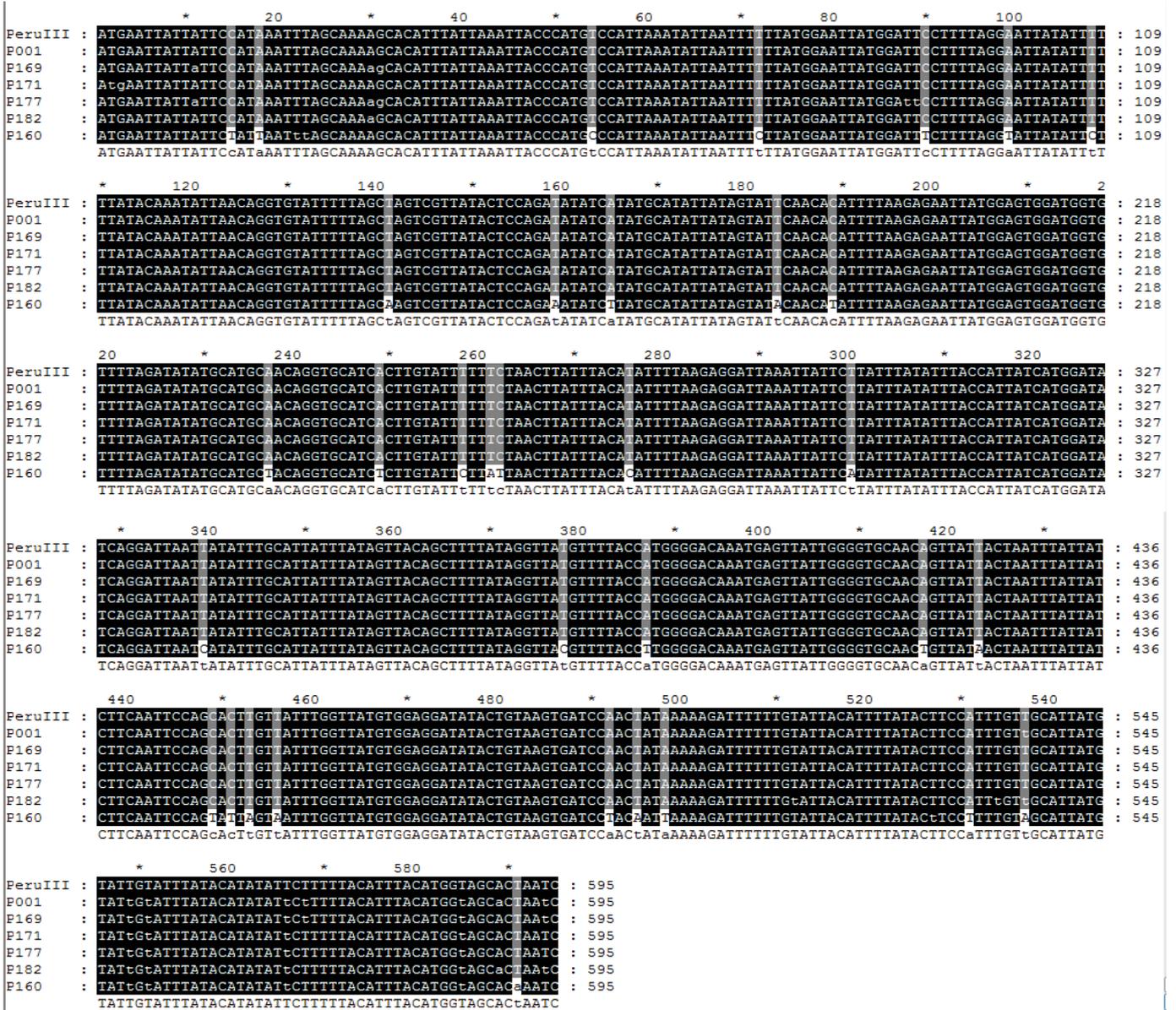


Figura 48. Alinhamento das seqüências nucleotídicas encontradas nas amostras positivas para *Plasmodium* para a *nested* PCR de *cytb* – São Paulo - 2012

Quando as seqüências de *cytb* foram comparadas por BLASTN no GenBank, encontramos para cinco amostras positivas (P001, P169, P171, P177 e P182) uma similaridade de 100% com uma seqüência depositada para *P. brasilianum* (Peruvian III, GenBank GQ355484). Esse isolado foi obtido de *Saimiri sciureus peruviansis* em Iquitos, Peru, em 1987 (Collins et al., 1990). Para uma amostra positiva (P160), encontramos uma similaridade de 100% com uma seqüência obtida em *P. simium* (GenBank AY722798). Essa seqüência foi obtida do isolado Fonseca MRA-353, proveniente de *Alouata fusca* no Brasil em 1966 (Collins et al., 1969). Uma amostra de similaridade entre seqüências obtidas é apresentada na tabela 3.

Tabela 3 - Matriz de similaridade entre as seqüências nucleotídicas de um fragmento de ~600 bp do gene *cytb* obtidas para as amostras positivas – São Paulo - 2012

	PeruIII	P001	P169	P171	P177	P182	P160
PeruIII	595	100%	100%	100%	100%	100%	94%
	0	100%	100%	100%	100%	100%	94%
	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%
P001	595	595	100%	100%	100%	100%	94%
	595	0	100%	100%	100%	100%	94%
	0	0	0%	0%	0%	0%	0%
P169	595	595	595	100%	100%	100%	94%
	595	595	0	100%	100%	100%	94%
	0	0	0	0%	0%	0%	0%
P171	595	595	595	595	100%	100%	94%
	595	595	595	0	100%	100%	94%
	0	0	0	0	0%	0%	0%
P177	595	595	595	595	595	100%	94%
	595	595	595	595	0	100%	94%
	0	0	0	0	0	0%	0%
P182	595	595	595	595	595	595	94%
	595	595	595	595	595	0	94%
	0	0	0	0	0	0	0%
P160	561	561	561	561	561	561	595
	561	561	561	561	561	561	0
	0	0	0	0	0	0	0

Com base na comparação nucleotídica das sequências obtidas para *cytb*, as amostras P001, P169, P171, P177 e P182 foram definidas como sendo provenientes de *P. brasilianum*. Já a amostra P160 foi então identificada como proveniente de *P. simium*.

Dos animais de vida livre amostrados, 4,1% (5/120) foram positivos, todos para *P. brasilianum*. Dentre estes, um animal (20%; 1/5), *Cebus* spp. (P001), do estado de São Paulo, região de Patrocínio Paulista.

Dos outros animais *in situ* positivos, 80% (4/5) foram capturados em regiões Amazônicas, dos quais 50% (2/2) eram de Rondônia (P169- *Callicebus dubius*, P171- *Pithecia* sp.) e 50% (2/2) do Amazonas, BR-319 (P177; P182- ambos da espécie *Callicebus caligatus*).

Já para os animais *ex situ*, somente um PNT (1,4%; 1/71) foi positivo, o P160 (*C. Nigrifrons*), do CRAS-PET, zona Norte de São Paulo. Este animal foi positivo para *P. simium*.

Desta forma, para o estado de São Paulo, encontramos 1,2% (2/172) de animais positivos, sendo um para *P. simium* e outro para *P. brasilianum*. Para a região Amazônica, 21,0% (4/19) dos primatas foram positivos, todos *P. brasilianum*.

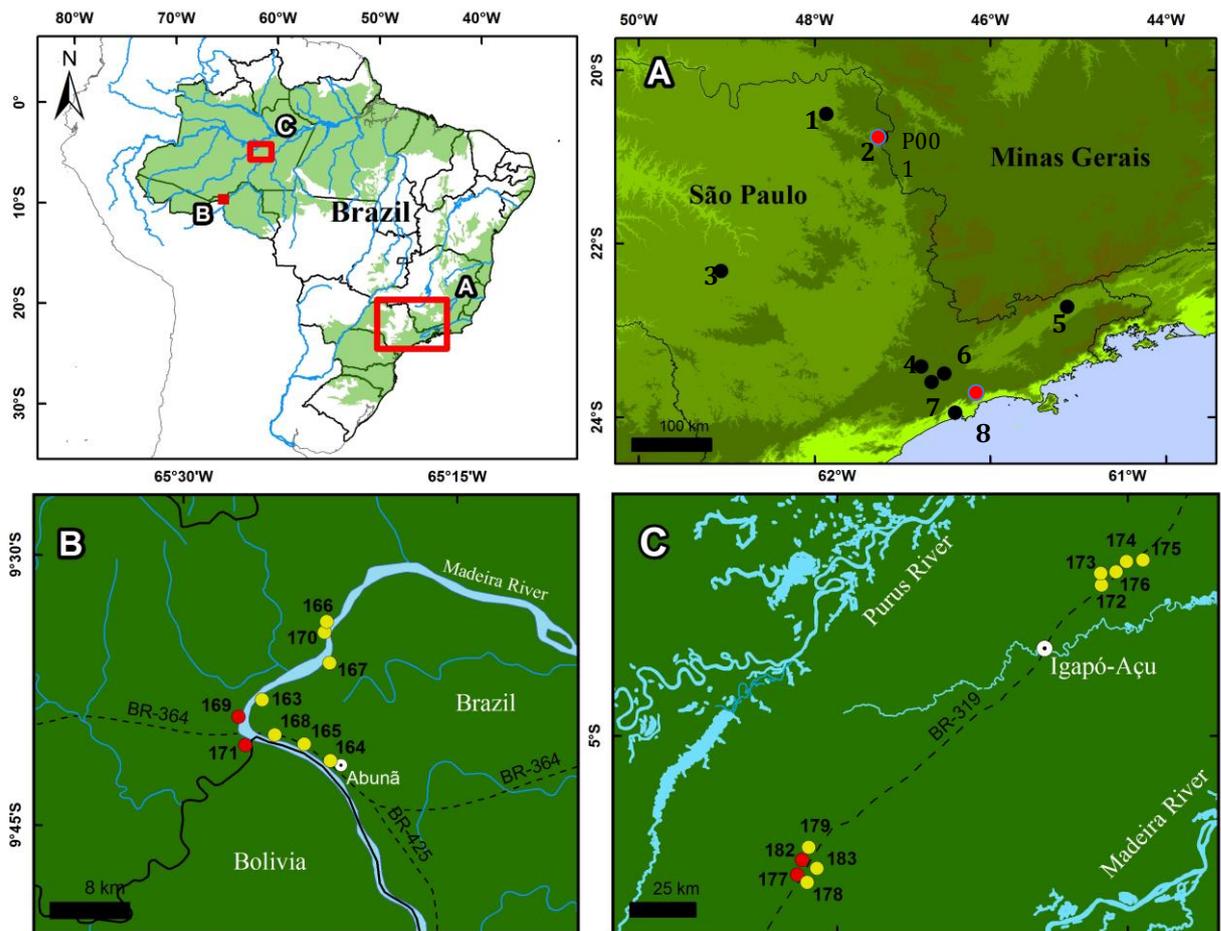


Figura 49 - Localização dos primatas positivos (pontos vermelhos) no *Nested* PCR utilizando como alvo o gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (*ssuRNA*) ou 18S para diagnóstico de *Plasmodium* spp. A) Estado de São Paulo, 1- São Joaquim da Barra; 2- Patrocínio Paulista, 3- Bauru, 4- DEPAVE-CRAS, 5- Lorena, 6- PET, 7- DEPAVE-Ibirapuera, 8-CETAS UNIMONTE; B) Rondônia, Abunã; C) Amazonas, BR-319. - São Paulo/Amazônia – 2008-2012

5.3 Pesquisa de *leishmania* spp.

5.3.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

5.3.1.1 Ensaio Imuno Enzimático EIE / ELISA

- Padronização

Não foi observada diferença nos resultados com as diferentes concentrações de antígeno testadas. Desta forma, optamos por trabalhar com a menor concentração de antígeno (10 µg/mL) a fim de se otimizar a reação. Quanto à diluição dos soros controles, 1:200 foi a escolhida, já que as densidades ópticas (D.O) apropriadas para os soros controles negativos e positivos foram observadas quando estes soros foram assim diluídos.

Ambos os conjugados (proteína-A e anti-IgG de Primata) apresentaram melhores resultados nas diluições de 1:80.000 (Figura 49).

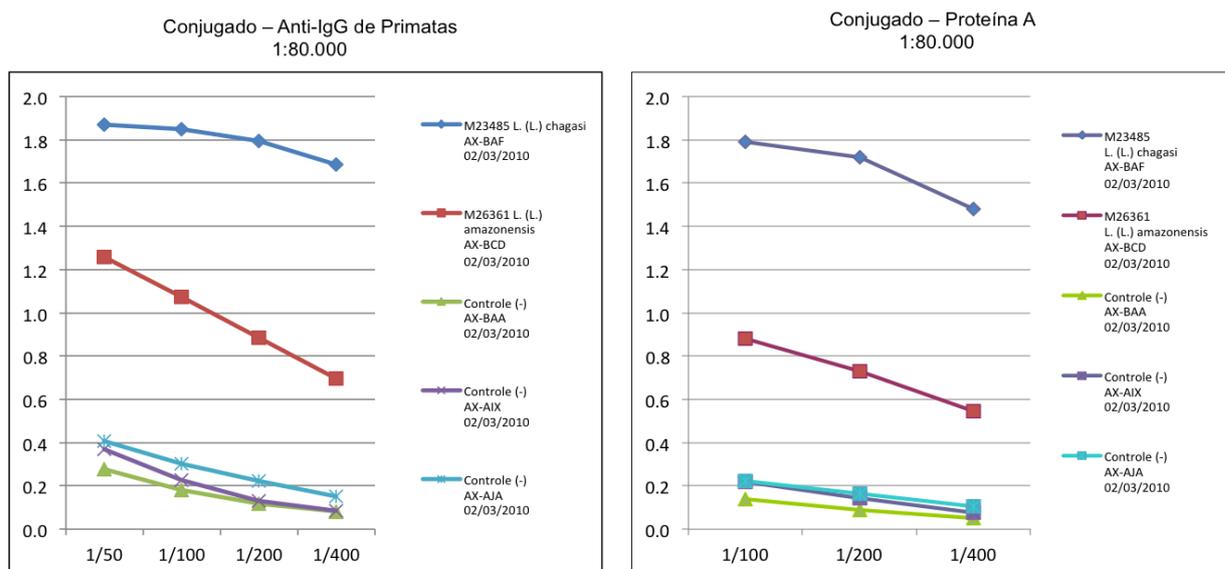


Figura 50 - Diluições seriadas dos soros controles, utilizando ambos os conjugados na diluição de 1:80.000 e, como antígeno, o extrato bruto de *L. (L.) amazonensis* – São Paulo – 2008 – 2012

- Teste das amostras de primatas

Foram testados para a pesquisa de IgG anti-*Leishmania* spp., 113 animais de vida livre e 71 de cativeiro, sendo que dos *ex situ* 46,5% (33/71) eram machos e 53,5% (38/71) eram fêmeas e dos *in situ* 50,4% (57/113) eram fêmeas e 49,5% (56/113) eram machos. Do total de animais, 5,9% (11/184) foram positivos, sendo 45,5% (5/11) eram fêmeas e 54,5% (6/11) eram machos. Além disso, 91% (10/11) eram adultos, 9% (1/11) era juvenil e 91% (10/11) pertenciam a família Cebidae e 9% (1/11) à família Pitheciidae (Apêndice G e H).

Dos animais de cativeiro 1,4% (1/71) foi positivo tanto usando o conjugado anti-IgG de primata quanto a proteína-A (P055, macho, *C. Jacchus*, CETAS UNIMONTE) (Apêndice J).

A distribuição dos resultados em função dos conjugados empregados está apresentada na tabela 4. Foi observado um número maior de animais positivos ($IR > 1$) usando o conjugado proteína-A do que o conjugado anti-IgG de primata (figura 50).

Dos animais de vida livre, 8,8% (10/113) foram positivos usando como conjugado a proteína-A. Do total de animais neste ensaio, 7% (8/113), eram de São Paulo (SJB-PCH) sendo todos *C. penicillata*, e 1,8% (2/113) era do Amazonas. Utilizando o conjugado anti-IgG de primata, 4,4% (5/113), foram positivos sendo 3,5% (4/113) em São Paulo e 0,9% (1/113) no Amazonas. Além disso, 4,4% (5/113) foram positivos para ambos os conjugados (Apêndice I).

Do total de animais testados no estado de São Paulo 5,4% (9/166) foram positivos com a proteína-A e 3,0% (5/166) foram positivos para anti-IgG de primata, sendo todos do gênero *Callithrix* (Apêndice I e J).

Para os animais da região amazônica (n=18), 11% (2/18) foram positivos com a proteína-A (P176 - *Cebus macrocephalus*, P178 - *Saimiri [ustus] madeirae*) e 5,5% (1/18) foram positivos com o conjugado anti-IgG de primata (P176) (Apêndice I).

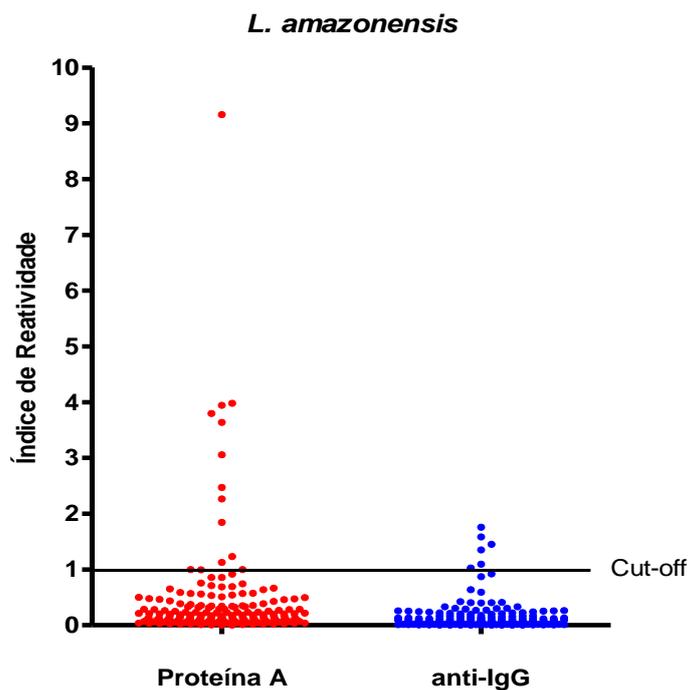


Figura 51 - Distribuição dos índices de reatividade (IR) encontrados no ELISA, usando como conjugado a proteína-A e o anti-IgG de primata para *Leishmania* spp. – São Paulo – 2008-2012

Tabela 4 - Distribuição dos resultados do ELISA para *Leishmania* utilizando como conjugado a proteína-A e o anti-IgG- primata em relação aos animais *in situ* e *ex situ* – São Paulo -2008 - 2012

LOCAL	Nº animais	Proteína-A		Anti-IgG primata	
		Nº animais positivos	%	Nº animais positivos	%
<i>in situ</i>	113	10	8,8 (10/113)	5	4,4 (5/113)
<i>ex situ</i>	71	1	1,4 (1/71)	1	1,4 (1/71)
Total	184	11	5,9 (11/184)	6	3,2 (6/184)

5.3.1.2 Imunofluorescência indireta (IFI)

Foram testados soros de 113 animais de vida livre e 71 de cativeiro para a pesquisa de IgG anti-*Leishmania* spp. pela IFI, devido a pouca quantidade de volume de algumas amostras obtidas. Ao todo, 5,5% (10/184) dos animais foram positivos, sendo 80% (8/10) da família Cebidae e 20% (2/10) da família Atelidae.

Nos animais de cativeiro, 2,8% (2/71; 1M; 1F) foram positivos, sendo um (P011) do DEPAVE-CRAS, *C. penicillata* e o outro (P190) do Zoológico de Bauru, *A. belzebul*, ambos com título 80 (Apêndice J).

Nos animais de vida livre, 7,0% (8/113; 4M; 4 F) foram positivos, sendo 6,2% (7/113) em São Paulo (P078, P093, P107, P109, P123, P147, P155) e 0,8% (1/113) em Rondônia, da espécie *Lagothrix cana* (P170) (Apêndice I).

Do total de animais testados no estado de São Paulo, 5,4% (9/166; 5 M; 4 F) foram positivos. Para os animais da região amazônica, 5,5% (1/18; F) foram positivos (P170, *Lagothrix cana*) (Figura 51).

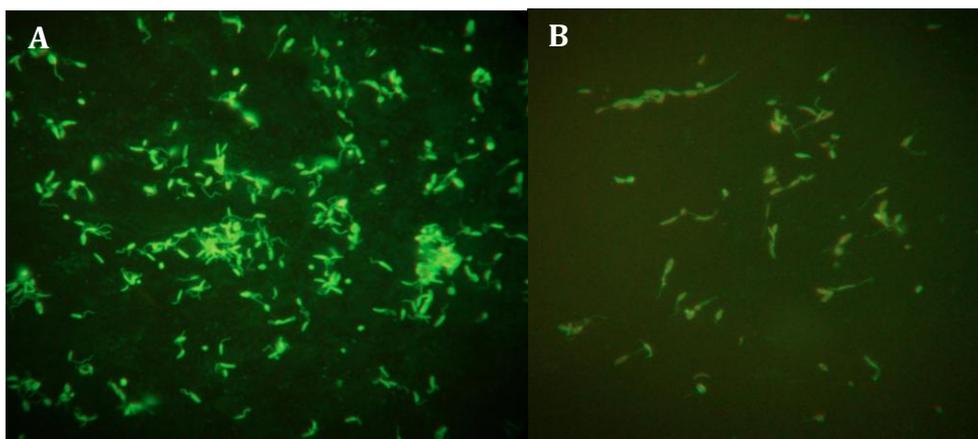


Figura 52 - Imunofluorescência indireta (IFI) para *Leishmania* spp.: (A) controle positivo da reação; (B) marcação positiva para PNT (P170), *Lagothrix cana* de Rondônia - São Paulo - 2011

5.4 Diagnóstico histopatológico

5.4.1 Reação de imunistoquímica (IHQ)

Na histologia de pele, 1,0% (2/184) dos animais apresentou alterações, sendo um, *A. fusca*, do CETAS de Lorena (P047), e o outro *C. jacchus*, do CETAS UNIMONTE, de São Vicente (P054). Ambos apresentaram dermatite multifocal com predomínio de infiltrado linfocítico em derme.

Não evidenciou-se *Leishmania* spp. na pele dos animais por imunistoquímica.

5.5 Diagnóstico molecular

5.5.1 Extração de DNA

As concentrações de ácido nucléico provenientes das papas de leucócito apresentaram uma média de 40,17 ng/uL. A média da relação 260/280 foi de 1,6. Além disso, o DNA de algumas amostras analisadas apresentou uma boa integridade, conforme demonstrado pela corrida em gel de agarose dos produtos extraídos.

5.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

- Padronização

O ensaio da PCR variando o volume de DNA da amostra na reação, mostrou melhores resultados (aumento da sensibilidade) quando utilizou-se 3 µL de DNA.

Já o teste do gradiente de temperatura de anelamento dos primers, evidenciou que a melhor temperatura a ser usada foi a de 59 °C, pela formação de banda única e mais nítida (Figura 52).

A avaliação do emprego de diferentes aditivos (DMSO, BSA e TMAC) na PCR mostrou que o TMAC foi o que determinou melhores resultados na minimização/ eliminação das bandas espúrias, facilitando em muito a interpretação do resultado. A partir de então, passou a ser utilizado em todas as reações. A figura 53 evidencia os efeitos do TMAC no processo de otimização da PCR.

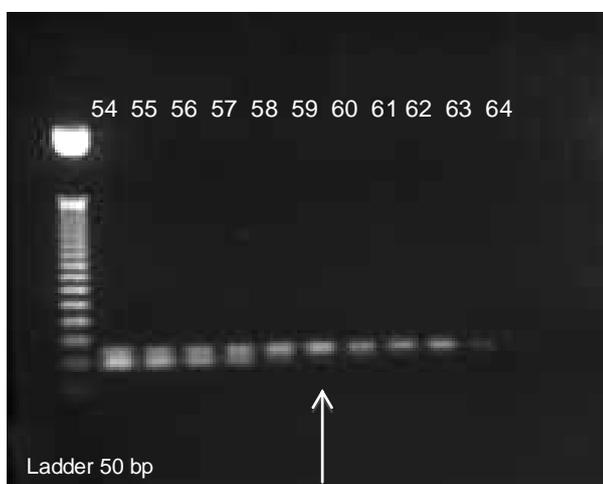


Figura 53 - Gradiente de temperatura de anelamento dos *primers*. Gel de agarose 1,5% . Seta branca indica a temperatura escolhida (59 °C). – São Paulo – 2011

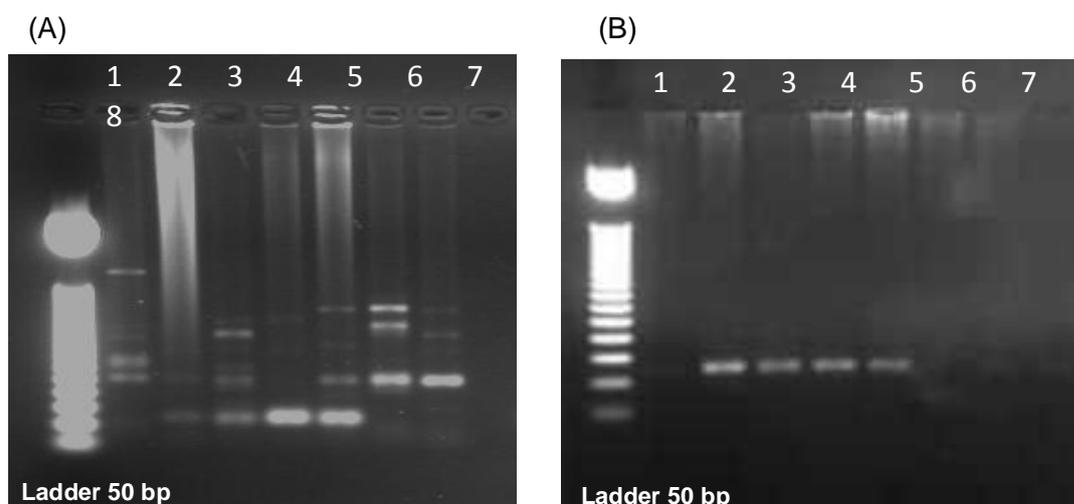


Figura 54 - Comparação entra as condições iniciais de PCR (A) e após a otimização com TMAC (B), utilizando DNA proveniente de papa de leucócitos dos mesmos primatas. Gel de agarose 1,5% - São Paulo – 2011

Sendo assim, as condições finais da PCR para o diagnóstico de *Leishmania* spp. após a otimização foram: 10,0 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega®), 1,0 µL de cada *primer* (10 mM), 3,0 µL de água DNAase free, 2 uL de TMAC (500mM) e 3 µL do DNA. E as condições de ciclagem estabelecidas foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos.

Além disso, a avaliação da sensibilidade analítica da PCR resultou na detecção de 0,01 parasitas ou 3,5 fentogramas de DNA/ uL, utilizando DNA proveniente de culturas de *L. (L.) chagasi* (Figura 54).

Todas as amostras negativas na PCR-RFLP foram positivas na PCR utilizando como alvo o gene de β -*actina* (Figura 55).

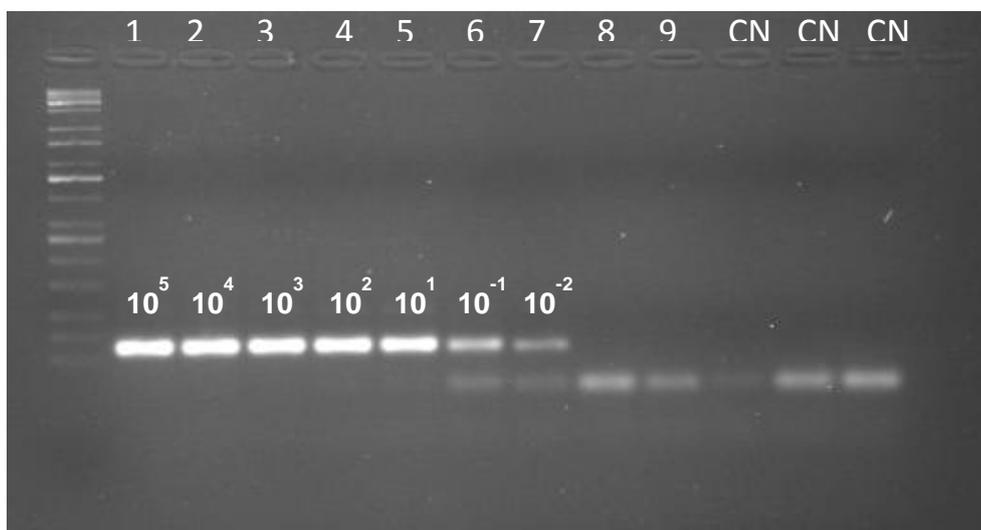


Figura 55 - Diluições seriadas do DNA provenientes de cultura de *L. (L.) chagasi* para determinar sensibilidade analítica do teste: 0,01 parasitas ou 3,5 fentogramas de DNA/ µL – São Paulo- 2011

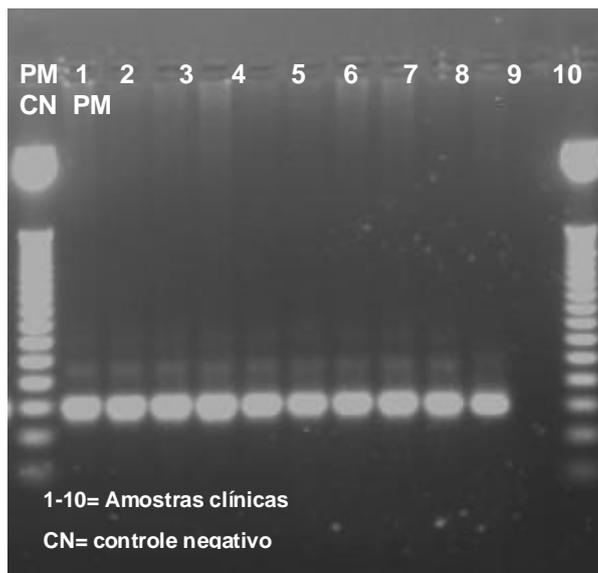


Figura 56 - Exemplo de amostras que foram positivas na PCR tendo como alvo o gene de β -actina – São Paulo – 2011

- Teste das amostras

Foram testadas papas de leucócitos de 114 animais de vida livre e 71 de cativeiro. Ao todo, 26,4% (49/185) dos animais foram positivos para *Leishmania* spp., sendo que 79,5% (39/49) pertencentes à família Cebidae e 18,3% (9/49) à Atelidae, enquanto 47% (23/49) eram machos e 53% (26/49) fêmeas.

Entretanto, do total de animais analisados neste ensaio, 8,6% (16/185) apresentaram linfadenomegalia: 7% (13/184) eram *in situ* e 1,6% (3/185) *ex situ*. Ao todo, 68,7% (11/16) dos primatas com acometimento do linfonodo foram positivos para *Leishmania* spp. e destes, 63,6% (7/11) pertenciam à família Cebidae, 9% (1/11) à Atelidae e 27,2% (3/11) à Pitheciidae. Além disso, 63,6% (7/11) eram fêmeas e 36,3% (4/11) eram machos.

Dos animais de cativeiro, 29,6% (21/71) foram positivos para *Leishmania* spp., na papa de leucócitos, sendo 62% (13/21) fêmeas e 38% (8/21) machos. Ainda, 9,8% (7/21) eram do DEPAVE-CRAS, 4,2% (3/21) do DEPAVE-Ibirapuera, 5,6% (4/21) do CETAS de Lorena, 4,2% (3/21) do CETAS UNIMONTE e 5,6% (4/21) do Zoológico de Bauru. Todos os animais que tiveram linfadenomegalia foram positivos para *Leishmania* spp. (3/3).

Dos animais de vida livre, 24,6% (28/114) foram positivos na PCR da papa de leucócitos, para *Leishmania* spp., sendo 46% (13/28) fêmeas e 54% (15/28) machos. Dos animais *in situ* positivos na PCR da papa de leucócitos, 92,3% (26/28) eram de São Joaquim da Barra (PCH), 3,6% (1/28) de Patrocínio Paulista e 3,6% (1/28) do Amazonas, BR-319. Entretanto, do total de linfonodos avaliados para os animais *in situ*, 61,5% (8/13) foram positivos para *Leishmania* spp (Tabela 5).

No ensaio em tela, computando todos os animais do estado de São Paulo, 29% (48/166) foram positivos na papa de leucócitos, sendo que destes 56,2% (27/48) eram *in situ* e 43,7% (21/48) *ex situ*. Na análise pela PCR dos linfonodos dos animais de São Paulo, 31,2% (5/16) foram positivos, sendo todos fêmeas (Tabela 5).

Para os animais da região amazônica, 5,2% (1/19) dos animais avaliados foram positivos na PCR da papa de leucócitos, sendo este o P176, *C. macrocephalus* do Amazonas, capturado na BR-319. Além disso, 31,5% (6/19) dos animais da região amazônica foram positivos na PCR de linfonodo para *Leishmania* spp. (Tabela 5).

Dos 68,7% (11/16) de animais positivos no linfonodo, 12,5% (2/16) também foram positivos na PCR da papa de leucócito.

Tabela 5 - Distribuição dos resultados positivos na PCR para os animais *in situ* e *ex situ*, em relação a São Paulo e Amazônia: (A) amostras de papa de leucócito e (B) amostras de punção aspirativa de linfonodo – São Paulo - 2008 - 2012

	(A)			(B)			
	SP	Amazônia	Total	SP	Amazônia	Total	
<i>In situ</i>	28,4% (27/95)	5,2% (1/19)	24,5% (28/114)	<i>In situ</i>	33,3% (2/6)	85,7% (6/7)	61,5% (8/13)
<i>Ex situ</i>	29,5% (21/71)	0	29,5% (21/71)	<i>Ex situ</i>	100% (3/3)	0	100% (3/3)
Total	29% (48/166)	5,2% (1/19)	26,5% (49/185)	Total	55,5% (5/9)	85,7% (6/7)	26,5% (11/16)

5.5.3 Digestão do produto de PCR – RFLP

- Padronização

Os fragmentos gerados após a restrição com *Hae III* dos produtos da PCR das amostras provenientes das cepas de *Leishmania* foram escolhidos como padrões para comparação com as amostras clínicas. A digestão da *L. (L.) chagasi* gerou dois fragmentos, um em torno de 120 pb e outro em 60 pb. A *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) lainsoni* não foram digeridas com o emprego da enzima e todos as outras cepas do subgênero Viannia, geraram três fragmentos, em torno de 120, 80 e 40 pb. (Figura 56).

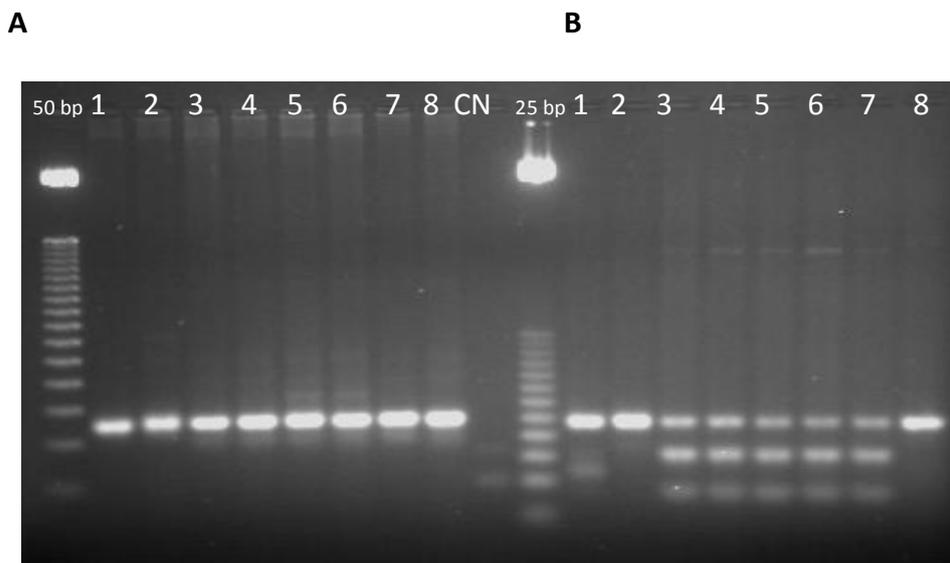


Figura 57 - PCR-RFLP de DNA proveniente de cultura, cepas padrões: 1. *L. (L.) chagasi*, 2. *L. (L.) amazonensis*, 3. *L. (V.) braziliensis*, 4. *L. (V.) shawi*, 5. *L. (V.) guyanensis*, 6. *L. (V.) naiffi*, 7. *L. (V.) lindenberg*, 8. *L. (V.) lainsoni*. Observar que a digestão da *L. (L.) chagasi* gera 2 fragmentos, sendo um em torno de 120 e outro 60 pb. A *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) lainsoni* não sofrem digestão e todos as outras cepas do grupo Viannia, geram 3 fragmentos em torno de 120, 80 e 40 pb- São Paulo- 2011

- Teste das amostras

Após o uso da enzima de restrição HaeIII, e comparação com os padrões, encontramos que do total de animais avaliados, 3,8% (7/185) foram positivos para *Leishmania* do subgênero Viannia, 11,4% (21/185) para *L. (L.) chagasi*, 1,0% (2/185) para *Leishmania* spp. podendo ser *L. amazonensis* ou *L. lainsoni* por não ter havido restrição e 10,2% (19/185) continuaram como *Leishmania* spp. por terem gerado fragmentos, porém não compatíveis aos encontrados nas cepas-padrão.

Dos 29,6% (21/71) de animais de cativeiro positivos na PCR, o parasita em 7,0% (5/71) dos casos foi classificado após a digestão. como *Leishmania* do subgênero Viannia, 4,2% (3/71) como *L. (L.) chagasi* e 16,9% (12/71) permaneceu como *Leishmania* spp.

Dos 24,7% (28/113) animais de vida livre, 0,8% (1/113) foram positivos para *Leishmania* do subgênero Viannia, 16,8% (19/113) para *L. (L.) chagasi*, 1,7% (2/113) para *Leishmania* spp., sugerindo ser *L. amazonensis* ou *L. lainsoni*, e 5,3% (6/113) continuaram como *Leishmania* spp.

Entretanto, no PCR de linfonodo, 7% (8/114) foram positivos, sendo 50% (4/8) para *Leishmania* spp. (*L. amazonensis* ou *L. lainsoni*), 25% (2/8) para *L. (L.) chagasi* e 25% (2/8) para *Leishmania* spp.

Do total de animais testados no estado de São Paulo, 4,2% (7/165) foram positivos para *Leishmania* do subgênero Viannia, 12,7% (21/165) para *L. (L.) chagasi*, 1,2% (2/165) para *Leishmania* spp., mas podendo ser *L. amazonensis* ou *L. lainsoni*, e 10,9% (18/165) continuaram como *Leishmania* spp. (Figura 61). Na PCR de linfonodo, 25% (2/8) foram positivos para *Leishmania* spp. (*L. amazonensis* ou *L. lainsoni*) (Figura 57).

Para os animais da região amazônica, 5,2% (1/19) foram positivo para *Leishmania* spp., sendo este o animal P176, *C. macrocephalus* do Amazonas, BR-319 (Figura 61). Na PCR de linfonodo, 25% (2/8) foram positivos para

Leishmania spp. (*L. amazonensis* ou *L. lainsoni*), 25% (2/8) para *L. (L.) chagasi* e 25% (2/8) para *Leishmania* spp (Figura 57).

A PCR-RFLP mostrou resultados iguais nos animais que tinham resultado positivo tanto na papa de leucócito como no linfonodo como nos casos P040, P176.

Entretanto, nem toda amostra positiva no linfonodo foi positiva no sangue, fato este observado em 87,5% (7/8) dos animais positivos na PCR de linfonodo.

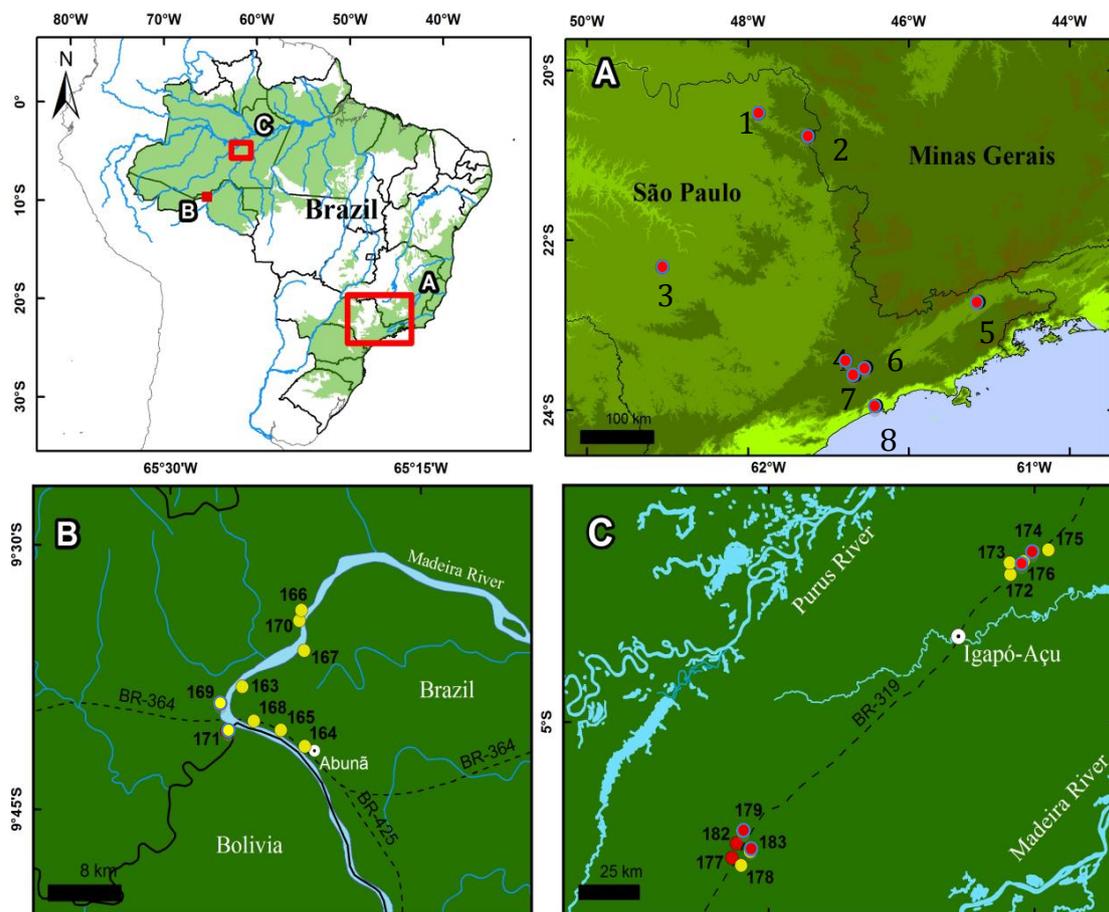


Figura 58 - Localização dos primatas positivos (pontos vermelhos) na PCR-RFLP utilizando como alvo o kDNA do cinetoplasto de *Leishmania* spp. A) Estado de São Paulo, 1- São Joaquim da Barra; 2- Patrocínio Paulista, 3- Bauru, 4- DEPAVE-CRAS, 5- Lorena, 6- PET, 7- DEPAVE-Ibirapuera, 8- CETAS UNIMONTE; B) Rondônia, Abunã; C) Amazonas, BR-319. - São Paulo/Amazônia – 2008 - 2012

5.6 Pesquisa de *Trypanosoma* spp.

- Esfregaços

Todos os animais que foram positivos no ELISA e/ou na IFI para *Leishmania* spp. foram negativos no esfregaço para pesquisa de *Trypanosoma* spp. Entretanto, em 11 animais foram encontradas formas de tripomastigostas (Figura 62), sendo 2,8% (2/71) em cativeiro (P034, P044), ambos do CETAS de Lorena, em São Paulo. Os outros 7,9% (9/113) eram positivos, de vida livre, sendo que 77,7% (7/9) eram de São Paulo (SJB-PCH) e 22,3% (2/9) de Rondônia (Figura 58).

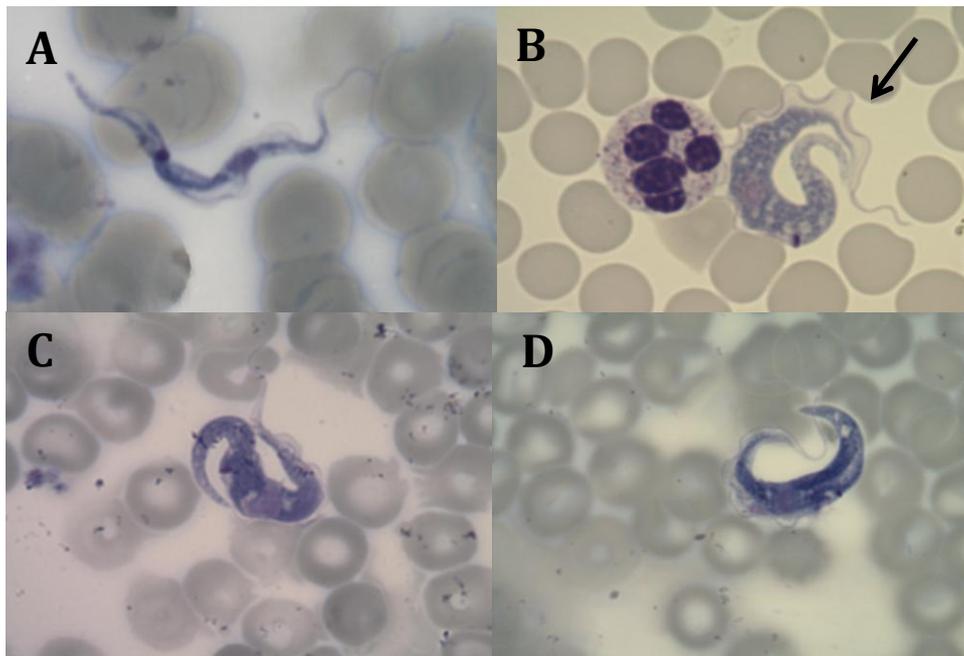


Figura 59 - *Trypanosoma* spp. encontrados em esfregaços sanguíneos de primatas neotropicais (Giemsa, x1000): A) 169, *Callicebus dubius*, Rondônia. B) 108, *Callithrix Penicillata*, São Joaquim da Barra, São Paulo, a seta indica o parasito. C) P044, *Callicebus nigrifrons*, CETAS de Lorena, São Paulo. D) P165, *Callicebus brunneus*, Rondônia – São Paulo - 2008 - 2012

Nº do Animal	Espécie	Local
P034	<i>Callicebus nigrifrons</i>	CETAS LORENA
P044	<i>Callithrix penicillata</i>	CETAS LORENA
P068	<i>Alouatta caraya</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)
P087	<i>Alouatta caraya</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)
P088	<i>Alouatta caraya</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)
P089	<i>Alouatta caraya</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)
P108	<i>Callithrix penicillata</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)
P110	<i>Callithrix penicillata</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)
P157	<i>Callithrix penicillata</i>	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5b)
P165	<i>Callicebus aff. brunneus</i>	Rondônia
P169	<i>Cebus apella</i>	Rondônia

Quadro 7 - Relação de primatas neotropicais *in situ* e *ex situ* positivos para *Trypanosoma* spp. em esfregaço sanguíneo São Paulo – 2008- 2012

- TESA-blot

Dos soros dos primatas que foram positivos para anticorpo anti-*Leishmania* no ELISA e/ou na IFI, 25% foram positivos no TESA-blot (4/16). Sendo que, 27,2% dos animais que foram positivos no ELISA para leishmania também foram no TESA-blot (3/11), e 20% que foram positivos na IFI para leishmania também foram no TESA-blot (2/10) (Figura 64).

Dos 4 animais que foram positivos no TESA, 2 foram positivos na PCR-RFLP para leishmania spp. (Figura 59)

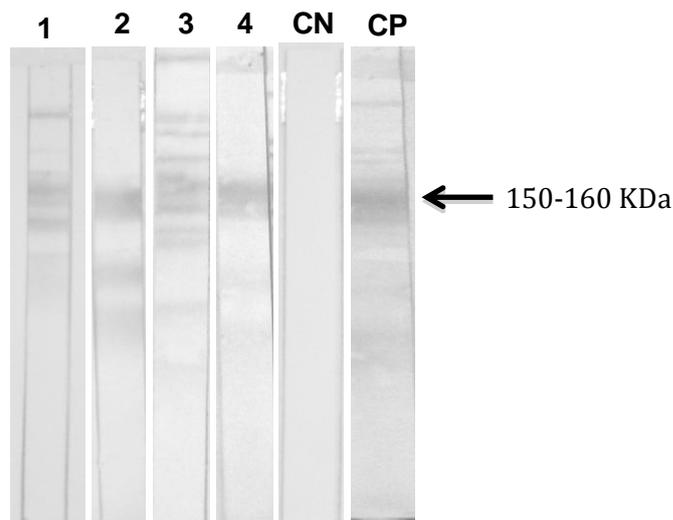


Figura 60 - TESA-blot, com antígenos de *T. cruzi* (cepa Y), testados em soros de primatas neotropicais. Amostras positivas: 1.P109, 2.P170, 3.P176, 4.P127 CN=controle negativo e CP=controle positivo. A seta preta indica a marcação positiva do teste (de 150 a 160-kDa) - São Paulo - 2011-2012

Número do Animal	Nome Científico	Local	ELISA	RIFI	TESA - Blot	PCR-RFLP
P011	<i>Callithrix penicillata</i>	DEPAVE CRAS	negativo	positivo (1:80)	negativo	negativo
P055	<i>Callithrix jacchus</i>	CETAS UNIMONTE	positivo	negativo	negativo	<i>L. chagasi</i>
P078	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	positivo (1:160)	negativo	<i>L. chagasi</i>
P093	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	positivo (1:80)	negativo	<i>L. chagasi</i>
P107	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	positivo (1:320)	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P109	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	positivo (1:320)	Positivo	<i>L. chagasi</i>
P123	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	negativo	positivo (1:80)	negativo	negativo
P127	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	negativo	Positivo	negativo
P137	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	negativo	negativo	<i>L. chagasi</i>
P147	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	negativo	positivo	negativo	negativo
P153	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	negativo	negativo	negativo
P155	<i>C. penicillata</i>	São Joaquim da Barra	positivo	positivo (1:80)	negativo	negativo
P170	<i>Lagothrix cana</i>	Rondônia	negativo	positivo (1:160)	Positivo	negativo
P176	<i>Cebus cf. macrocephalus</i>	BR-319 (AM)	positivo	Não testado	Positivo	<i>L. chagasi</i>
P178	<i>Saimiri cf. madeirae</i>	BR-319 (AM)	positivo	negativo	negativo	negativo
P190	<i>Alouatta belzebul</i>	Zoológico de Bauru	negativo	positivo (1:80)	Negativo	negativo

Quadro 8 - Distribuição comparativa dos resultados das provas sorológicas (IFI e ELISA) e molecular (PCR-RFLP) para *Leishmania* e o TESA-blot para pesquisa de anticorpo IgG anti- *Trypanosoma cruzi*, em primatas neotropicais – São Paulo - 2008 -2012

6 DISCUSSÃO

6.1 Animais & condição clínica no momento da colheita

No presente estudo foram avaliadas 191 primatas neotropicais procedentes de cinco diferentes locais *in situ*, com 120 animais avaliados, e 8 *ex situ*, com 71 animais estudados. A amostragem compreendeu 24 diferentes espécies de PNT, sendo que 74% (142/191) pertenciam a família Cebidae, 20% (38/191) à Atelidae e 6% (11/191) à Pitheciidae de acordo com a classificação proposta por PERELMAN (2011). As colheitas foram realizadas *in situ* e *ex situ*, em três diferentes biomas terrestres (Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia).

No momento da coleta, do total de animais estudados 90% (172/191) foram avaliados clinicamente. Os animais *ex situ* apresentaram quase 4 vezes mais alterações clínicas que os animais *in situ* (48% e 13% respectivamente). Estes dados corroboram com aqueles descritos na literatura no qual animais de cativeiro supostamente estão sujeitos a um estresse contínuo (SILVA et al., 2007) e conseqüentemente mais suscetíveis à imunossupressão e o aparecimento de doenças. Além disso, dependendo das condições, o cativeiro pode favorecer o contato com patógenos provenientes de diferentes animais selvagens e, muitas vezes, até mesmo animais domésticos e o próprio homem. Dentre as alterações observadas, as três principais encontradas foram o emagrecimento (41%), as alterações dermatológicas (26,5%) e as odontológicas (23, 5%).

O período de permanência de um animal em cativeiro pode influenciar a dinâmica de algumas das alterações clínicas encontradas devido ao fato do estresse poder estar relacionado com o cativeiro.

Ao avaliar o tempo de permanência destes animais em cativeiro, encontramos para o Zoológico de Bauru uma média de permanência de quase seis anos, enquanto que nos CETAS, os animais ficaram em média

oito meses. Isto condiz com os propósitos e objetivos específicos de cada tipo de instituição.

Os animais selvagens em cativeiro em um zoológico fazem parte de uma população mantida *ex situ* com objetivos institucionais que não envolvem primariamente a reabilitação e destinação dos indivíduos. Por outro lado, a grande maioria dos CETAS tem por objetivo manter, tratar e reabilitar os animais feridos, doentes ou apreendidos pelos órgãos ambientais. Sendo assim, os animais deveriam ser mantidos por um período curto nestes locais, e rapidamente destinados.

Entretanto, o grande contingente de animais provenientes do tráfico que é apreendido pelos órgãos ambientais (RENCTAS, 2001), na grande maioria das vezes, é encaminhado aos CETAS, onde permanecem por um longo período, esperando ser destinados à vida livre ou ao cativeiro. E muitas vezes, estes locais, devido ao seu próprio objetivo, não possuem a adequada estrutura que um cativeiro necessita para manter um animal por períodos prolongados. Este fato, aliado aos animais frequentemente serem provenientes de vida livre, aumenta a possibilidade de estresse e pode favorecer a imunossupressão e conseqüentemente a possibilidade de doenças. Associado a isto há a questão do contato próximo entre os diferentes animais recebidos por um CETAS. Com respeito aos sinais apresentados observou-se que o emagrecimento, as alterações dermatológicas e a ocorrência de linfonodos infartados são as alterações mais compatíveis com aquelas esperadas nas leishmanioses, sendo que *in situ* esta última estava presente em 81% dos animais clinicamente comprometidos.

A literatura aponta que a leishmaniose visceral em cães domésticos pode apresentar sinais clínicos diversos por ser uma doença multi-sistêmica, semelhantemente ao que ocorre em seres humanos, nos quais a enfermidade se caracteriza por febre, fraqueza, emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia, mucosas com sangramento espontâneo e diarreia (SILVEIRA et al., 2010). Porém, além destes sinais clínicos, os cães também podem apresentar alterações dermatológicas, com lesões, ulceradas

ou não, descamação, seborreia e alopecia, além do acometimento da conjuntiva em parte dos casos, o crescimento exagerado das unhas (onicogribose) e linfadenomegalia (ALMEIDA et al., 2005).

Considerando as alterações observadas nos PNT estudados e positivos para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp., podemos sugerir que as alterações verificadas são compatíveis com aquelas vistas na leishmaniose canina. Trabalhos complementares são necessários para solidificar esta inferência.

Além disso, de todos os animais que apresentaram linfadenomegalia, 70% (9/13) foram positivos para *Leishmania* na PCR o que corrobora com suposição acima referida.

6.2 Pesquisa de *Plasmodium* spp.

Foram avaliadas lâminas de gota espessa de 191 PNT, sendo 62,8% (120/191) de animais *in situ* e 37,2% (71/191) de animais *ex situ*. Do total de animais avaliados, 4,7% (9/191) foram positivos na gota espessa, sendo que somente 2,8% (2/71) eram animais provenientes de cativeiro, enquanto os demais 5,8% (7/120) eram de vida livre.

Do total de animais positivos na gota espessa, apenas 55,5% (5/9) foram positivos na PCR. Este fato pode ser explicado pela leitura das lâminas ter sido realizada por duas pessoas treinadas e habilitadas que avaliaram mais de 200 campos das lâminas, ou seja, estas foram lidas em quase toda a extensão, o que aumenta a sensibilidade deste teste, e corrobora para este tipo de resultado, principalmente em baixas parasitemias, como as dos símios. Além disso, apesar da extração do DNA prover boa qualidade de amostra, há a possibilidade de haver fatores inibitórios, pois não há um teste

que corresponda a 100% de sensibilidade e especificidade, o que reforça a importância de se trabalhar com um conjunto de diferentes provas diagnósticas.

6.2.1 *Ex situ*

Dos animais *ex situ* avaliados, 2,8% (2/71) foram positivos na gota espessa e ambos eram provenientes de CETAS no estado de São Paulo. Um animal, P006, do DEPAVE-CRAS, foi positivo somente no parasitológico direto (gota espessa). O fato de os testes sorológicos terem fornecido resultados negativos pode ser explicado por uma infecção recente ou baixa imunidade. Este animal nasceu neste CETAS, que fica localizado dentro do Parque Anhanguera, zona oeste da cidade de São Paulo, o que sugere haver circulação do patógeno nesta área.

Em relação ao outro animal, o P160, *Callicebus nigrifrons*, foi colhido material biológico quando este estava no CRAS-PET (Guarulhos, zona norte metropolitana). Entretanto, este animal havia recém chegado ao CETAS, sendo entregue pela polícia ambiental que o capturou no Parque da Cantareira (zona norte), devido ao fato do animal estar doente. Este animal foi positivo na PCR para *P. simium*, que corresponde ao *P. vivax* no homem (DEANE, 1992, ESCALANTE, et al., 1995). Além disso, este animal apresentou positividade para anticorpos IgG-anti *P. vivax* somente no teste de ELISA, que se mostrou mais sensível que o teste rápido.

Em 1965, no Brasil, pesquisadores, estudaram os primatas no Horto Florestal, região do Parque da Cantareira, zona norte de São Paulo. Neste trabalho, o *Alouatta fusca* (bugio-ruivo) foi apontado como o reservatório para a infecção (DEANE et al., 1995). Na década de 90, foi realizada pesquisa sorológica com amostras de guardas-florestais e funcionários do parque que tinham algum tipo de atividade relacionada à mata, sendo observada a presença significativa de anticorpos (anti-proteína circunsporozoíto, CSP) nestes funcionários (MAZZEI et al., 2009).

A espécie *Anopheles (Kerteszia) cruzi* é considerada vetor responsável pela transmissão de plasmódios em áreas de Mata Atlântica, inclusive de plasmódios símios (DEANE et al., 1970). Este anofelino, que apresenta desenvolvimento de fase larvária em bromélias e dispersão vertical, foi encontrado em abundância nas matas da Serra da Cantareira até a década de 80. Contudo, até o momento não foram verificados casos humanos de malária no local (MAZZEI et al., 2009). Entretanto, Deane et al. (1965), descreveu que um funcionário na ocasião da coleta de vetores nas matas do parque, apresentou sinais clínicos compatíveis com a doença e na análise do sangue confirmou-se a presença de formas diversas de plasmódio, compatíveis com *P. simium*. Este funcionário apresentou cura natural e o autor referiu ser esta uma infecção natural de plasmódio simiano em humanos.

Em conjunto, estes achados indicam haver a ocorrência de um quadro silvestre de malária na região da Serra da Cantareira, que até o presente momento correlacionava-o à participação dos bugios (*Alouatta*) como reservatórios.

Contudo, o presente trabalho confirma não somente que há de fato a existência de ciclo silvestre da malária nesta localidade, mas também comprova o envolvimento do *P. simium* neste processo, sendo que os primatas da espécie *C. nigrifrons* também estão envolvidos no ciclo epidemiológico, fato que não havia sido anteriormente relatado (DEANE, 1992).

A sequência de 18S obtidas na amostra positiva deste trabalho apresentou maior identidade com sequência de *Plasmódio humano* (P160 com *P. vivax*). Isto se deve ao fato de que esta região é pouco informativa na discriminação de espécies, além da ausência no *Genbank* de uma sequência de *P. brasilianum* nesta região gênica para comparação. Portanto, utilizamos para este fim (identificação da espécie) um fragmento correspondente à primeira metade do gene *cytb*. Neste caso, para a amostra P160, encontramos uma similaridade de 100% com uma sequência obtida em *P. simium* (Fonseca MRA-353, *GenBank* AY722798). De acordo com os

autores, este isolado foi obtido de um *Alouatta fusca*, do Brasil, em 1966 (COLLINS et al., 1969). Esta similaridade corrobora com a suposição de que há uma transferência recente entre estes hospedeiros e conseqüentemente enfatiza a necessidade de monitorar as populações de PNH nesta localidade, uma vez que alguns autores consideram ser esta enfermidade uma zoonose (TAZI; AYALA, 2011).

Além disso, os testes sorológicos para plasmódio mostraram haver 8,8% (10/113) dos animais *ex situ*, com presença de anticorpos (IgG) anti-*Plasmodium*, indicando a circulação deste patógeno nestes animais, no estado de São Paulo. Em todos os locais de cativeiro houve pelo menos algum animal que apresentou sorologia positiva para plasmódio, mas vale ressaltar que este resultado indica contato prévio com o patógeno e não infecção ativa. Como estes animais são provenientes de diferentes regiões, estes podem ter se infectado em diferentes locais. Por exemplo, os animais P047 (*A. Fusca*) e P159 (*Brachyteles arachnoides*), que foram positivos no ELISA e na IFI para *P. vivax*, vieram de vida livre de locais de Mata Atlântica, como a área de proteção ambiental (APA) de Cananéia-Iguape-Peruíbe e Sete Barra (SP), respectivamente. Desta forma, não é possível descartar a possibilidade de que as infecções tenham ocorrido antes do animal ser posto em cativeiro.

A literatura aponta para o fato de que pouco ainda se sabe sobre os fatos envolvidos na cadeia de transmissão da malária na região de Mata Atlântica (OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010). Contudo, acredita-se que a autoctonia da malária em São Paulo está relacionada à este bioma, como na da Serra do Mar, onde se acredita que os primatas sejam hospedeiros reservatórios naturais. Nessas regiões, estes casos são chamados de “malária das bromélias” pois algumas espécies de vetores anofelinos (subgênero *Kerteszia*) podem ser encontrados em alta densidade e têm as bromélias como um ambiente para reprodução (OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010).

Vale ressaltar ainda que de todos os animais avaliados o P047, *A. fusca*, do CETAS de Lorena, foi o único animal positivo para todas as provas

sorológicas, entretanto supõem-se que as reações de ELISA e IFI, que foram positivas para *P. falciparum*, ocorreram devido a reação cruzada com *P. vivax/P. simium* ou *P. malariae/P. brasilianum*.

O mesmo vale para os outros 50% (5/10) de animais que apresentaram positividade no ELISA para *P. falciparum*. Destes, 40% (2/5) eram do estado de São Paulo, podendo se tratar de reação cruzada. O único animal oriundo de região endêmica para *P. falciparum*, e que poderia ter tido contato prévio com o patógeno, foi o P190, *Alouatta belzebul*, do Zoológico de Bauru, proveniente do Pará.

Acreditamos que esta reação cruzada ocorra, pois os testes de ELISA e IFI com *P. falciparum* foram realizados utilizando antígenos totais de cultura de *P. falciparum* (única espécie cultivável), que podem ser gênero-específicos e, portanto, apresentar reatividade com outras espécies de *Plasmodium*. Semelhante reatividade cruzada pode ser encontrada na IFI com os antígenos de *P. vivax* e *P. malariae*, pois estes são preparados a partir de sangue de pacientes primoinfectados.

Todavia, outros dois animais provenientes da região Amazônica (Manaus, AM), também foram trazidos ao Zoológico de Bauru, P197 e P198, ambos da espécie *Ateles paniscus*. Estes apresentaram IFI positiva para *P. falciparum* (título 20 e 40, respectivamente), porém com os demais testes negativos, o que sugere a ocorrência de reação cruzada.

Outro ponto a se discutir foram os resultados encontrados no teste imunocromatográfico. Ao avaliarmos os testes sorológicos em conjunto, pode-se perceber que somente 2,8% (2/71), o P047 (*A. fusca*) e o P159 (*B. arachnoides*), foram positivos para a marcação de *P. vivax* neste teste. Este teste é de fácil uso, rápido e pode ser utilizado em temperatura ambiente, sendo assim muito útil para se trabalhar em campo ou em áreas remotas. Entretanto, sua sensibilidade para PNH mostrou ser baixa, quando comparado aos outros testes sorológicos empregados. O teste apresentou 2,8% (2/71) de positividade, sendo que o ELISA exibiu 9,8% (7/71) e a IFI 5,6% (4/71). Nos dois casos (P047, P59) em que o teste apresentou resultados positivos, a IFI mostrou títulos altos, maiores que 320. Isto sugere

que este teste rápido seja eficiente nos casos em que haja altos níveis de anticorpos presentes.

6.2.2 *In situ*

Foram avaliados 120 animais de vida livre quanto ao teste de gota espessa. Destes, 5,8% (7/120) foram positivos, sendo que 42,8% (3/7) eram do estado de São Paulo (P71, P72, P98), todos da espécie *C. Penicillata*, de São Joaquim da Barra. Para estes três animais, todos os demais testes foram negativos.

Os outros 57,2% (4/7) positivos na gota espessa eram provenientes das regiões Amazônicas, sendo 50% (2/4) de Rondônia (P169, *C. dubius*; P171, *Pithecia* sp.), e 50 % (2/4) do Amazonas (BR-319) (P177, P182, ambos *C. caligatus*).

A maior positividade encontrada para os animais amazônicos vai de encontro com a prevalência encontrada para a doença humana, uma vez que aproximadamente 99% dos casos de malária se concentram na Região Amazônica, área considerada como endêmica no país para a doença (OLIVEIRA-FERREIRA, et al., 2010).

Todos estes animais amazônicos (P169 - *Callicebus dubius*; P171 - *Pithecia* spp. e P177 e P182 - *Callicebus caligatus*) foram positivos na *nested* PCR e somente um animal (P001, *Cebus* spp.), do estado de São Paulo, em Patrocínio Paulista, foi positivo, porém com os demais testes negativos. Desta forma, 4,2% (5/120) foram positivos *in situ* na *nested* PCR. As sequências de 18S obtidas nessas amostras apresentaram maior identidade com sequência de *P. malariae*, cujo isolado foi obtido de um chimpanzé (*Pan*

trogodytes), mantido no Japão, mas que havia sido levado da África há mais de 10 anos (HAYAKAWA et al., 2009).

Novamente, isto se deve ao fato de que esta região é pouco informativa na discriminação de espécies, além de ser indisponível para comparação uma sequência de *P. brasilianum* nesta região gênica. Então, utilizamos para este fim (identificação da espécie) um fragmento correspondente à primeira metade do gene *cytb*. Neste caso, quando as sequências de *cytb* encontradas no nosso trabalho foram comparadas, encontrou-se 100% de similaridade com uma sequência depositada para *P. brasilianum* (Peruvian III, GenBank GQ355484). Esse isolado foi obtido de *Saimiri sciureus peruviansis* em Iquitos, Peru, em 1987 (COLLINS et al., 1990). Estes cinco animais positivos na PCR apresentaram similaridade de 99% com uma sequência depositada no *GeneBank* para *P. malariae* (*Plasmodium malariae*, Takaboh, GenBank AF487999). Esse isolado foi obtido de um chimpanzé (*Pan troglodytes*) mantido no Japão, mas que havia sido levado da África há mais de 10 anos (Hayakawa et al., 2009).

Sendo assim, este dado vai ao encontro com o exposto na literatura por diversos autores, que afirmam que a origem dos plasmódios humanos está relacionada com as espécies de plasmódios que infectam certos primatas, hipótese que é suportada pela semelhança que ocorre tanto em termos morfológicos quanto em níveis genéticos e imunológicos (ESCALANTE, et al., 1995; AYALA et al., 1999; FAUNDEUR et al., 2000; TAZI; AYALA, 2011, COATNEY, et al., 1971; COATNEY, 1971; DEANE, 1992). Vale ainda ressaltar que, embora nossas amostras tenham sido obtidas de três diferentes estados brasileiros (Amazonas, Rondônia e São Paulo), todas apresentaram a mesma sequência de *cytb*. Análises mais detalhadas, utilizando metodologias mais precisas para discriminação de isolados, mostraram que esses isolados não são iguais (GUIMARÃES et al., submetido).

Além disso, a literatura aponta para o fato de que a identificação das espécies de plasmódios tem claras implicações para o controle da malária nas áreas afetadas (DEANE, 1992). Sendo assim, por haver a hipótese dos

primatas serem reservatórios naturais para a malária humana, a compreensão das espécies de primatas e as respectivas espécies de plasmódio envolvidas no ciclo epidemiológico de cada região se faz de grande importância no controle das mesmas, principalmente em áreas não endêmicas.

No Brasil, 83,7% dos casos de malária humana são causados pelo *P. vivax*, enquanto o *P. falciparum* é responsável por 16,3% e o *P. malariae* é raramente observado. Entretanto, autores apontam para o fato deste último ser subestimado devido a falhas de diagnósticos (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Desta forma, os dados aqui mostrados apontam que nas regiões avaliadas há um ciclo silvestre da malária causado pelo *P. brasilianum*, que corresponde ao *P. malariae*, no qual as populações ribeirinhas poderiam se infectar.

Avaliando as provas sorológicas, observamos que 6,6% (8/120) dos animais de vida livre pesquisados apresentaram anticorpos (IgG) anti-*Plasmodium*, sendo que o ELISA e a IFI para *P. vivax* foram negativos em todos os animais.

Foram observados 3,3% (4/120) de animais positivos, no ELISA, para *P. falciparum*, sendo todos da região Amazônica, incluindo um *Lagothrix cana* de Rondônia (P166) e três primatas do Amazonas (BR-319): um *Saguinus labiatus rufiventer* (P166), um *Saimiri [ustus] madeirae* (P178) e *Cebus macrocephalus* (P179). Destes animais, 75% (3/4) foram positivos na IFI para *P. falciparum*. Somente em um animal (P166), a IFI mostrou-se também positiva para *P. malariae*. Entretanto, dois outros animais (P169, P170) de Rondônia foram positivos na IFI para *P. malariae*.

Entretanto, dois outros animais (P169, P170) de Rondônia, foram positivos na IFI para *P. malariae*, sendo que o P169 foi positivo na PCR para *P. brasilianum* (correspondente ao *P. malariae*) e o P170 foi positivo na IFI para *P. falciparum*, porém com título baixo (20).

Assim como acima referido, o *P. malariae* é raramente descrito nos casos humanos, porém, autores sugerem a possibilidade desta ocorrência ser subestimada devido à morfologia do *P. malariae* na gota espessa ser muito assemelhada à do *P. vivax*. Portanto, não seria de se estranhar as falhas de notificação do *P. malariae* nas áreas (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A prevalência de 21% (4/19) no PCR encontrada para *P. brasilianum* nos primatas da região Amazônica, associada à de 15,8% (3/19) para *P. malariae* nos testes sorológicos, corroboram a afirmação acima descrita.

Apesar da literatura afirmar que no Brasil 83,7% dos casos de malária humana são causados pelo *P. vivax*, e que na região amazônica esta espécie representa 77% dos casos (PAHO, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010), nenhum dos primatas pesquisados desta região foram positivos para *P. simium*, correspondente ao *P. vivax* no Homem.

6.3 Pesquisa de *Leishmania* spp.

6.3.1 *Ex situ*

Em nosso trabalho, foram avaliados 71 primatas de cativeiro, sendo que para o ELISA 1,4% (1/71) foi positivo em ambos os conjugados utilizados. Este animal, P055, macho, *C. Jacchus*, era proveniente do CETAS UNIMONTE, em São Vicente e havia o histórico de ter sido trazido de Santos, porém não foi informado se era domiciliado ou de vida livre. Este animal foi negativo na IFI, entretanto positivo na PCR-RFPL para *L. chagasi* e no momento da coleta não foram observadas alterações clínicas.

Avaliando os resultados da IFI, encontramos 2,8% (2/71) dos primatas *ex situ* positivos. Estes dois animais, (P011 e P190) apresentaram baixos títulos (80) neste teste e foram negativos no ELISA e na PCR. O primeiro

(P011), *C. penicillata*, estava alojado no DEPAVE-CRAS mas era proveniente da região da grande São Paulo (Bosque do Brooklin) enquanto o P190, *A. belzebul*, estava no Zoológico de Bauru e veio do Pará.

Para o diagnóstico da leishmaniose canina o Ministério da Saúde recomenda a IFI e o ELISA, devido a alta sensibilidade dos testes, tanto em animais doentes, que desenvolvem altos títulos de IgG anti-*Leishmania*, quanto em animais assintomáticos. Estes testes empregam como antígeno formas promastigotas de *Leishmania*. Entretanto, os resultados destes testes podem produzir falso - positivos e negativos, e desta forma, não permitem indicar infecção específica, uma vez que podem apresentar reações cruzadas com outros trypanosomatídeos e outros microrganismos (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; DE LIMA et al., 2010, LAURENTI, 2010).

Sendo assim, acreditamos que a discordância entre as provas molecular (PCR) e sorológicas (ELISA e IF) podem ser explicados devido ao fato das últimas utilizarem antígenos brutos e, desta forma, haver a possibilidade reações cruzadas com outros patógenos.

Entretanto, os esfregaços e o TESA-blot avaliados para estes animais foram negativos. Porém, mesmo nesta circunstância, vale ressaltar que é possível excluir a possibilidade destes animais terem entrado em contato com a leishmania ou outros patógenos e até mesmo com outras espécies de trypanossoma que não o *T. cruzi*, uma vez que as provas sorológicas indicam contato prévio ou recente, e não infecção ativa.

Em nosso trabalho, na avaliação histológica da pele, 1,0% (2/184) dos animais (2/184) apresentou alterações, sendo um, *A. fusca*, do CETAS de Lorena (P047), e o outro *C. jacchus*, do CETAS UNIMONTE, de São Vicente (P054). Ambos apresentaram dermatite multifocal com predomínio de infiltrado linfocítico em derme. Todos os animais foram negativos na imunistoquímica de pele para *Leishmania* spp.

Estas alterações histológicas são inespecíficas, entretanto não foram observados amastigotas de leishmania no HE e nem imunomarcações na imunistoquímica. Os ensaios sorológicos de ambos os animais foram

negativos e somente o P054 apresentou positividade na PCR para *Leishmania* spp.

A biópsia de pele seguida da avaliação histopatológica e imunoistoquímica é indicada para se obter o diagnóstico parasitológico, nos casos de alta parasitemia. Por exemplo, em estudo realizado em 2009 isolou-se, em cultura, parasitas de pele intacta de cães domésticos soro reativos e, desta forma, os autores sugerem ser a pele intacta um bom tecido para confirmação parasitológica, através de cultura e imunoistoquímica (MADEIRA et al., 2009).

Porém, no presente estudo a IHQ realizada em pele íntegra não se mostrou um bom teste diagnóstico para a leishmaniose em PNT, pois não foram encontrados parasitas na pele íntegra dos animais positivos nos ensaios sorológicos e/ou moleculares.

Estudos experimentais revelaram que os primatas podem ser acometidos pela doença, manifestando enfermidade de forma semelhante aos humanos, especialmente no que diz respeito ao curso da resposta primária à infecção, (SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990). Devido a este fato, alguns primatas (*Macaca mulata*; *Saimiri* spp., *Aotus* spp., *Cebus* spp., *Callithrix* spp.) têm sido utilizados em modelos experimentais, como por exemplo, para o desenvolvimento de vacinas, por serem bons modelos biológicos para se obter mais conhecimentos sobre a doença humana (GRIMALDI, 2008; SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990).

Estudo experimental realizado em macaco prego (*C. apella*), no qual inoculou-se promastigotas de *L. (L.) amazonenses*, mostrou que os animais desenvolveram lesões cutâneas no local do inóculo e em outras áreas, mas apresentaram cura completa das lesões após 3 meses. Entretanto, quando inoculados com *L. (V.) braziliensis* o parasitismo e a lesão duraram um período maior, variando entre 150 a 300 dias (SILVEIRA; MORAES; LAINSON, 1990). Em outro estudo, promastigotas de *L. (V.) lainsoni* foram inoculados em *Cebus apella* e através de avaliação histológica, observou-se que as lesões formadas regrediram completamente após 4 meses (SILVEIRA, et al. 1989).

Sendo assim, a ausência de parasitas na pele verificada no presente trabalho pode ser explicada pelo fato, conforme mostrado nos estudos experimentais acima citados, dos primatas poderem apresentar cura clínica da leishmaniose, sem evidenciação dos protozoários nos extratos cutâneos.

De acordo com a literatura, autores tem utilizado diversas substâncias agregadas à reação de PCR no intuito de aprimorá-la para a identificação única e clara do alvo pretendido (CHEVET et al., 1995; KREADER, 1996). Sendo assim, vale ressaltar que em nosso trabalho, durante a padronização desta técnica para o diagnóstico de leishmania, foram utilizadas algumas substâncias tais como o DMSO, BSA e o TMAC. Esta última se mostrou extremamente eficiente, incrementando consideravelmente a reação da PCR convencional. Acredita-se que esta substância promova um aprimoramento no rendimento dos produtos da PCR, e também por aumentar a sua especificidade (CHEVET et al., 1995), entretanto poucos relatos de seu uso foram encontrados na literatura.

Sendo assim, na PCR do sangue (papa de leucócitos), 29,6% (21/71) dos animais de cativeiro foram positivos para *Leishmania* spp., e após a restrição com a enzima *Hae III*, observamos que 7,0% (5/71) foram positivos para *Leishmania* do subgênero Viannia, 4,2% (3/71) para *L. (L.) chagasi* e em 16,9% (12/71) não foi possível identificar a espécie, permanecendo desta forma, como *Leishmania* spp. (12/71). Destes animais positivos, um apresentava linfadenomegalia e se mostrou positivo na PCR do linfonodo para *Leishmania* spp.

No Zoológico de Bauru, área endêmica para leishmaniose, encontramos 26,6% (4/15) dos animais positivos na PCR para amostras do sangue, sendo que destes 75% (3/4) foram compatíveis com *Leishmania* do subgênero Viannia e 25% (1/4) foram caracterizados como *Leishmania* spp. Na cidade de Bauru, SP, há relatos de ocorrência da leishmaniose visceral humana e canina, causada pela *L. chagasi* (BEPA, 2011), além de leishmaniose tegumentar americana (LTA), que foi descrita pela primeira vez na cidade em 1908 (Brasil 2007a). Sendo assim, os dados obtidos no presente trabalho sugerem a infecção tenha ocorrido nesta localidade, pois

fazem parte do plantel do Zoológico há mais de 3 anos. Mas, vale ressaltar que estes animais vieram de outras regiões, como centro oeste (Brasília e Goiânia) e Amazônia (Manaus), nas quais são regiões com alta ocorrência leishmaniose.

De acordo com o descrito na literatura, os PNT podem ser acometidos pelas leishmanioses, principalmente em área endêmica. Pesquisadores (MALTA et al., 2010) relataram a ocorrência de leishmaniose visceral em PNH presentes na Fundação Zoo-Botânica, em Belo Horizonte, sendo que 41,4% (17/41) destes foram positivos para *L. (L.) chagasi* pela PCR e um animal, da espécie guigó (*Callicebus nigrifrons*), veio a óbito.

Apesar das prevalências encontradas no nosso trabalho para as áreas endêmica de Bauru, serem menores das descritas por Malta et al. (2010), nossos achados comprovam a circulação destes patógenos nos PNT de cativeiro, principalmente em áreas endêmicas. Além disso, conforme descrito na literatura, estes PNT podem ser afetados clinicamente como no caso acima referido, na Fundação Zoo-Botânica, em Belo Horizonte.

Conforme relatado anteriormente os CETAS tem por objetivo manter, tratar e reabilitar os animais feridos, doentes ou apreendidos pelos órgãos ambientais e solta-los ou destina-los para outros locais em cativeiro.

Em nosso trabalho, dos animais de CETAS positivos na PCR (n=17), 41,2% (7/17) eram do DEPAVE-CRAS, no Parque Anhanguera; 23,6% (4/17) do CETAS de Lorena; 17,6% (3/17) no DEPAVE-Ibirapuera, Zona Sul de São Paulo; e 17,6% (3/17) do CETAS UNIMONTE, em São Vicente.

Ao avaliarmos as Instituições separadamente, quanto à origem dos animais e destino, percebemos que para ambas as instalações do DEPAVE, a origem dos animais é variada, porém, a maioria era proveniente da grande São Paulo, como Osasco, Perus, Jd. São Luiz, Jd. Jabaquara e o próprio Parque Anhanguera. Estes animais tiveram destinação variada, mas a maioria foi para cativeiro no estado de São Paulo. As espécies de *Leishmania*

identificadas pela PCR-RFLP foram *L. (L.) chagasi*, e *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

Todos os animais do CETAS de Lorena vieram do Zoológico de Jardinópolis (*Cebus* spp.), e dois destes foram encaminhados para o CETAS do Parque Ecológico do Tietê (PET), em Guarulhos. Um animal foi positivo na PCR-RFLP para *Leishmania* do subgênero *Viannia*, enquanto os outros três somente para *Leishmania* spp.

Já os animais do CETAS UNIMONTE vieram de locais próximos à instituição, como Santos, Praia Grande e Mongaguá, e foram identificados tanto a *L. (L.) chagasi* quanto a *Leishmania* do subgênero *Viannia*.

De acordo com o Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA, 2011), a grande São Paulo, Guarulhos e as regiões litorâneas acima citadas são classificadas como áreas silenciosas, receptíveis e vulneráveis, ou seja, tem a presença do vetor, sem casos humanos. Entretanto as regiões de Lorena e Jardinópolis, no qual também foram encontrados positividade na PCR para os animais desta regiões, são classificadas como sem casos humanos, caninos e não tendo o vetor.

Vale ainda comentar que alguns autores apontam para a necessidade de se rever a forma de controle da LVA nas grandes cidades. Atualmente, uma das principais medidas de controle está em se realizar a eutanásia dos cães soropositivos (ELISA e IFI). Entretanto, mesmo com o grande número de animais autasiados, o número de casos humanos em algumas áreas, não diminuiu e a doença se espalhou. Acredita-se que isto ocorra devido a presença de outros reservatórios que podem estar envolvidos no ciclo biológico do parasita e/ou também devido a rápida reposição de novos cães neste áreas (LAURENTI; MOREIRA, 2011).

Isto posto, podemos considerar que os dados aqui apresentados mostram que há circulação do agente nos PNT destas regiões, e conseqüentemente alertam para a necessidade de se rever a forma de controle da doença e de realizar outros estudos complementares para melhor

compreender a forma de transmissão local e o impacto que estas movimentações podem ter na circulação do agente.

6.3.2 *In situ*

Avaliando os resultados do ELISA, constatamos que dos animais de vida livre, 8,8% (10/113) foram positivos, sendo que 7% (8/113), eram de São Paulo (SJB-PCH), todos da espécie *C. penicillata*, e 1,8% (2/113) era proveniente do Amazonas. Destes animais positivos no ELISA, 50% (5/10) foram positivos na IFI e 60% (6/10) na PCR.

Este desencontro entre as provas diagnósticas, semelhantemente ao que foi discutido na pesquisa de *Plasmodium* spp., pode ser explicado pelas diferentes sensibilidade e especificidade dos testes. Desta forma, ratifica-se aqui a importância de se avaliar as provas diagnósticas em conjunto.

Como se sabe, as provas sorológicas indicam contato prévio ou recente com o patógeno, e não a infecção ativa. Em nosso trabalho, 40 % (4/10) dos animais com presença de IgG anti-*Leishmania* foram PCR negativos, ou seja, não foi identificada infecção ativa no momento da coleta. Entretanto, vale ressaltar que apesar da PCR ser um teste com alta sensibilidade pode haver fatores inibitórios nas amostras.

Autores relatam que o ELISA é a prova sorológica mais sensível, podendo ser utilizada como um teste de triagem, enquanto que a IFI, por ser mais específica, pode ser empregada como teste confirmatório (TÁVORA et al., 2007). Neste sentido, nossos resultados sugerem a adoção da estratégia acima, pois encontramos 8,8% (10/113) dos animais de vida livre positivos no ELISA, enquanto 7,0% (8/113) foram positivos na IFI.

Ainda, vale ressaltar, assim como descrito para os animais *ex situ*, que as técnicas sorológicas podem resultar em resultados falso positivos, principalmente quando se utiliza antígenos totais, favorecendo reações cruzadas com outros patógenos, principalmente os trypanosomatídeos (IKEDA-GARCIA; MARCONDES, 2007; DE LIMA et al., 2010, LAURENTI, 2010).

Sendo assim, ao avaliarmos em conjunto os dados sorológicos do ELISA e da IFI (16 animais positivo em ambos os testes) e compararmos com o dados de esfregaço e TESA-blot, observamos que nenhum destes animais foram positivos no esfregaço para *Trypanosoma* spp. Entretanto, 25% (4/16) destes foram positivos no TESA-blot (4/16), sendo que 50% (2/4) destes também foram positivos na PCR para *L. chagasi* (P109 e P176). Sendo assim, devido ao fato do TESA-blot ser uma teste específico para *T. cruzi* (UMEZAWA et al., 1996), podemos sugerir dupla infecção, ou seja, estes dois animais tiveram contato com este patógeno previamente, porém também possuíam infecção ativa por *L. chagasi*. Todavia, para os outros 50% (P127 e P170) positivos no TESA-blot, a PCR foi negativa e, desta forma, acreditamos que possivelmente os resultados obtidos na IFI e ELISA destes animais foram devidos a reação cruzada com os anticorpos (IgG) formados previamente pelo contato com o *T. cruzi*.

Da mesma forma que para os animais de cativeiro, a avaliação histológica da pele e os ensaios imunistoquímico foram negativos para os animais *in situ*.

Analisando os resultados positivos de PCR para os animais de vida livre, encontramos uma prevalência maior com este teste quando comparado com sorologia, o que é compatível com a descrição em literatura da alta sensibilidade desta técnica (PASSOS et al., 1999; VOLPINI et al., 2004).

Encontramos com a PCR do sangue, 24,5% (28/114) de animais positivos em vida livre, sendo 16,6% (19/114) para *L. (L.) chagasi*, 1,7% (2/114) para *Leishmania* spp., podendo ser *L. amazonensis* ou *L. lainsoni*, e que 0,8% (1/114) foi positivo para *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Por outro lado, 5,2% (6/114) continuaram como *Leishmania* spp.

Na PCR de linfonodo, 7% (8/114) foram positivos, sendo 50% (4/8) para *Leishmania* spp. (*L. amazonensis* ou *L. lainsoni*), 25% (2/8) para *L. (L.) chagasi* e 25% (2/8) para *Leishmania* spp.

Durante a padronização com as cepas referência de leishmanias, observamos que tanto a *L. amazonensis* quanto a *L. lainsoni*, não geraram fragmentos de digestão, por isso descrevemos apenas como *Leishmania* ssp. podendo ser uma destas duas espécies. Vale ressaltar a necessidade futura de sequenciamento na tentativa de identificação da espécie.

Em nossos resultados observamos que em dois casos (P107 e P110), as amostras também não geraram produtos da digestão, sendo portanto mantidas apenas como *Leishmania* spp. Entretanto, acreditamos que por estes animais serem do estado de São Paulo, São Joaquim da Barra, onde não há relato de *L. lainsoni*, é possível inferir que estes animais como positivos para *L. (L.) amazonensis* (CORREA; BRASIL; SOARES, 2005). O mesmo raciocínio vale para os animais amazônicos, nos quais, também em dois casos, (182 e 183), ambos *Callicebus caligatus*, obtivemos resultado para *Leishmania* spp., podendo tanto ser *L. (L.) amazonensis* ou *L. lainsoni*. Porém, como há relatos da existência na Amazônia de ambas as espécies de *Leishmania*, não foi possível inferir qual delas estava envolvida (BRASIL, 2007).

Outro interessante ponto a ser discutido foi a prevalência de 16,6% (19/114) encontrada para *L. (L.) chagasi*, causadora da leishmaniose visceral humana e canina. A maioria destes primatas era proveniente do estado de São Paulo, sendo 89,5% (17/19) de São Joaquim da Barra e 5,2% (1/19) de Patrocínio Paulista, enquanto 5,2% (1/19) era do Amazonas (BR-319). Desta forma, do total de animais estudados em São Joaquim da Barra, encontramos 20% (17/85) dos PNT positivos para *L. (L.) chagasi* enquanto a região Amazônica apresentou 5,2% (1/19).

De acordo com Boletim Epidemiológico Paulista (BEPa, 2011) a leishmaniose no estado de São Paulo está em franca expansão, sendo encontrado casos autóctones recentes em Cotia e Embu, municípios da grande São Paulo. Desde o primeiro relato de leishmaniose visceral

americana (LVA) autóctone no Estado de São Paulo, em 1999, até outubro de 2011, foram confirmados 1875 casos humanos autóctones, com 159 óbitos (BEPA, 2011).

Segundo estes dados de 2011, grande parte do nordeste do estado de São Paulo ainda mantém-se silencioso, não receptível e não vulnerável. Dentro desta classificação está a região de São Joaquim da Barra e Patrocínio Paulista (BEPA, 2011). Isto significa que não houve casos humanos e caninos autóctones e não há confirmação da presença do vetor. Entretanto, em relatório do município de São Joaquim da Barra, há a descrição de um caso de leishmaniose entre o período de 2009 a 2011, mas não informa se foi autóctone ou não (PORTAL ODM, 2009).

Todavia, os dados apontados no presente trabalho revelam que os PNT desta região estão expostos ao agente e que, desta forma, circulam nesta localidade tanto a *L. (L.) chagasi* quanto as leishmanias do subgênero *Viannia*, causadoras da LTA. Vale ressaltar que esta última foi encontrada em 11,5% (3/26) dos animais de São Joaquim da Barra positivos para *Leishmania* na PCR.

Para os animais da região amazônica, 5,2% (1/19) foram positivos na PCR de sangue para *Leishmania chagasi*, sendo este o animal P176, *C. macrocephalus* do Amazonas, BR-319. Este animal também foi positivo no ELISA, na IFI e na PCR de linfonodo. Além deste, mais 26% (5/19) foram positivos na PCR de linfonodo, todos do Amazonas, Br-319, entretanto com resultados da PCR de sangue negativos.

Esta discrepância entre os resultados corrobora com a literatura na qual autores descreveram, em estudo molecular (PCR) realizado em cães, que o linfonodo foi o tecido com maior sensibilidade nas análises por meio da PCR (PEREIRA et al., 2008).

Sendo assim, estes dados confirmam a circulação da *Leishmania chagasi* entre os primatas amazônicos, porém com uma prevalência menor que no estado de São Paulo.

Nenhum animal de vida livre do Horto de Bauru, região endêmica para a doença, foi positivo nos testes analisados.

Ao avaliar os animais positivos do estado de São Paulo, bem como as respectivas classificações taxonômicas, encontramos que 100% dos animais positivos no ELISA e na IFI, eram da espécie *Callithrix penicillata*, enquanto que na PCR 77,7% (21/27) eram *C. penicillata*, 18,5% (5/27) *A. Caraya* e 3,7% (1/27) *Cebus* spp.

Esta maior ocorrência nos Callitriquídeos (77,7%) pode ser explicado pelo comportamento dos mesmos. Estes são descritos como sendo primatas arborícolas que habitam várias fisionomias florestais podendo ocorrer inclusive em vegetação secundária, perturbada e fragmentada (REIS, 2011). Sendo assim, acredita-se que estes utilizem tanto fragmentos quanto extratos arbóreos menores que os *Alouatta* spp. chegando inclusive mais próximos ao peridomicílio, e esta característica pode ter correlação com os diferenças na ecologia dos flebotomíneos.

Os flebotomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados nas mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes. Por exemplo, nas Américas, a principal espécie de flebotomíneo envolvida com a transmissão da LVA é a *L. longipalpis*, em praticamente todas as áreas de sua ocorrência. Esta espécie é considerada oportunista, podendo sugar uma ampla variedade de vertebrados e sendo encontrada no peri e intra domicílio. Já a *L. intermedia* é a espécie incriminada como vetor para *Leishmania (Viannia) braziliensis* e tem sido encontrada nos domicílios e anexos, em plantações, principalmente as de subsistência, e em áreas de floresta. Já a *L. flaviscutellata* esta envolvida com a transmissão da *Leishmania (L.) amazonensis*. Esta espécie é pouco antropofílica, o talvez que justifica uma menor frequência de infecção humana por esta leishmania (BRASIL, 2007).

Na literatura, há poucos trabalhos relatando investigações envolvendo leishmanias em primatas de vida livre, porém alguns autores sugerem que estes poderiam ser reservatórios para algumas espécies de leishmania. Laison e colaboradores, em 1989, descreveram a ocorrência de *Leishmania*

(*Viannia shawi* em *Cebus apella* e *Chiropotes satanus* (LAINSON, et al, 1989). No Panamá foi descrito, em 1973, a ocorrência natural de *L. (V.) braziliensis* em macaco-da-noite (*Aotus trivigatus*) e em Sagui (*Saguinus geoffroyi*) (GRIMALDI, 2008; HERRER; CHRISTENSEN; BEUMER, 1973). No velho mundo, há relatos de infecção por *L. major* em macaco-verde-africano (*Cercopithecus sabaeus*) de vida livre. Em 2009, pesquisadores do Kenya investigaram, por teste sorológico (ELISA e Western blot), a prevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em área endêmica e encontraram uma taxa de 66,1% de positividade em animais assintomáticos (GICHERU et al., 2009).

Contudo, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), a mera presença de infecção em uma determinada espécie animal, mesmo em grande número, não necessariamente indica tratar-se de um reservatório. Segundo os autores, existem alguns critérios que devem ser considerados para classificar um animal como reservatório, tais como:

- a população de hospedeiro deve ser suficientemente abundante e sobreviver a um grande período de tempo para servir como fonte de alimento aos vetores.

- É necessário haver um intenso contato entre hospedeiro e o vetor para que o vetor possa picar um hospedeiro infectado e subsequentemente poder picar outro indivíduo, transmitindo o parasita à população hospedeira.

- A proporção de indivíduos que se tornam infectados durante o seu período de vida deve ultrapassar 20%, embora a prevalência possa variar de acordo com o período da estação (sazonalidade).

- O curso da infecção em um hospedeiro reservatório deve ser longo e a infecção deve ser suficientemente não patogênica para permitir que o parasita sobreviva a qualquer período sem haver transmissão

- Os parasitas devem permanecer na pele ou no sangue em número suficiente para serem transmitidos ao vetor.

Os dados apresentados em nosso trabalho permitem concluir que há transmissão de leishmanias nos primatas neotropicais das áreas estudadas,

porém, investigações futuras ainda devem ser realizadas para que se possa definir se estes animais podem ser classificados como reservatórios silvestres destes patógenos, assim como para melhor compreender o papel destes animais no ciclo epidemiológico das leishmanioses. Questões, tais como, quais vetores estão envolvidos nas diversas localidades estudadas, qual a capacidade de transmissão dos PNT para os flebotomíneos, por exemplo, estão em aberto e requerem pesquisas futuras.

6.4 Discussão geral

Na reação de ELISA para pesquisa de anticorpos (IgG) anti-*Plasmodium* e anti-*Leishmania*, foram testados dois conjugados diferentes, sendo um a proteína-A e o outro o anti-IgG de primatas, ambos conjugados ligados à peroxidase. Avaliando os resultados encontrados, foi observado que na grande maioria a proteína-A apresentou mais resultados positivos que o conjugado específico anti-IgG de primata, sendo no ELISA para leishmania 54% a mais de caso positivos utilizando a proteína-A (5,9%, 11/184 na proteína- A e 3,2%, 6/184 com o conjugado específico). Já no ELISA para detecção de IgG anti-*Plasmodium*, este mesmo fato só foi observado para o Pf (5,4%, 10/184 para proteína-A e 2.2%, 4/184 para conjugado específico)

Acreditamos que esta discordância deva-se à maior especificidade conferida à reação com o uso de anticorpo específico em relação à Proteína-A. Ou seja, esta última mostrou-se ser mais sensível e, portanto, esta pode ser utilizada como um testes de triagem. Outro fator elencado é o fato de que o anticorpo específico utilizado (Sigam®) é obtido valendo-se de sangue proveniente de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*). Porém, devido ao fato de pouco ainda se saber sobre eventuais diferenças nas imunoglobulinas das diversas espécies de primatas, é lícito supor que a queda de mais de 50% na positividade, utilizando o conjugado específico, se deva a possível

inespecificidade deste conjugado às imunoglobulinas das diferentes espécies de PNT testadas.

No presente trabalho encontramos animais do gênero *Callithrix* positivos para ambas as enfermidades, entretanto, isto foi mais pronunciado para a leishmania (100% no ELISA e na IFI, e 77,7% na PCR). Sendo assim, cabe discutirmos a importância destes achados em relação ao crescente aumento destes animais nas cidades, sendo estes considerados primatas exóticos invasores em muitas localidades, como no caso do Parque da Cantareira, em São Paulo, da cidade de Bauru e do Rio de Janeiro (COSTA, 2005; SILVA, 2009, DE MORAIS et al., 2008)

Os *Callithrix* são primatas que se adaptam muito bem em regiões fragmentadas e com poucos recursos alimentares (REIS, 2011) e são carismáticos o que promove a aproximação da população que os alimenta e tem contato com estes animais. Isto promove o aumento de recursos alimentares para estas populações o que pode favorecer ao aumento reprodutivo e conseqüentemente populacional. Além disto, o contato destes com os animais domésticos e o homem pode favorecer o surgimento de doenças (CLEAVELAND et al, 2000; CLEAVELAND et al., 2002).

Contudo, estes primatas podem ser dispersores de patógenos para outras espécie de primatas que ocorrem naturalmente no local, podendo afetar as mesmas, principalmente se foram ameaçadas de extinção como é o caso de mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), no Rio de Janeiro e do *Callithrix aurita*, em São Paulo (DE MORAIS et al., 2008; RYLAND et al., 2011; WOODROFFE, 1999).

Parte das amostras biológicas colhidas neste trabalho foram provenientes de PNT que habitam locais nos quais sofrerão impacto antrópicos e neste sentido se faz de grande valia a discussão da presença dos patógenos pesquisados nestas localidades, onde sofrerão impactos ambientais.

Duas das localidades pesquisadas, São Joaquim da Barra, em São Paulo e Abunã, Rondônia, estão sofrendo impactos pela construção de

hidrelétricas, sendo a primeira a PCH Anhanguera e a última a Hidrelétrica de Jirau. A outra localidade no Amazonas é a rodovia BR-319, na qual está sendo construída. Em todas estas localidades foram encontradas a presença dos patógenos estudados.

A história da BR-319 teve início na década de 70, sendo aberta em 1972 (877 km), no sentido norte-sul, durante o governo militar. Sua concepção se deu como parte do Plano de Integração Nacional (PIN), para promover a integração da área que até então era isolada do restante do país.

Nos anos subsequentes ao asfaltamento, a BR-319 teve pouco tráfego pois os custos de frete por navio das mercadorias produzidas em Manaus sempre foi muito inferior aos do transporte por modal rodoviário. Devido às condições do terreno e a sua pouca importância econômica, a manutenção da BR-319 sempre foi precária ou mesmo inexistente, inviabilizando também o transporte de passageiros. Sendo assim, em 1988, por questões de segurança, a linha de ônibus entre Manaus e Porto Velho foi suspensa e a rodovia interditada (CARVALHO, et al, 2009). Entretanto, desde 2005, foi anunciada a reconstrução da BR-319, visando a ligação de capital do Amazonas, (Manaus) com a de Rondônia.

A literatura aponta que as mudanças ambientais diretas no habitat, como as ações antrópicas, ou até mesmo as indiretas, como as mudanças climáticas, geralmente modificam os padrões de transmissão das doenças transmitidas por vetores. Acredita-se que as mudanças climáticas, por exemplo, possam modificar a distribuição espacial e temporal das Leishmanioses, seja diretamente pelo efeito da temperatura no desenvolvimento do parasita, ou indiretamente pelo da temperatura e outras variáveis ambientais no alcance e abundância dos flebotomíneos vetores, ou até mesmo pelas mudanças socioeconômicas que por ventura possam decorrer dos empreendimentos realizados (READY, 2008).

Exemplo de mudança direta é pode ocorrer com o desmatamento e a incidência de malária. Segundo, Olson et al. (2010), a incidência de malária está positivamente associada com maiores alterações no percentual de desmatamento. Evidenciaram que 4,3% de mudança no percentual de

desmatamento, de 1997 a 2000, na área estudada, está associado a um aumento de 48% da incidência da malária.

Além disso, as mudanças ambientais podem promover o aumento da incidência de casos de leishmaniose e malária. Segundo encontrado na literatura, as diversas transformações no ambiente, como processo migratório, esvaziamento rural, processo de urbanização crescente, desmatamento, pressões econômicas ou sociais e empobrecimento decorrente da má distribuição de renda, pode levar a uma redução do espaço ecológico da leishmaniose e facilitar a ocorrência de epidemias (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Ainda, segundo a literatura após a construção de hidrelétricas pode haver epidemias de malária, devido as mudanças nos fatores ambientes, ecológicos e sociais. Assim como as leishmanioses representam igualmente fontes importantes de preocupação (KATSURAGAWA et al. 2008)

As construções de rodovias também favorecer as mudanças no ambiente natural e conseqüentemente na dinâmica ecológica da relação hospedeiro-vetor. A rodovia promove o aumento da ocupação humana no local, entretanto, esta ocupação da terra muitas vezes ocorre de forma desordenada, sem infraestrutura adequada, com assentamentos irregulares através da grilagem de terra e isto geralmente é causado pela situação fundiária ser indefinida e os mecanismos de governança ausentes, favorecendo o desmatamento (CARVALHO et al., 2009).

Este fator pode ter influência na epidemiologia das doenças estudadas. Segundo alguns autores, quando habitações humanas tomam-se aglomeradas de gente, com escassas condições de higiene e com animais domésticos em abundância, particularmente cães, a concentração do flebotomíneo vetor *L. longipalpis* pode alcançar um nível muito alto, e há o risco do aparecimento de um surto grave da leishmaniose canina e humana (RANGEL ; LAINSON, 2003).

Até 1998, a doença no estado de São Paulo era conhecida pela detecção de casos importados, oriundos de outras regiões endêmicas do

país. Porém, em 1999, registrou-se na cidade de Araçatuba o primeiro caso humano autóctone de LVA e, desde então, esta vem ocorrendo em municípios situados na região do Planalto Ocidental Paulista. Posteriormente foi detectada em outras regiões como a de Bauru, Marília e Presidente Prudente, seguindo pelos grandes eixos rodoviários e ferroviários. Um exemplo disto é a entrada da LVA no estado de São Paulo,

Os nossos dados contribuem para ressaltar a importância de se monitorar os patógenos estudados nas regiões que sofrerão ações antrópicas e possível impacto destas mudanças na saúde das populações de primatas locais.

Além do impacto ambiental resultante destas situações, há uma crescente preocupação sobre a possibilidade de disseminação de patógenos presentes nos animais selvagens provenientes dos programas de resgate destes empreendimentos.

A fauna originária destas diferentes regiões do país acaba sendo destinadas para diferentes locais. Muitas vezes os animais são encaminhados para cativeiros em outros estados (Zoológicos ou CETAS ou Criadouros), ou soltos (introduzidos ou translocados) em áreas onde ainda sobrevivem populações selvagens. Sendo assim, alguns pesquisadores acreditam que este deslocamento poderia acarretar na dispersão de patógenos, inclusive causadores de zoonoses, para um local onde antes estes não ocorriam (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; THOISY et al., 2001; CUNNINGHAM, 1996; WOODFORD; ROSSITER, 1993).

Sendo assim, os dados obtidos vão ao encontro da inferência acima relatada. Em nosso estudo muitos animais presentes nos CETAS que foram positivos na PCR para leishmania, por exemplo, foram destinados a outros locais de cativeiro. O mesmo vale para o caso do *Callicebus nigrifrons*, positivo para *P. simium*, proveniente do Parque da Cantareira que foi transferido ao PET. De acordo com a literatura, este animal poderia ser fonte de infecção para os possíveis vetores na região. Apesar de estudo realizado no PET não relatar o encontro de *An. darlingi*, o principal vetor da malária no Brasil, encontrou a presença de *An. Albitarsis*, que em algumas áreas do

Brasil, como as litorâneas, foi incriminado como sendo a principal vetor de malária (TAIPE-LAGOS; NATAL, 2003).

Diante disto, vale ressaltar que a Instrução Normativa n 179, do IBAMA, divulgada em 2008, prevê uma serie de medidas e protocolos previamente a soltura ou reintrodução de animais e conseqüentemente de primatas. Dentre as doenças necessárias a se diagnosticar previamente a soltura ou reintrodução, encontra-se a sorologia para malária, em área endêmica e o parasitológico para *Trypanosoma cruzi*, sendo necessária a execução de hemocultura nas áreas endêmicas. As leishmanias não fazem parte da lista de doenças a serem pesquisadas (Brasil, 2008)

Os nossos achados indicam a importância não somente da realização das provas sorológicas para Malária em áreas endêmicas como também para animais provenientes de áreas não endêmicas. Devido a estes animais apresentarem, geralmente, baixas parasitemias, o mais indicado seriam os testes sorológicos e os moleculares (PCR) associados. Além disso, os nossos dados indicam a inclusão da pesquisa de leishmania para os PNT, inicialmente através do ELISA, como um teste de triagem inicial e posteriormente, se possível por ferramentas moleculares.

Entretanto vale ressaltar que muitos das instituições que mantêm os animais em cativeiro, trabalham com recursos limitados e não possuem a capacidade de diagnóstico destas enfermidades. Porém, vale ressaltar a importância de parcerias destas instituições com laboratórios de referência ou vinculados a universidade.

Finalizando, apesar de muitos estudos, pouco ainda se sabe sobre a diversidade de patógenos presentes nas populações de primatas *in situ* e *ex situ*. Muitos primatas são considerados reservatórios para uma extensa variedade de doenças que acometem os homens, como as parasitárias, virais, bacterianas, etc. (COX-SINGH, 2008; FRIEND, 2006)

Neste sentido, a compreensão da relação patógeno-hospedeiro e as possíveis alterações desta se fazem de grande importância não somente

para a conservação dos primatas neotropicais como também para as saúdes humanas e animal.

Em suma, espera-se que os resultados deste trabalho contribuam para a compreensão da epidemiologia destas infecções em primatas não-humanos e o papel destes nos ciclos destas enfermidades em nosso meio.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho investigou a ocorrência de infecção causada pelo plasmódio e pela leishmania em primatas neotropicais *ex situ* e *in situ* em áreas de Mata Atlântica no estado de São Paulo e em regiões Amazônicas.

Com relação aos plasmódios, os resultados alcançados sugerem a transmissão de *Plasmodium* spp. entre os PNT de cativeiro e de vida livre. No estado de São Paulo, nossos dados apontam para a circulação de *P. malariae* e *P. simium*, sendo este último encontrado em *Callicebus nigrifrons*. Na Amazônia, nossos dados indicam a circulação de *P. brasilianum*.

A identificação das espécies de plasmódios tem claras implicações para o controle da malária nas áreas afetadas (DEANE, 1992). Sendo assim, por haver a hipótese dos PNH serem reservatórios naturais para a malária humana, a compreensão das espécies de primatas e as respectivas espécies de plasmódio envolvidas no ciclo epidemiológico de cada região se faz de grande importância no controle das mesmas, principalmente em áreas não endêmicas.

Todavia, os dados aqui obtidos apontaram uma similaridade de 99% com uma sequência depositada no *GeneBank* para *P. malariae*. Sendo assim, pode se sugerir que nas regiões avaliadas há um ciclo silvestre da malária causado pelo *P. brasilianum*, que corresponde ao *P. malariae*, que afeta a população humana. Consequentemente, é lícito inferir que as populações ribeirinhas amazônicas podem estar expostas a este ciclo silvestre de malária.

Em relação às técnicas diagnósticas empregadas para a malária, os resultados alcançados sugerem baixa sensibilidade do teste imunocromatográfico para o diagnóstico de anticorpos (SD Biotec) de PNH, quando comparado aos outros testes sorológicos empregados. Além disso, com relação ao ELISA, nossos dados sugerem que o uso da proteína-A como

conjugado aumenta a sensibilidade do ensaio, podendo ser utilizada no ELISA como teste de triagem inicial, porém protocolos diagnósticos mais específicos se fazem necessários.

Com relação às leishmanias, nosso trabalho demonstrou que circula entre os primatas de cativeiro do estado de São Paulo a *L. (L.) chagasi*, causadora da LVA, as *L. (L.) amazonensis* e as leishmanias do complexo Viannia, causadoras da LTA.

No estado de São Paulo, onde a leishmaniose visceral está em ampla expansão, os PNT *in situ* analisados apresentaram alta prevalência para *L. (L.) chagasi*, sendo 20% (17/85) em São Joaquim da Barra, nordeste de São Paulo, região considerada silenciosa, não receptível e não vulnerável. Os primatas desta região também apresentaram-se positivos para *Leishmania* do complexo Viannia, causadora da LTA.

Ainda, os resultados encontrados apontam para a importância dos primatas exóticos invasores como possíveis dispersores de patógenos. Tal inferência é válida principalmente para os espécimes do gênero *Callithrix* spp., no qual encontramos, em São Paulo, 77,7% (21/27) infectados por *Leishmania*.

Os dados apresentados em nosso trabalho permitem concluir que há transmissão de leishmanias nos PNT das áreas estudadas, porém, investigações futuras ainda devem ser realizadas para que se possa definir se estes animais podem ser classificados como reservatórios silvestres destes patógenos, assim como para melhor compreender o papel destes animais no ciclo epidemiológico das leishmanioses. Questões, tais como, quais vetores estão envolvidos nas diversas localidades estudadas, qual a capacidade de transmissão dos PNT para os flebotomíneos, por exemplo, estão em aberto e requerem pesquisas futuras.

Outro ponto importante a ser considerado são as alterações ambientais que estão ocorrendo nas áreas de nosso estudo. Como acima referido, nossos dados indicam a transmissão destes patógenos em áreas que estão sendo impactadas por ações antrópicas e, de acordo com a

literatura, as mudanças ambientais diretas no habitat, como as ações antrópicas, ou até mesmo as indiretas, como as mudanças climáticas, geralmente modificam os padrões de transmissão das doenças, principalmente as transmitidas por vetores.

Neste sentido, a compreensão da relação patógeno-hospedeiro e as possíveis alterações desta dinâmica em relação as mudanças ecológicas, ambientais e as socioeconômicas se fazem de grande importância não somente para a conservação dos primatas neotropicais como também para a saúde pública e animal.

Sendo assim, a compreensão de que os animais selvagens podem ser fontes de infecção tanto para a população humana, quanto para as outras populações de animais selvagens e para os animais domésticos, é de extrema importância para se garantir a saúde do ecossistema e, conseqüentemente, as saúdes animal e humana.

8 REFERÊNCIAS

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. 1 ed. Terra Brasilis: São Paulo, 1995. 168p.

ALEMAYEHU T, YE-EBIYO Y, GHEBREYESUS TA, WITTEN KH, BOSMAN A, TEKLEHAIMANOT A. Malaria, schistosomiasis and intestinal helminths in relation to microdams in Tigray, northern Ethiopia. **Parassitologia**, v.40, p.259–267, 1998.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **Jornal of Molecular Biology**, v. 215, p.403-10,1990.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoir and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.523-532, 1996.

AMARAL V.F.; RANSANATTO, V.A.O.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MOLINARO, E.; FERREIRA V.; COUTINHO, S.G.; MCMAHON-PRATT, D.; GRIMALDI G.Jr. Leishmania amazonensis: the asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 82, p. 34-44, 1996.

AMARAL V.F.; TEVA, A.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; SILVA, A.J.; PEREIRA, M.S.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; COUTINHO S.G.; PIRMEZ, C.; BEVERLEY, S.M.; GRIMALDI JR, G. Study of the Safety, Immunogenicity and Efficacy of Attenuated and Killed *Leishmania (Leishmania) major* Vaccines in a Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) Model of the Human Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 97(7): 1041-1048, Outubro, 2002.

ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 231–238, 2006.

AYALA FJ, ESCALANTE AA, RICH SM. Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. **Parassitologia** v.41, n.1-3, p.55-68, 1999.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine Leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: par tone. **Trends in parasitology** v.24, n.7, p.324-330, 2008.

BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista. Comitê de Leishmaniose Visceral Americana da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SP, Brasil. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em novembro de 2011. **BEPA**, v.8, n.96, p.32-36, dez, 2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa/pdf/bepa9611.pdf>. Acesso em: 7. Janeiro. 2012

BICKEL SE, CATTERSON T, CROW M, FISHER WA, LEWANDOWSKI A, STOUGHTON M, TAYLOR II JF (2003) Environmental Guidelines for Development Activities in Latin America and the Caribbean. Prepared for: USAID/LAC/RSD/E. Environmental Policy and Institutional Strengthening Indefinite Quantity Contract (EPIQ) 2003. Disponível em [:http://www.irg ltd.com/Resources/Publications/LAC/2003-12%20LAC%20Guidelines-Part%201.pdf](http://www.irg ltd.com/Resources/Publications/LAC/2003-12%20LAC%20Guidelines-Part%201.pdf) . Acesso em: 5. Junho. 2011.

BORASCHI, C.S.S.; NUNES, C.M. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral urbana no Brasil. **Clínica veterinária**, n.71, p. 44-48, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 112 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 320p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral / Ministério da Saúde**,– 1. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2006b, 120 p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf

Acesso em: 27/jun/2011

BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS –IBAMA. instrução normativa IBAMA nº 179, de 25 de junho de 2008, 2008. Disponível em: <http://www.mp.rs.gov.br/ambiente/legislacao/id4757.htm>.

Acessado em: 3.outubro.2011

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde**, – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007, 182 p.

Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf.

Acesso em: 27/jun/2011

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. D'Andrea, P.S.; Teixeira, B.R. Rocha, M.G. Doença de Chagas. Estudo de pequenos mamíferos silvestres reservatórios de zoonoses. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, 2012. Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=108>. Acessado em: 3.janeiro. 2012.

BRUCE-CHWATT, L.J. **Essential Malariology**, 2nd edition. London: William Heinemann Medical Books, 1985. 364p.

BUENO, M.G.; LAURENTI, M.D.; MATTA, V.R. et al. Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em primatas neotropicais cativos e de vida livre no Estado de São Paulo. In: 14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 2010. Uberaba. *Anais da 14ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses*, 2010, p.110

CAMARGO, M. **Introdução às técnicas de imunofluorescência**. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1973. Apostila.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention, 2011a. **A-Z Index: Malaria. About Malária.** Disponível em: www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/map.html. Acesso em: 20. Nov. 2011

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention, 2011b. **A-Z Index: Malaria. About Malária.** Disponível em: www.cdc.gov/malaria/about/biology. Acesso em: 25.Nov.2011

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention, 2011c. **A-Z Index: Malaria. About Malária.** Disponível em: www.cdc.gov/malaria/about/distribution Acesso em: 25.Nov.2011

CHAPMAN, C.A.; ONDERDONK, D.A. Forests Without Primates: Primate/Plant Codependency. **American Journal of Primatology**, v.45, p.127–141, 1998.

CLEAVELAND S., HESS G.R., DOBSON A.P., LAURENSEN, H.I., ROBERTS M.G., WOODROFFE R. Ecology of Wildlife Diseases. The role of pathogens in biological conservation. Chapter 8,. Hudson, P.J., Rizzoli A., Grenfell B.T., Heesterbeek H., Dobson A.P. Oxford University Press, New York, US. 2002. pp. 139-150.

CLEAVELAND, S.; APPEL, M.G.; CHALMERS, W.S.; CHILLINGWORTH, C.; KAARE, M. DYE, C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n.3-4, p. 217-227, 2000.

CAMARGO-NEVES, V.L.F. A leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.4, n.48, 2007.

CASTILHO TM, Shaw JJ and Floeter-Winter LM. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.2, p. 540-46, 2002.

CARVALHO, R.. ENRICO BERNARD, MARIANA PAVAN, MARIANO CENAMO, MARINUS HOOGMOED, FABIANO WALDEZ, FÁBIO ROHE, MEREL VAN DER MARK, RONI LIRA. BR-319 PROJETO DE RE-CONSTRUÇÃO: Contribuições ao processo de Licenciamento e Análise do Estudo de Impactos Ambientais. Manaus – Amazonas, 2009.

Disponível em: <http://biblioteca.planejamento.gov.br/biblioteca-tematica-1/textos/sustentabilidade-ambiental-clima-meio-ambiente/texto-120-2013-parecer-sobre-o-estudo-de-impacto-ambiental-eia-da-br-319.pdf>. Acesso em: 03.abril.2011.

CICMANEC, J.L.; NEVA, F.A; MCCLURE, H.M.; LOEB, W.F. Accidental infection of laboratory-reared *Macaca mulatta* with *Trypanosoma cruzi*. **Laboratory Animal Science**, v.24, p.783-787, 1974.

COATNEY GR. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.20, p.795– 803, 1971.

COATNEY G.R.; COLLINS W.E.; WARREN M.; CONTACOS P.G. **The Primate Malarias**, U.S. Washington: Government Printing Office, 1971. 366p.

COLLINS, W.E.; CONTACOS, P.; GUINN, E.G. Observations on the sporogonic cycle of *Plasmodium simium* da Fortseca. **Journal Parasitology**, v.55, p.814-816, 1969.

CORREA, J.R.; BRASIL, R.P.; SOARES, M.J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergente *Leishmania* of the *Viannia* subgenus - A mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, v.100, n.6, 2005.

COSTA, L. P.; LEITE, Y.R.L; MENDES, S.L.; DITCHFIELD, A.D. Conservação de mamíferos do Brasil. **MEGADIVERSIDADE** , v.1, n. 1, p.103-112, 2005.

COSTA, T.A.C.; ROSSI, C.N.; LAURENTI, M.D. et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.3, p.213-217, 2010.

COUTO, R.D.; LATORRE, M.R.D.O; DI SANTI, S.M.; NATAL, D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.1, p. 51-58, 2010.

COX-SINGH J, DAVIS TME, LEE KS, SHAMSUL SSG, MATUSOP A, ATNAM S, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, n.2, p. 165-171, 2008.

CUNNINGHAM, A.A. Disease Risk of Wildlife translocation. **Conservation Biology**, v.10, n.2, p.349-353, 1996.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. **Science**, v. 287, n.5452, p.443-449, 2000.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P.; NETO, J.F. Studies on transmission of Simian Malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brasil. **Bulletin of the World Health Organization**, v.35, n.5, p. 805-808, 1965.

DEANE, L.M.; NETO, J.A.F. Malária de macacos no estado de Goiás, Brasil: encontro de Guaribas, *Alouatta caraya* infectados com *Plasmodium brasilianum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.15, n.3, p.107-111, 1973.

DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J.A.; DEANE, S.P.; SILVEIRA, I.P. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.64, n.647, 1970.

DEANE, L.M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.3, p.1-20, 1992.

DEANE, L.M.; NETO, J.A.F.; SITÔNIO, J.G. Novo Hospedeiro Natural do *Plasmodium Simium* e do *Plasmodium Brasilianum*: o Mono, *Brachyteles arachnoides*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.10, n.5, p.287-288, 1968.

DEANE, L.M.; NETO, J.A.F. Encontro do Plasmodium brasilianum em macacos do território federal do Amapá, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.11, n.3, p.199-202, 1969.

DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U.G. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p. 463–469,1994.

DE LIMA VM, FATTORI KR, MICHELIN AF, DA SILVEIRA NETO L, VASCONCELOS RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.173, n. 3-4, p.330-333, 2010.

DE MORAIS Jr., M. M.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; GRATIVOL, A. D.; ANDRADE, C. C. e LIMA, C. A. Os sagüis, *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*, como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão-dourado. In: Oliveira, P. P.; Grativol, A. D. e Ruiz-Miranda, C. R. (orgs.), *Conservação do mico-leão-dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada*. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, v. 1, p. 86-117, 2008. Disponível em: http://www.micoleao.org.br/ptg/como_trabalhamos/divulgando/livros/conservacao_mico_leao_dourado.pdf). Acesso em: 3.outubro. 2011

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, n.3, p.239-243, 2001.

BEPA. Divisão de Zoonoses. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Situação epidemiológica da malária no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5, n. 56, 2008.

DUARTE, A.M.R.C.; MALAFRONTA, R.S.; JR.C.C; CURADO,I; PAIVA, B.R.; MAEDA, A.Y.; YAMASAKI, T.;SUMMA, M.E.L.; NEVES, D.V.D.A.; OLIVEIRA, S.G.; GOMES, A.C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys are reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n.2, p.179-185, 2008.

ELLIS B.R.; WILCOX, B.A. The ecological dimensions of vector-borne disease research and control. **Cadernos de Saúde Pública**, v.25 Sup.1, p.155-167, 2009 .

ESCALANTE, A.A.; BARRIO, E.; AYALA, F.J. Evolutionary origin of human and primates malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, n.4, p.616-626, 1995.

FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum* / *P. malariae* malária. **Parasitology**, v.120, n. 1, p.11-21, 2000.

FERREIRA A.W.; SANCHEZ M.C.A. Malária humana: Padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos epidemiológicos. **Rev Inst Med trop Sao Paulo**, v.30, p. 137-46, 1988.

FERREIRA, S.F.; DIEGO, V.H. Habitat fragmentation and primate conservation in the Atlantic Forest of eastern Minas gerais, Brazil. **ORYX**, v.29, n.3, p.192-196, 1995.

FERREIRA, U.M.; FORONDA, A.S.; SCHUMAKER, T.T.S. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**, São Paulo: manole, 2003. p. 37-42.

FRANCINO O.; ALTET L.; SÁNCHEZ-ROBERT E.; RODRIGUEZ A.; SOLANO-GALLEGO L.; ALBEROLA J.; FERRER L.; SÁNCHEZ A.; ROURA X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.137, n.3-4, p.214-221, 2006.

FRIEND, M. **Disease Emergence and Resurgence: The Wildlife-Human Connection**: Reston, Va., U.S. Geological Survey, Circular 1285, 2006. 400 p.

GALINSKI, M.R.; BARNWELL, J.W. Monkey malaria kills four humans. **Trends in Parasitology**, v. 25, n.5, p.200-204, 2009.

GICHERU, M.M; JENEBY, M.M; MACHARIA, J.C. et al. Prevalence of antibodies and cell mediated immune response against *Leishmania major* in feral nonhuman primates from Kenya. **Acta tropica**, v.109, p.136-140, 2009.

GOMES, A.C.; NEVES, V.L.F.C. Estratégia e perspectivas de controle da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v.31, n.6, p. 553-558, 1998.

GRIMALDI Jr.,G. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *leishmania* candidate vaccines – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.7, p. 629-644, 2008.

GRAMICCIA, M., Recent advances in Leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v.181, n.1, p. 23-30, 2011.

GUIMARÃES, L.O; WUNDERLICH, G.; BUENO, M.G.; RÖHE, F. ; CATÃO-DIAS, J.L.; NEVES, A.; MALAFRONTTE, R.S.; CURADO, I.; KIRCHGATTER, K. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. **Acta Tropica**. Submetido.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H.A.; BEUMER, R.J. Reservoir host of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.22, p.585-591, 1973.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n.p. 1191-1199, 1999.

HUNTER; J.M.; REY, L.; SCOTT, D. Man-made lakes and man-made diseases. **World Health Forum**, v.4, p.177–182, 1983.

IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clínica Veterinária**, n.71, p.34-42, 2007.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. SSc, Primate Specialist group. Global primate Biodiversity, 2008. Disponível em: <http://www.primate-sg.org/diversity.htm>. Acesso em: 5 mar. 2011.

JESUS, J.R.; ARAUJO, F.A.P. Leishmaniose tegumentar americana: uma visão da epidemiologia da doença na região sul. **Clinica Veterinária**, ano XII, n.71, p. 82-84, 2007.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infection diseases. *Nature*, v.451, n.21, p. 990-993, 2008.

KARESH W.B.; COOK, R.A.; BENNETT, E.L.; NEWCOMB, J. Wildlife Trade and Global Disease Emergence. **Emerging Infection Diseases**, v.11, n.7, p.1000-1002, 2005.

KATSURAGAWA, T.H.; GIL, L.H.S.; TADA, M.S.; DA SILVA, L.H.P. Endemias e epidemias na Amazônia. Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira. Um caso de escolar. **Estudos Avançados**, v.22, n.64, 2008.

KIMURA M, KANEKO O, QING L, MIAN Z, KAWAMOTO F, WATAYA Y, OTANI S, YAMAGUCHI Y, TANABE K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v.46, n. 2, p. 91-95, 1997.

KREADER, C. A. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Mar, v.62, n.3, p. 1102–1106, 1996.

KUDÓ M. E. **Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de P. vivax (MSP1₁₉) em grupos populacionais expostos à malária.** São Paulo. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Experimental. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p. 210–215, 2002.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses.** São Paulo, 2010, 84p. Tese (Professor Livre-Docente) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2010.

LAURENTI, M. D.; MOREIRA, M.A.B. Euthanasia for the Zoonosis Control Program. In: KURE, J. Eutanasia – **The “Good Death”Controversy in Humans and Animals.** Croatia:InTech, 2011. P.219-232.

LAINSON, R.; ISHIKAWA, E.A.Y.; SILVEIRA F.T. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p.630-631, 2002.

LAINSON, R.; BRAGA, R.R.; DE SOUZA, A.A.A.; POVOA, M.M.; ISHIKAWA, E.A.Y.; SILVEIRA, F.T. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n.; a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Ann. Parasitol Hum Comp**, v.64, n.3, p. 200-207, 1989.

LERER, L.B.; SCUDDER, T. Health Impact of Large Dams. **Environmental Impact Assessment Review**, v.19, n.2, p.113–123, 1999.

LIMA, G.F.M.C. **Análise comparativa da PCR em tempo real, nested PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em pool, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala.** São Paulo, 2011, 126p. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2011

MADEIRA, M.F.; FIGUEIREDO, F.B.; Pinto, A.G.S. et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? *Research in Veterinary Science*, v.87, p.260–262, 2009.

MALTA, M.C.C., TINOCO, H.P., XAVIER, M.N. et al. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.1-2, p.193-197, 2010.

MAST, R.B.; MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A. Status and Conservation of neotropical primates and their habitats. **Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians**. Annual Conference, Puerto Vallarta, México, 1996. p.?

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C.L.; BECK, H.P.; FELGER, I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p. 3147–3153, 2003.

MAIA-ELKHOURY, A.N.; ALVES, W.A.; DE SAOUZA-GOMES, M.L.; DE SENA, J.M.; LUNA, E.A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v.24, n.12, p.2941-2947, 2008.

MARRELLI, M. T.; MALAFRONTA, R. S.; SALLUM, M. A.; NATAL D. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. **Malaria Journal**, v.6, n.127, 2007.

MAZZEI K.; ROSA A.R.; ARROMBA A.L.; DUARTE A.M.C.; BARLETA C.; WALDMAN C.C.S.; SANTANA C.; SABBO C.; JUNQUEIRA D.M.A.G.; SILVA E.A.; BARATA E.A.M.F.; OHLWEILLER F.P.; DESCIO F.; KATZ G.; PEREIRA H.F.A.; ROMANO I.S.; SEI I.A.; CURADO I.; ALBUQUERQUE J.O.M.; ALVES J.C.M.; ALEXANDRE L.B.S.P.; SANTOS M.G.S.; BUZZAR M.R.; PORT-CARVALHO M.; ESTON M.R.; SILVA M.M.S.; FRANCESCHI N.C.S.; GLASSER P.R.; GENTIL R.C.; GONÇALVES R.C.; PAÇO R.S.; OLIVEIRA R.C.; SILVA R.A.; D'AURIA S.R.N.; MARQUES S.; ARAUJO V.C.; TARDELLI V.S.A.; MORIMOTO W.T.M.

Levantamento e propostas de ação para as principais zoonoses dos Parques Estaduais Alberto Löfgren e da Cantareira. **IF Série de Registros.**, São Paulo, n. 39, p. 25-41, maio 2009. Disponível em : http://www.iflorestal.sp.gov.br/publicacoes/serie_registros/IFSR39/Levantamento%20e%20propostas%20de%20a%C3%A7%C3%A3o....pdf Acessado em: 21.maio.2011

MBORA, D.N.M; MCPEEK, M.A. Host density and human activities mediate increased parasite prevalence and richness in primates threatened by habitat loss and fragmentation. **Journal of Animal Ecology**, n.78, p. 210–218, 2009.

MITTERMEIER, R.A.; OATES, J.F.; EUDEY, A.E.; THORNBACK, J. Primates Conservation. In: MITCHELL, G.; ERWIN, J. **Comparative Primate Biology**: New York: Alan R.Liss, Inc., 1986. p. 3-72.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245–252, 2007.

NETO, J.A.F; DEANE, L.M. Novos hospedeiros do Plasmodium brasilianum no estado do Acre, Brasil: o oacari *Cacajao rubicundus rubicundus*, o Guariba *Alouatta seniculus seniculus* e o macacO barrigudo *Lagothrix lagotricha poeppigii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.15, n.3, p.112-115, 1973.

[NUNES CM, DIAS AK, GOTTARDI FP, DE PAULA HB, DE AZEVEDO MA, DE LIMA VM, GARCIA JF.](#) Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p.5-9, 2007.

OIE, World Organization for Animal Health. Training manual on wildlife diseases and surveillance. **Workshop for OIE National Focal Points for Wildlife, 2010.**

Disponível em:

www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Internationa_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife.pdf. Acesso em: 23.dez.2011.

OLIVEIRA-FERREIRA J.; LACERDA M.V.; BRASIL P.; LADISLAU J.L.; TAUIL P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v.9, n.115, 2010.

OLSON, S.H.; GANGNON, R.; SILVEIRA, G.A.; PATZ, J.A.. Deforestation and Malaria in Mâncio Lima County, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.7, 2010.

PASSOS, V.M.A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P.A.F.; VOLPINI, A.C.; GONTIJO, C.M.F.; DEGRAVE, W.; ROMANHA, A.J. *Leishmania (Viannia) brasiliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, 72, p.251-258, 1999.

PERKINS S.L., SCHALL J.J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 88, n.5, p.972–978, 2002.

PERELMAN, P.; JOHNSON, W.E.; ROOS, C.; SEUAÑEZ, H.N.; HORVATH, J.E.; MIGUEL A. M. MOREIRA, M.A.M.; KESSING, B.; PONTIUS, J.; ROELKE, M.; RUMPLER, Y.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.; O'BRIEN, S.J.; PECON-SLATTERY, J. A Molecular Phylogeny of Living Primates. **PLoS Genetics**, v.7, n.3, p. 1-17, 2011.

PAHO, WHO. Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2008. **Pan American Health Organization**, Washington, DC, 2010, 262p.

PEREIRA, SRF; CARVALHO, CC.; SILVA, MH; CASTELO BRANCO, PA; NASCIMENTO, FRF; REBELO, JMM; GOULART, LR. Determinação da carga parasitária em diferentes tecidos de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi por PCR quantitativa. IN: **54º Congresso Brasileiro de Genética**, 2008, Bahia. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008. p. 273.

PEREIRA-CHICCOLA, V.L.. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6, n.68, 2009.

PORTAL ODM. Acompanhamento Municipal dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio. Relatórios Dinâmicos, Indicadores Municipais, p1-10, 2009. Disponível em: www.portalodm.com.br. Acesso em: 12.Dez.2011.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.136, p.1915-1934, 2009.

RANGEL, E. F. & LAINSON, R. 2003. Ecologia das leishmanioses. In: RANGEL, E. F. & LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 291-311

READY, P.D. Leishmaniasis emergence and climate change. In: World Organization for Animal Health. Climate change: impact on the epidemiology and control of animal diseases. **Revue Scientifique et Techniques de L Office International des Epizooties**, v.27, n.2, p.399-412, 2008.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Mamíferos do Brasil**. 2 ed. Londrina, 2011. 439p.

REI, L. Leishmaníases Cutâneas e Mucocutâneas do Novo Mundo. In: REI, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008a. p.50-62.

REI, L. Leishmaníase Visceral. In: REI, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008b. p.63-70.

RENTAS. Rede Nacional contra o tráfico de animais Silvestres. **Primeiro relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre, 2001**. Disponível em: www.rentas.org.br/pt/trafico/rel_rentas.asp. Acesso em: 04.jul.2011

ROSSI, C.N. **Ocorrência de *Leishmania* sp. em gatos do município de Araçatuba – São Paulo - Brasil**. São Paulo, 2007, 48p. Dissertação (Mestre) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal.

ROWE, N. **The pictorial guide to the living primates**. 1 ed. New York: Pogonias Press, 1996, 263p.

RUBIO, J.M.; BENITO, A, ROCHE J, BERZOSA PJ, GARCIA ML, MICÓ M, EDU M, ALVAR J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *P. vivax* infection in equatorial guinea. **American Journal of Tropical Medicine**, v.60, n.2, p.183-187, 1999.

RYLAND, A.B.; SCHENEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIE, R.A.; GROVES, C.P.; RODRIGUEZ-LUNA, E. An assessment of the diversity of New World Primates. **Neotropical Primates**, v.8, n.2, p.261-293, 2000.

RYLANDS, A.B.; KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; DE OLIVEIRA, M.M. *Callithrix aurita*. In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.

Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/3570/0/full>. Acesso em: 13.Janeiro.2012.

SANCHEZ M.C.A.; ÁVILA S.L.M.; QUARTIER, V.P.; FERREIRA A.W. Malaria serology: performance of six *Plasmodium falciparum* antigen extracts and of three ways of determining serum titers in IgG and IgM-ELISA. **Revista do Instituto Medicina tropical Sao Paulo**, v. 35, p. 495-502, 1993.

SANTOS, L.C.; CUROTTO, S.M.R.; MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; NASCIMENTO, M.J.C.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; KIRCHGATTER, K. Detection of *Plasmodium* sp. In capybaras. **Veterinary Parasitology**, v.163, n1-2, p.148-151, 2008.

SCHLOEGEL, M.L.; DASZAK, P. D; NAVA, A. Medicina da conservação: buscando causas e soluções práticas para doenças infecciosas emergentes. **Revista Brasileira de Conservação da Natureza**, v.3, n.2, p. 29-41, 2005.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; GARCEZ, L.M.; SOUZA, A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A. Leishmaniose Cutânea Experimental: I-sobre a susceptibilidade do primata *Cebus apella* (Cebidae) à infecção pela *Leishmania* (Viannia) Lainsoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, n.3, p.125-130, 1989.

SILVEIRA, T.F.; MORAES, M.A.P.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniose cutânea experimental III- aspectos histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (Primates: Cebidae) por *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (leishmania) amazonensis*. **Revista de Medicina Tropical**, v. 32, n.6, p. 387-394, 1990.

SILVEIRA FT; LAISON R; CORBETT C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v.99, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA FT, LAINSON R, CRESCENTE JA, de SOUZA AA, CAMPOS MB, GOMES CM, LAURENTI MD, CORBETT CE. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum* *chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, n.8, p.529-35, 2010.

SINAN/SVS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Serviço de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010.** (2011a). Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Ita_casos08_09_11.pdf. Acesso em: 27.agosto.2011.

SINAN/SVS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Serviço de vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, (2011b). **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**. 1990 a 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf. Acesso em: 27.agosto.2011.

SNOUNOU, G.; SINGH, B. Methods in Molecular Medicine. **Malaria Methods and Protocols**, Totowa: Humana Press, 2002. p.189-203.

SNOUNOU G, VIRIYAKOSOL S, ZHU XP, JARRA W, PINHEIRO L, do ROSARIO VE, THAITHONG S, BROWN KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology** , v.61, p.315–320, 1993.

SILVA, G.L. Avaliação dos impactos causados pela introdução do sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) sobre a comunidade de aves e serpentes nativas do interior de SP. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente** . V.XII, n15, 2009. Disponível em:

<http://sare.unianhanguera.edu.br/index.php/anuic/article/viewFile/2431/956>.

Acesso em: 3 abr 2010.

SILVA, J.C.R.; CORREA, S.H.R. Manejo Sanitário e Biosseguridade. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p. 1226-1244.

SINGH B, BOBOGARE A, COX-SINGH J, SNOUNOU G, ABDULLAH MS AND RAHMAN HA. A genus species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.4, p. 687-692,1999.

SNOUNOU G, VIRIYAKOSOL S, ZHU XP, JARRA W, PINHEIRO L, DO ROSARIO VE, THAITHONG S, BROWN KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology** , v.61, n.2, p.315–320, 1993.

TAIPE-LAGOS, C.B.; NATAL, D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.3, p.275-279, 2003.

TAVORA, M.P.F.; Pereira, M.A.V.C.; Silva, V.L.; Vita, G.F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas EIISA e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p.482-483, jul-ago, 2007.

TEK NG, O.; OOI, E.E.; LEE, C.C.; LEE, P.J.; CHING NG, L; WONG, P.S.; MING TU, T.; LOH J.P.; LEO Y.S. Naturally Acquired Human *Plasmodium knowlesi* Infection, Singapore. **Emerging Infection Diseases**, v.14, n.5, maio, 2008.

TRAPE JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p.181-4, 1985.

THOISY, B.; VOGEL, I; REYNES, J.M.; POULIQUEN, J.F.; CARME, B.; KAZANJI, M.; VIÉ, J.C. Health Evaluation of Translocated Free-Ranging Primates in French Guiana. **American Journal of Primatology**, v. 54, n.1, p.1–16, 2001.

VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, S.V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M.D.; BIONDOD, A.W.; LEUTENEGGERE, C.; MARCONDES, m. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology** 178 (2011) 22–28.

VOLTARELLI, E.M.; ARRAES, S.M.A.A.; PERLES, T.F.; et al. Serological Survey for *Leishmania* sp. Infection in Wild Animals From The Municipality of Maringá, Paraná State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.15, n.4, p.732-744, 2009.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.A.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) brisiliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n.1, p.31-37, 2004.

WOODFORD, M.H.; ROSSITER, P.B.; Diseases risk associated with wildlife translocation projects. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v.12, n.1, p.115-135, 1993.

WOODROFFE, R. Managing disease threats to wild mammals. **Animal Conservation**, v.2, n.3, p.185-193, 1999.

WHO. World Health Organization. **Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.

Acesso em 10/mar/2011.

WHO. World Health Organization. Global Malaria Program. **World Malária Report, 2011**, Geneva, 22-26 2011.

Disponível em :

http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf.

Acesso em 10/Dez/2011.

YEWHALAW, D.; LEGESSE, W.; BORTEL, W.V.; GEBRE-SELASSIE, S.; KLOOS, H.; DUCHATEAU, L.; SPEYBROECK, N. Malaria and water resource development: the case of Gilgel-Gibe hydroelectric dam in Ethiopia. **Malaria Journal**, 8:21, 2009.

APÊNDICE A - Distribuição dos primatas neotropicais amostrados *in situ* por espécie, marcação, local e data de captura, faixa etária, gênero, peso, local de destinação e sinais clínicos, São Paulo 2012.

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P001	<i>Cebus</i> spp.	5573645	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	10/01/09	adulto	macho	2,425	Área de Captura	ndn
P056	<i>Cebus</i> spp.	5569798	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	19/03/09	adulto	macho	3,3	Área de Captura	ndn
P057	<i>Allouata caraya</i>	5653485	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	12/05/09	adulto	macho	9,2	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P058	<i>Allouata caraya</i>	5659381	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	12/05/09	juvenil	macho	5,2	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P059	<i>Cebus</i> spp.	5519927	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	26/07/08	adulto	fêmea	1,35	Área de Captura	ndn
P060	<i>Cebus</i> spp.	5601926	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	10/07/08	adulto	macho	2,2	Área de Captura	ndn
P061	<i>Cebus</i> spp.	5455296	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	19/07/08	juvenil	fêmea	1,5	Área de Captura	ndn
P062	<i>Cebus</i> spp.	5654525	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	19/07/08	adulto	fêmea	2,0	Área de Captura	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P063	<i>Cebus</i> spp.	5515836	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	10/07/08	filhote	macho	1,2	Área de Captura	ndn
P064	<i>Cebus</i> spp.	5661621	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	26/07/08	juvenil	macho	1,5	Área de Captura	ndn
P066	<i>Callithrix penicillata</i>	5603130	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	14/05/09	adulto	macho	0,382	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	Linfonodo inguinal aumentado
P067	<i>Allouata caraya</i>	5655995	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	adulto	fêmea	4,592	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P068	<i>Allouata caraya</i>	5656901	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	adulto	fêmea	4,8	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P069	<i>Callithrix penicillata</i>	5577154	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	adulto	macho	0,452	Zoo de Americana (SP)	ndn
P070	<i>Callithrix penicillata</i>	4481116	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	adulto	fêmea	0,350	Óbito	ndn
P071	<i>Callithrix penicillata</i>	5656547	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	adulto	macho	0,406	Zoo de Americana (SP)	ndn
P072	<i>Callithrix penicillata</i>	4455065	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	juvenil	macho	0,134	Zoo de Americana (SP)	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P073	<i>Callithrix penicillata</i>	4372190	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	18/05/09	juvenil	fêmea	0,132	Zoo de Americana (SP)	ndn
P074	<i>Callithrix penicillata</i>	5603958	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	19/05/09	adulto	fêmea	0,406	Zoo de Americana (SP)	ndn
P075	<i>Callithrix penicillata</i>	5585447	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	19/05/09	adulto	fêmea	0,394	Zoo de Americana (SP)	ndn
P076	<i>Allouata caraya</i>	5572375	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	20/05/09	adulto	fêmea	5,554	Óbito	ndn
P077	<i>Allouata caraya</i>	5536531	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	21/05/09	juvenil	macho	3,478	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P078	<i>Callithrix penicillata</i>	5600907	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	21/05/09	adulto	fêmea	0,368	Zoo de Americana (SP)	ndn
P079	<i>Callithrix penicillata</i>	5620740	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	21/05/09	adulto	macho	0,302	CPRJ	ndn
P080	<i>Callithrix penicillata</i>	5618665	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	21/05/09	juvenil	fêmea	0,208	Zoo de Americana (SP)	ndn
P081	<i>Allouata caraya</i>	5528802	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	23/05/09	filhote	macho	1,666	Óbito	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P082	<i>Allouata caraya</i>	5516804	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	23/05/09	adulto	fêmea	5,174	Óbito	ndn
P083	<i>Callithrix penicillata</i>	5570133	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	29/05/09	adulto	fêmea	0,398	Zoo de VGS	galactorréia
P084	<i>Callithrix penicillata</i>	5531885	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	01/06/09	adulto	Fêmea	0,394	CENP	ndn
P085	<i>Callithrix penicillata</i>	5617251	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	01/06/09	juvenil	fêmea	0,170	CENP	ndn
P086	<i>Callithrix penicillata</i>	5517417	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	01/06/09	filhote	macho	0,126	Zoo de VGS	ndn
P087	<i>Allouata caraya</i>	5528083	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	01/06/09	juvenil	fêmea	4,0	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P088	<i>Allouata caraya</i>	4364263	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	01/06/09	juvenil	macho	2,84	Zoo de VGS	ndn
P089	<i>Allouata caraya</i>	5488500	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	01/06/09	adulto	fêmea	5,41	Zoo de VGS	ndn
P090	<i>Allouata caraya</i>	5463611	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	02/06/09	adulto	fêmea	4,463	Zoo de VGS	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P091	<i>Allouata caraya</i>	5466829	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	02/06/09	adulto	macho	3,513	Zoo de VGS	ndn
P092	<i>Allouata caraya</i>	5618281	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	02/06/09	filhote	macho	1,0	Óbito	ndn
P093	<i>Callithrix penicillata</i>	5607905	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	03/06/09	adulto	fêmea	0,356	CENP	ndn
P094	<i>Callithrix penicillata</i>	5520807	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	03/06/09	adulto	macho	0,398	CENP	ndn
P095	<i>Callithrix penicillata</i>	5582472	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	03/06/09	juvenil	macho	0,150	CENP	ndn
P096	<i>Allouata caraya</i>	5601858	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	03/06/09	adulto	macho	8,465	Óbito	ndn
P097	<i>Callithrix penicillata</i>	5521012	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	08/06/09	adulto	fêmea	0,388	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P098	<i>Callithrix penicillata</i>	5607007	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	08/06/09	juvenil	macho	0,122	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P099	<i>Callithrix penicillata</i>	5569588	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	08/06/09	juvenil	fêmea	0,130	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P101	<i>Callithrix penicillata</i>	5526996	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	12/06/09	adulto	macho	0,355	CPRJ	ndn
P102	<i>Callithrix penicillata</i>	4454424	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	20/06/09	adulto	macho	0,384	Zoo VGS	ndn
P104	<i>Callithrix penicillata</i>	4455012	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	23/06/09	adulto	macho	0,379	CPRJ	ndn
P105	<i>Callithrix penicillata</i>	4448922	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	23/06/09	adulto	macho	0,372	CPRJ	ndn
P106	<i>Callithrix penicillata</i>	4449678	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	23/06/09	adulto	macho	0,398	CPRJ	ndn
P107	<i>Callithrix penicillata</i>	5620213	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	24/06/09	adulto	macho	0,345	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P108	<i>Callithrix penicillata</i>	4366422	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	25/06/09	adulto	fêmea	0,334	Zoo de VGS	ndn
P109	<i>Callithrix penicillata</i>	5579756	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	25/06/09	adulto	macho	0,414	CPRJ	ndn
P110	<i>Callithrix penicillata</i>	4482944	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	25/06/09	juvenil	fêmea	0,230	Zoo de VGS	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P111	<i>Callithrix penicillata</i>	4368517	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	30/06/09	juvenil	fêmea	0,144	CENP	ndn
P112	<i>Callithrix penicillata</i>	4456102	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	30/06/09	juvenil	macho	0,224	CPRJ	Linfonodo inguinal aumentado
P114	<i>Callithrix penicillata</i>	4491442	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	01/07/09	adulto	macho	0,346	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P115	<i>Callithrix penicillata</i>	4486238	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	01/07/09	adulto	macho	0,366	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P123	<i>Callithrix penicillata</i>	4363823	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	16/07/09	adulto	fêmea	0,394	CENP	ndn
P124	<i>Callithrix penicillata</i>	4451660	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	16/07/09	adulto	macho	0,398	CENP	ndn
P125	<i>Callithrix penicillata</i>	4478541	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	16/07/09	juvenil	fêmea	0,214	CENP	ndn
P126	<i>Callithrix penicillata</i>	4491980	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	16/07/09	adulto	fêmea	0,292	CENP	ndn
P127	<i>Callithrix penicillata</i>	5583431	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	25/06/09	adulto	fêmea	0,426	CENP	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P128	<i>Callithrix penicillata</i>	4478332	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	16/07/09	adulto	fêmea	0,382	CENP	ndn
P129	<i>Callithrix penicillata</i>	4384449	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	17/07/09	adulto	Fêmea	0,388	CENP	ndn
P130	<i>Callithrix penicillata</i>	5578712	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	20/07/09	adulto	macho	0,384	CENP	ndn
P132	<i>Callithrix penicillata</i>	5659767	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	20/07/09	juvenil	macho	0,180	CPRJ	ndn
P133	<i>Callithrix penicillata</i>	5601297	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	22/07/09	adulto	Fêmea	0,410	CENP	Linfonodo inguinal aumentado, epistaxe
P134	<i>Allouata caraya</i>	5602202	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	22/07/09	juvenil	macho	3,6	Área de Captura	ndn
P135	<i>Allouata caraya</i>	5660149	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 8)	28/07/09	adulto	fêmea	3,736	CENP	ndn
P136	<i>Callithrix penicillata</i>	5511478	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	juvenil	fêmea	0,188	CENP	ndn
P137	<i>Callithrix penicillata</i>	5654373	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	adulto	fêmea	0,398	CENP	ndn

N° Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P138	<i>Callithrix penicillata</i>	5535516	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	adulto	macho	0,424	CENP	ndn
P139	<i>Callithrix penicillata</i>	5456247	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	juvenil	macho	0,282	CENP	ndn
P140	<i>Callithrix penicillata</i>	4488504	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	juvenil	macho	0,184	CENP	ndn
P141	<i>Callithrix penicillata</i>	4393263	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	Adulto	macho	0,444	CENP	ndn
P142	<i>Callithrix penicillata</i>	4392976	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	adulto	fêmea	0,552	CENP	ndn
P143	<i>Callithrix penicillata</i>	5573276	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	adulto	macho	0,392	CENP	ndn
P144	<i>Callithrix penicillata</i>	5578838	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	adulto	macho	0,424	CENP	ndn
P145	<i>Callithrix penicillata</i>	5582188	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	03/08/09	juvenil	macho	0,184	CENP	ndn
P146	<i>Callithrix penicillata</i>	5535796	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	06/08/09	adulto	macho	0,336	CENP	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P147	<i>Callithrix penicillata</i>	5589441	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	06/08/09	juvenil	macho	0,134	CENP	ndn
P148	<i>Callithrix penicillata</i>	5653388	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5 a)	10/08/09	adulto	fêmea	0,528	CENP	ndn
P149	<i>Callithrix penicillata</i>	5462420	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	31/05/09	juvenil	fêmea	0,162	Zoo de VGS	ndn
P150	<i>Callithrix penicillata</i>	5536076	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	31/05/09	adulto	fêmea	0,368	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	ndn
P151	<i>Callithrix penicillata</i>	5446408	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	31/05/09	adulto	macho	0,398	Zoo de VGS	ndn
P152	<i>Allouata caraya</i>	5620332	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	02/09/09	adulto	macho	7,65	CENP	ndn
P153	<i>Callithrix penicillata</i>	5660967	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	23/09/09	adulto	fêmea	0,384	CENP	ndn
P154	<i>Callithrix penicillata</i>	5452917	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	06/08/09	juvenil	fêmea	0,118	CENP	ndn
P155	<i>Callithrix penicillata</i>	5532377	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	19/09/09	adulto	macho	informação ausente	CENP	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P156	<i>Callithrix penicillata</i>	5585320	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 8)	18/11/09	adulto	fêmea	0,358	Área de Captura	Linfonodo inguinal aumentado
P157	<i>Callithrix penicillata</i>	5662379	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5b)	24/11/10	adulto	fêmea	0,354	DEPAVE (SP)	ndn
P158	<i>Callithrix penicillata</i>	5459358	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	11/08/09	adulto	fêmea	0,404	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado
P161	<i>Callithrix penicillata</i>	5620814	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5b)	06/11/09	adulto	fêmea	informação ausente	CENP	ndn
P163	<i>Saimiri boliviensis</i>	ausente	Rondônia	29/3/10	juvenil	macho	informação ausente	Óbito	ndn
P164	<i>Aotus infulatus</i>	ausente	Rondônia	29/3/11	juvenil	fêmea	informação ausente	Óbito	ndn
P165	<i>Callicebus brunneus</i>	ausente	Rondônia	30/3/10	adulto	fêmea	informação ausente	Óbito	ndn
P166	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	ausente	Rondônia	30/3/11	adulto	macho	informação ausente	Óbito	ndn
P167	<i>Cebus apella</i>	ausente	Rondônia	30/3/12	juvenil	fêmea	1,100	Óbito	ndn

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P168	<i>Callicebus brunneus</i>	ausente	Rondônia	30/3/13	adulto	macho	1,100	Óbito	ndn
P169	<i>Callicebus dubius</i>	ausente	Rondônia	31/3/10	adulto	fêmea	informação ausente	Óbito	ndn
P170	<i>Lagothrix cana</i>	ausente	Rondônia	31/3/10	adulto	fêmea	6,500	Óbito	ndn
P171	<i>Pithecia sp.</i>	ausente	Rondônia	01/04/10	adulto	macho	informação ausente	Óbito	ndn
P172	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	ausente	BR 319 (AM)	29/01/11	adulto	fêmea	0,345	Óbito	ndn
P173	<i>Saguinus labiatus rufiventer</i>	ausente	BR 319 (AM)	30/1/11	adulto	fêmea	0,490	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado
P174	<i>Lagothrix cana</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/01/11	adulto	macho	5,800	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado
P175	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/01/11	adulto	macho	0,420	Óbito	ndn
P176	<i>Cebus macrocephalus</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/02/11	juvenil	fêmea	2,130	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado

Nº Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P177	<i>Callicebus caligatus</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/06/11	filhote	macho	0,260	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado
P178	<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/06/11	adulto	macho	0,890	Óbito	ndn
P179	<i>Cebus macrocephalus</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/06/11	adulto	macho	3,800	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado e fratura de canino superior esquerdo
P182	<i>Callicebus caligatus</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/07/11	adulto	fêmea	0,860	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado
P183	<i>Callicebus caligatus</i>	ausente	BR 319 (AM)	02/08/11	adulto	macho	0,870	Óbito	Linfonodo inguinal aumentado
P184	<i>Callithrix penicillata</i>	n 2	Horto Florestal de Bauru (SP)	03/07/11	adulto	macho	0,323	não houve destinação	ndn
P185	<i>Callithrix penicillata</i>	n 3	Horto Florestal de Bauru (SP)	03/07/11	adulto	fêmea	0,339	não houve destinação	Galactorréia, linfonodo inguinal aumentado
P186	<i>Callithrix penicillata</i>	n 9	Horto Florestal de Bauru (SP)	03/07/11	filhote	fêmea	0,180	não houve destinação	ndn
P187	<i>Callithrix penicillata</i>	n 4	Horto Florestal de Bauru (SP)	03/07/11	adulto	fêmea	0,334	não houve destinação	ndn

N° Animal	Nome científico	Marcação	Local de captura	Data de captura	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Local de destino	Sinais Clínicos
P203	<i>Callithrix penicillata</i>	n 1	Horto Florestal de Bauru (SP)	03/07/11	juvenil	fêmea	0,374	não houve destinação	ndn
P204	<i>Callithrix penicillata</i>	n 6	Horto Florestal de Bauru (SP)	06/07/11	juvenil	fêmea	0,271	não houve destinação	Animal magro, galactorrêia
P205	<i>Callithrix penicillata</i>	n 7	Horto Florestal de Bauru (SP)	06/07/11	adulto	macho	0,368	não houve destinação	ndn
P206	<i>Callithrix penicillata</i>	n 10	Horto Florestal de Bauru (SP)	06/07/11	filhote	fêmea	0,182	não houve destinação	ndn

APÊNDICE B - Distribuição dos primatas neotropicais amostrados *ex situ* por espécie, instituição, marcação, local e data de captura, faixa etária, gênero, peso, local de destinação, tempo de permanência do animal no local e sinais clínicos, São Paulo 2012.

N° Animal	N° Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P002	27178	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 96	14/01/09	adulto	macho	0,290	não informado	Perus/SP	CRAS	3a e 8m	ndn
P003	33193	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	14/01/09	filhote	macho	0,300	30/11/07	Nascimento no DEPAVE-CRAS	CRAS	2 m	ndn
P004	27891	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 79	14/01/09	adulto	fêmea	0,380	03/03/06	Jd. São Luis/SP	CRAS	2 anos	ndn
P005	25762	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 94	14/01/09	adulto	macho	0,230	29/12/04	Taboão da Serra	óbito	4 a	Mucosa ocular e oral congestas
P006	32956	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 03	14/01/09	adulto	macho	0,260	08/11/07	Nascimento no DEPAVE-CRAS	eutanásia	1a e 2m	Presença de ectoparasitas
P007	32957	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 04	14/01/09	adulto	macho	0,290	08/11/07	Nascimento no DEPAVE-CRAS	CRAS	1a e 2m	ndn
P008	35070	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	15/01/09	adulto	macho	0,440	10/10/08	Recanto Humilde - Bairro Perus/SP	cativeiro	3 m	ndn

N° Animal	N° Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P009	30734	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	Sem marcação	15/01/09	adulto	macho	0,360	08/11/06	Parque Anhanguera/SP	cativeiro	2a e 2m	ndn
P010	35230	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	Tatuagem 05	15/01/09	adulto	macho	0,310	09/12/08	Jd. Jabaquara/SP	cativeiro	1 m	ndn
P011	34089	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 01	15/01/09	adulto	macho	0,320	17/12/08	Bosque Brooklin/SP	cativeiro	2 m	Animal magro
P012	33742	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	Tatuagem 23	15/01/09	adulto	fêmea	0,260	17/12/08	Parque do Grajaú/SP	cativeiro	2 m	Animal magro
P013	33410	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 101	15/01/09	adulto	macho	0,250	não informado	Parque Sto Dias/SP	cativeiro	não informado	ndn
P014	34196	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	Tatuagem 24	20/01/09	adulto	fêmea	0,380	17/12/08	Parque da Independência SP	cativeiro	1 m	ndn
P015	34195	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	Tatuagem 11	20/01/09	adulto	macho	0,290	17/12/08	Parque da Independência SP	cativeiro	2 m	ndn
P016	33575	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 102	20/01/09	adulto	macho	0,250	17/12/08	Parque do Carmo/SP	CRAS	2 m	Animal magro
P017	não informado	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 1	20/01/09	adulto	macho	0,400	17/12/08	não informado	não informado	2 m	ndn

Nº Animal	Nº Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P018	34338	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	Tatuagem 78	22/01/09	adulto	fêmea	0,260	30/06/08	Parque do Carmo/SP	cativeiro	5 m	Presença de ectoparasitas
P019	33489	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 94	22/01/09	adulto	fêmea	0,210	08/01/08	Parque da Independência/SP	cativeiro	1 a	Animal magro, dermatite em região inguinal e linfonodo inguinal aumentado
P020	33685	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	Tatuagem 22	22/01/09	adulto	fêmea	0,240	08/02/08	Bairro Sta. Maria/SP	cativeiro	1 a	Mucosa oral hipocorada
P021	35124	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	22/01/09	adulto	fêmea	0,410	17/12/08	Osasco/SP	óbito	3 m	ndn
P022	30175	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	27/01/09	adulto	fêmea	0,390	24/09/08	Nascimento no DEPAVE-CRAS	CRAS	4 m	ndn
P023	33192	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	27/01/09	adulto	fêmea	0,405	14/07/08	Nascimento no DEPAVE-CRAS	CRAS	6 m	ndn
P024	31331	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 87	27/01/09	adulto	fêmea	0,350	07/02/07	Parque da Independência SP	cativeiro	2 a	Fratura canino
P025	31004	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix jacchus</i>	Tatuagem 19	27/01/09	adulto	fêmea	0,370	14/12/06	Vila Leopoldina/SP (CEAGESP)	cativeiro	2 a	ndn

Nº Animal	Nº Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P026	32523	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 93	27/01/09	adulto	fêmea	0,450	29/09/07	Vila Guarani/SP (zona sul)	cativeiro	1a e 4m	Periodontite, fratura de canino e hiperplasia gengival
P027	32179	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix spp.</i>	Tatuagem 21	28/01/09	adulto	fêmea	0,310	09/08/07	Parque da Independência SP	cativeiro	1a e 5m	ndn
P028	31308	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix spp.</i>	Tatuagem 16	28/01/09	adulto	fêmea	0,455	05/02/07	Parque da Independência SP	cativeiro	2 a	ndn
P029	34194	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 02	28/01/09	adulto	macho	0,465	27/05/08	Parque da Independência SP	cativeiro	8 m	ndn
P030	31640	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Tatuagem 92	28/01/09	adulto	fêmea	0,310	14/04/07	Itapevi/SP	cativeiro	1a e 10m	Cauda amputada, fratura de canino superior direito
P031	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	26/03/09	filhote	fêmea	não tem	23/03/09	Taubaté (cativeiro - domiciliado)	não informado	4 dias	Animal magro
P032	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	26/03/09	adulto	macho	não tem	23/07/08	São José do Rio Preto (cativeiro)	não informado	8 m	Gengivite, cauda amputada
P033	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	26/03/09	adulto	fêmea	não tem	não informado	não informado	não informado	não informado	ndn

N° Animal	N° Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P034	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	26/03/09	adulto	fêmea	não tem	não informado	não informado	não informado	não informado	ndn
P035	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix spp.</i>	Sem marcação	26/03/09	adulto	fêmea	não tem	não informado	não informado	não informado	não informado	Animal magro, dermatite próxima orelha esquerda e pequena área de alopecia
P036	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix spp.</i>	Sem marcação	26/03/09	adulto	macho	não tem	não informado	não informado	não informado	não informado	ndn
P037	não tem	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	Sem marcação	26/03/09	adulto	fêmea	não tem	não informado	não informado	não informado	não informado	ndn
P038	não tem	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	macho	2,4	14/08/08	Zoo de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	Animal magro
P039	não tem	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	fêmea	2,1	14/08/08	Zoo de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	Animal magro
P040	não tem	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	fêmea	3,0	14/08/08	Zoo de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	Linfonodo inguinal aumentado

Nº Animal	Nº Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P041	não tem	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	fêmea	1,98	14/08/08	Zoo de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	Alopecia em região dorsal e lateral de membros posteriores
P042	não tem	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	fêmea	2,02	14/08/08	Zoo de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	Linfonodo inguinal aumentado
P043	não tem	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	fêmea	2,2	14/08/08	Zoo de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	Calculo dentário
P044	não tem	CETAS LORENA	<i>Callicebus nigrifrons</i>	Sem marcação	27/03/09	adulto	fêmea	1,3	28/11/08	Cunha (SP)	não informado	3 m	Intensa patia, animal magro, intensa desidratação
P045	não tem	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	Sem marcação	28/03/09	adulto	macho	5,5	14/07/08	Passa Quatro (MG)	não informado	8 m	Ectoparasitas (puliciose)
P046	não tem	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	Sem marcação	28/03/09	adulto	macho	5,3	01/02/08	Itamonte (MG) (Mantiqueira)	não informado	1 a	Animal magro, alopecia na região dorsal próximo a cauda, início da cauda e membros posteriores

Nº Animal	Nº Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P047	não tem	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	Sem marcação	28/03/09	adulto	macho	4,7	14/04/08	APA Iguape (SP)	não informado	11 m	Animal magro, presença de coriza
P048	333	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	428895	22/05/09	adulto	macho	0,298	09/01/09	Praia grande (SP)	não informado	5 m	ndn
P049	377	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	9639	22/05/09	adulto	fêmea	0,310	01/04/09	Mongaguá (SP)	não informado	2 m	ndn
P050	374	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	10413	22/05/09	adulto	fêmea	0,294	27/03/09	Mongaguá (SP)	não informado	2 m	ndn
P051	3	UNIMONTE	<i>Callithrix</i> spp.	9924	22/05/09	adulto	macho	0,369	17/01/08	Santos (SP)	não informado	1a e 4m	ndn
P052	34	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	8560	22/05/09	adulto	macho	0,345	24/06/08	Peruíbe (SP)	não informado	10 m	Alopecia na região proximal da cauda
P053	18	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	13118	22/05/09	adulto	macho	0,424	08/07/08	Santos (SP)	óbito em 15/6/9 trauma	8 m	Ginecomastia
P054	347	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	9839	22/05/09	adulto	fêmea	0,156	17/01/09	Praia grande (SP)	óbito em 18/01/09 trauma	4 m	Fratura de canino superior direito
P055	17	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	19692	22/05/09	adulto	macho	0,329	08/07/08	Santos (SP)	não informado	8 m	ndn

N° Animal	N° Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P159	não tem	UNIMONTE	<i>Brachyteles arachnoides</i>	9980	06/03/10	filhote	macho	5.9	14/05/09	Sete Barras (SP)	não informado	1 a	ndn
P160	não tem	CRAS-PET	<i>Callicebus nigrifrons</i>	399492	11/03/10	adulto	fêmea	0,578	17/02/10	Parque da Cantareira/ SP	óbito	1 m	Descamação em pele na região do dorso, apatia, animal magro
P188	não tem	Zoo de Bauru	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	963706859 1	07/03/11	adulto	macho	10,45	01/04/01	Boca do Acre (AM)	óbito (11/2011)	10a e 3m	Desidratação 5 % . Ligeira dificuldade respiratória
P189	não tem	Zoo de Bauru	<i>Alouatta clamitans</i>	Tatuagem 03	07/03/11	adulto	macho	7,0	20/4/02	Zoo de São Paulo	não houve destinação	9a e 3m	ndn
P190	não tem	Zoo de Bauru	<i>Alouatta belzebul</i>	não informado	07/03/11	adulto	fêmea	5,26	08/03/04	Pará	não houve destinação	7a e 4m	ndn
P191	não tem	Zoo de Bauru	<i>Callicebus personatus</i>	426359	07/03/11	juvenil	macho	1,3	01/11/10	Rondônia	não houve destinação	8 m	Fraturas em caninos e incisivos com exposição de polpa.

Nº Animal	Nº Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P192	não tem	Zoo de Bauru	<i>Callicebus personatus</i>	409174	07/03/11	juvenil	fêmea	1,05	01/11/10	Rondônia	não houve destinação	8 m	ndn
P193	não tem	Zoo de Bauru	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	403170	07/03/11	juvenil	macho	5,02	15/11/08	IBAMA do Amazonas, Manaus	não houve destinação	2a e 9m	Animal magro, desidratação 5%, mucosa oral hipocorada
P194	não tem	Zoo de Bauru	<i>Alouatta caraya</i>	34551	07/03/11	adulto	fêmea	5,24	05/02/05	Zoo de Goiânia (SP)	não houve destinação	6a e 2m	ndn
P195	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles chamek</i>	420867	07/03/11	juvenil	macho	3,35	07/03/09	nasceu no Zoo de Bauru	não houve destinação	2a e 4m	ndn
P196	não tem	Zoo de Bauru	<i>Lagothrix poeppigii</i>	190374	07/04/11	juvenil	fêmea	6,58	20/12/07	IBAMA do Amazonas, Manaus	não houve destinação	3a e 7m	ndn
P197	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	0203845	07/04/11	adulto	macho	9,111	18/12/07	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	Animal magro
P198	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	218384	07/04/11	adulto	fêmea	8,42	18/12/07	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	Desidratação 5 %, mucosa oral ligeiramente hipocorada
P199	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	236462	07/04/11	adulto	fêmea	10,71	18/12/07	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	ndn

N° Animal	N° Animal na instituição	Instituição	Nome científico	Marcação	Data da coleta	Faixa etária	Gênero	Peso (kg)	Data de entrada na instituição	Local (captura)	Local de destino	Tempo na instituição	Sinais clínicos
P200	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	399848	07/04/11	juvenil	fêmea	7,01	04/05/11	Roraima	não houve destinação	3a e 5m	Animal magro
P201	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	220884	07/04/11	adulto	macho	1,7	11/01/07	Zoo de Brasília	não houve destinação	4a e 6m	ndn
P202	não tem	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	216950	07/04/11	adulto	fêmea	5,1	10/10/96	Zoo do Rio de Janeiro	não houve destinação	15a e 5m	ndn

P009	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	cativeiro	2a e 2m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P010	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	cativeiro	1 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo						
P011	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	cativeiro	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P012	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	cativeiro	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P013	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	cativeiro	não informado	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P014	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	cativeiro	1 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P015	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix spp.</i>	cativeiro	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P016	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	CRAS	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P017	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P018	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	cativeiro	5 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P019	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	cativeiro	1 a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P020	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	cativeiro	1 a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P021	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	óbito	3 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P022	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	CRAS	4 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P023	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	CRAS	6 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P024	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P025	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix jacchus</i>	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P026	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	cativeiro	1a e 4m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P027	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix</i> spp.	cativeiro	1a e 5m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P028	DEPAVE- Ibirapuera	<i>Callithrix</i> spp.	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P029	DEPAVE- Ibirapuera	<i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	cativeiro	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P030	DEPAVE- Ibirapuera	<i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	cativeiro	1a e 10m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	Positivo	negativo	negativo	negativo
P031	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	não informado	4 dias	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P032	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	não informado	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P033	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	não informado	não informa do	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	Positivo	negativo	negativo	negativo
P034	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> <i>penicillata</i>	não informado	não informa do	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P035	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> spp.	não informado	não informa do	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P036	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> spp.	não informado	não informa do	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P045	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	não informado	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P046	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	não informado	1 a	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P047	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	não informado	11 m	negativo	negativo	Positivo Pv	Positivo (+)	Positivo	Positivo (+++)	Positivo	negativo	Positivo	Positivo	
P048	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P049	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P050	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P051	UNIMONTE	<i>Callithrix spp.</i>	não informado	1a e 4m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P052	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	não informado	10 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P053	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	óbito em 15/6/9 trauma	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P054	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	óbito em 18/01/09 trauma	4 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P055	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	não informado	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P159	UNIMONTE	<i>Brachyteles arachnoides</i>	não informado	1 a	negativo	negativo	Positivo Pv	negativo	positivo (>1:320)	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo	Positivo
P160	CRAS-PET	<i>Callicebus nigrifrons</i>	óbito	1 m	Positivo	Positivo Pv	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo
P188	Zoo de Bauru	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	óbito (11/2011)	10a e 3m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P189	Zoo de Bauru	<i>Alouatta clamitans</i>	não houve destinação	9a e 3m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P190	Zoo de Bauru	<i>Alouatta belzebul</i>	não houve destinação	7a e 4m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	Positivo	negativo	negativo	negativo
P191	Zoo de Bauru	<i>Callicebus personatus</i>	não houve destinação	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P192	Zoo de Bauru	<i>Callicebus personatus</i>	não houve destinação	8 m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P193	Zoo de Bauru	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	não houve destinação	2a e 9m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P194	Zoo de Bauru	<i>Alouatta caraya</i>	não houve destinação	6a e 2m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P195	Zoo de Bauru	<i>Ateles chamek</i>	não houve destinação	2a e 4m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P196	Zoo de Bauru	<i>Lagothrix poeppigii</i>	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P197	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	positivo (1:20)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P198	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	positivo (1:40)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P199	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P200	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	não houve destinação	3a e 5m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P201	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	não houve destinação	4a e 6m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P202	Zoo de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	não houve destinação	15a e 5m	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
------	--------------	------------------------	----------------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	-------------	----------	----------	----------	----------

APÊNDICE D – Resultados para as provas diagnósticas de *Plasmodium* spp. das amostras de primatas *in situ* por espécie, local, local da destinação e tempo na instituição - São Paulo, 2012.

N° Animal	Nome científico	Local de captura	Local de destino	Gota Espessa	Nested PCR	Teste Rápido SDBioline	RIFI Pf	RIFI Pv	RIFI P. malariae	ELISA Pf		ELISA Pv	
										Proteína A	Anti-igG Primata	Proteína A	Anti-igG Primata
P001	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P056	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P057	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P058	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P059	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P060	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P061	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P062	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P063	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P064	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura	negativo	negativo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P066	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P067	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P068	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P069	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P070	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P071	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P072	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P073	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P074	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P075	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P076	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P077	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P078	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P079	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CPRJ	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P080	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P081	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P082	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P083	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de VGS	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P084	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	Positivo	negativo	negativo	negativo

P105	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CPRJ	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P106	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CPRJ	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P107	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P108	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P109	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CPRJ	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P110	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P111	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P112	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CPRJ	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P114	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P115	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P123	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P124	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P125	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P126	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P127	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P128	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P129	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P130	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P132	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CPRJ	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P133	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P134	<i>Allouata caraya</i>	PCH	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P135	<i>Allouata caraya</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P136	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P137	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P138	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P139	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P140	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P141	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P142	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P143	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P144	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P145	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P146	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P147	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P148	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P149	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P150	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P151	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P152	<i>Allouata caraya</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P153	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P154	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P155	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P156	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P157	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	DEPAVE (SP)	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P158	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P161	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	CENP	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P163	<i>Saimiri boliviensis</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P164	<i>Aotus infulatus</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P165	<i>Callicebus brunneus</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P166	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo (+++)	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P167	<i>Cebus apella</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P168	<i>Callicebus brunneus</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P169	<i>Callicebus dubius</i>	Rondônia	óbito	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo (+++)	negativo	negativo	negativo	negativo
P170	<i>Lagothrix cana</i>	Rondônia	óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:20)	negativo	negativo	Positivo (++)	negativo	negativo	negativo	negativo
P171	<i>Pithecia</i> sp.	Rondônia	óbito	Positivo	Positivo	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P172	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P173	<i>Saguinus labiatus rufiventer</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:20)	Negativo	negativo	não testado	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P174	<i>Lagothrix cana</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

P175	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P176	<i>Cebus macrocephalus</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P177	<i>Callicebus caligatus</i>	BR 319 (AM)	óbito	Positivo	Positivo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P178	<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:80)	negativo	negativo	não testado	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P179	<i>Cebus macrocephalus</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:80)	negativo	negativo	não testado	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P182	<i>Callicebus caligatus</i>	BR 319 (AM)	óbito	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo (1:160)	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P183	<i>Callicebus caligatus</i>	BR 319 (AM)	óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P184	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P185	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P186	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P187	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P203	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P204	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P205	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo
P206	<i>Callithrix penicillata</i>	Horto Bauru	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

APÊNDICE F – Resultados positivos para as provas diagnósticas de *Plasmodium* spp. das amostras de primatas *in situ* em função da espécie, local de captura e local de destinação, São Paulo, 2012.

N° Animal	Nome científico	Local de captura	Local de destino	Gota Espessa	Nested PCR	Teste Rápido SDBioline	RIFI Pf	RIFI Pv	RIFI P. malariae	ELISA Pf		ELISA Pv	
										Proteína A	Anti-igG Primata	Proteína A	Anti-igG Primata
P001	<i>Cebus</i> spp.	Patrocínio Paulista	Área de Captura Zoo de Americana (SP)	negativo	Positivo <i>P. brasilianum</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P071	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P072	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Americana (SP)	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P098	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo de Ribeirão Preto (SP)	Positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P102	<i>Callithrix penicillata</i>	PCH	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:40)	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P166	<i>Lagothrix cana</i>	Rondônia	Óbito	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	Positivo (+++)	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P169	<i>Callicebus dubius</i>	Rondônia	Óbito	Positivo	Positivo <i>P. brasilianum</i>	negativo	negativo	negativo	Positivo (+++)	negativo	negativo	negativo	negativo
P170	<i>Lagothrix cana</i>	Rondônia	Óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:20)	negativo	Positivo (++)	negativo	negativo	negativo	negativo
P171	<i>Pithecia</i> sp.	Rondônia	Óbito	Positivo	Positivo <i>P. brasilianum</i>	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado	não testado
P173	<i>Saguinus labiatus rufiventer</i>	BR 319 (AM)	Óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:20)	Negativo	não testado	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P177	<i>Callicebus caligatus</i>	BR 319 (AM)	Óbito	Positivo	Positivo <i>P. brasilianum</i>	negativo	negativo	negativo	Negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
P178	<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>	BR 319 (AM)	Óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:80)	negativo	não testado	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P179	<i>Cebus macrocephalus</i>	BR 319 (AM)	Óbito	negativo	negativo	negativo	Positivo (1:80)	negativo	não testado	Positivo	Positivo	negativo	negativo
P182	<i>Callicebus caligatus</i>	BR 319 (AM)	Óbito	Positivo	Positivo <i>P. brasilianum</i>	Negativo	Positivo (1:160)	negativo	não testado	negativo	negativo	negativo	negativo

APÊNDICE G – Resultados para as provas diagnósticas de *Leishmania* spp. das amostras de primatas *ex situ* por espécie, local de captura e local de destinação, São Paulo, 2012.

Nº Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P002	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	14/01/09	Perus/SP	CRAS	3a e 8m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P003	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	14/01/09	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P004	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	14/01/09	Jd. São Luis/SP	CRAS	2 anos	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P005	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	14/01/09	Taboão da Serra	óbito	4 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P006	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	14/01/09	Nascimento DEPAVE-CRAS	eutanásia	1a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P007	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	14/01/09	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	1a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P008	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	15/01/09	Recanto Humilde - Bairro Perus/SP	cativeiro	3 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P009	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	15/01/09	Parque Anhanguera/SP	cativoiro	2a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P010	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	15/01/09	Jd. Jabaquara/SP	cativoiro	1 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P011	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	15/01/09	Bosque Brooklin/SP	cativoiro	2 m	negativo	negativo	positivo (1:80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P012	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	15/01/09	Parque do Grajaú/SP	cativoiro	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P013	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	15/01/09	Parque Sto Dias/SP	cativoiro	não informado	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P014	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	20/01/09	Parque da Independência/SP	cativoiro	1 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P015	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	20/01/09	Parque da Independência/SP	cativoiro	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P016	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	20/01/09	Parque do Carmo/SP	CRAS	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P017	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	20/01/09	não informado	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P018	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	22/01/09	Parque do Carmo/SP	cativeiro	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P019	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	22/01/09	Parque da Independência/SP	cativeiro	1 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	Leishmania spp.
P020	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	22/01/09	Bairro Sta. Maria/SP	cativeiro	1 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P021	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	22/01/09	Osasco/SP	óbito	3 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P022	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	27/01/09	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	4 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania complexo Viannia	não testado
P023	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	27/01/09	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	6 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P024	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	27/01/09	Parque da Independência/SP	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P025	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix jacchus</i>	27/01/09	Vila Leopoldina/SP (CEAGESP)	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania spp.</i>	não testado
P026	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	27/01/09	Vila Guarani/SP (zona sul)	cativeiro	1a e 4m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P027	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix spp.</i>	28/01/09	Parque da Independência/SP	cativeiro	1a e 5m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P028	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix spp.</i>	28/01/09	Parque da Independência/SP	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P029	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	28/01/09	Parque da Independência/SP	cativeiro	8 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P030	DEPAVE-lbirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	28/01/09	Itapeví/SP	cativeiro	1a e 10m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P031	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	26/03/09	Taubaté (cativeiro - domiciliado)	não informado	4 dias	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P032	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	26/03/09	São José do Rio Preto (cativeiro)	não informado	8 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P033	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	26/03/09	não informado	não informado	não informado	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P034	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	26/03/09	não informado	não informado	não informado	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P035	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> spp.	26/03/09	não informado	não informado	não informado	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P036	CETAS LORENA	<i>Callithrix</i> spp.	26/03/09	não informado	não informado	não informado	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P037	CETAS LORENA	<i>Callithrix penicillata</i>	26/03/09	não informado	não informado	não informado	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P038	CETAS LORENA	<i>Cebus</i> spp.	27/03/09	Zoológico de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P039	CETAS LORENA	<i>Cebus</i> spp.	27/03/09	Zoológico de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P040	CETAS LORENA	<i>Cebus</i> spp.	27/03/09	Zoológico de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	<i>Leishmania</i> spp.

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P041	CETAS LORENA	<i>Cebus</i> spp.	27/03/09	Zoológico de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania complexo Viannia	não testado
P042	CETAS LORENA	<i>Cebus</i> spp.	27/03/09	Zoológico de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	Leishmania spp.
P043	CETAS LORENA	<i>Cebus</i> spp.	27/03/09	Zoológico de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P044	CETAS LORENA	<i>Callicebus nigrifrons</i>	27/03/09	Cunha (SP)	não informado	3 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P045	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	28/03/09	Passa Quatro (MG)	não informado	8 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P046	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	28/03/09	Itamonte (MG) (mantiqueira)	não informado	1 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P047	CETAS LORENA	<i>Allouata fusca</i>	28/03/09	APA Iguape (SP)	não informado	11 m	negativo	negativo	negativo	infiltrado linfóitico em derme	negativo	negativo	não testado
P048	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	22/05/09	Praia grande (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P049	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	22/05/09	Mongaguá (SP)	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P050	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	22/05/09	Mongaguá (SP)	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania complexo Viannia	não testado
P051	UNIMONTE	<i>Callithrix</i> spp.	22/05/09	Santos (SP)	não informado	1a e 4m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P052	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	22/05/09	Peruíbe (SP)	não informado	10 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P053	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	22/05/09	Santos (SP)	óbito em 15/6/9 trauma	8 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P054	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	22/05/09	Praia grande (SP)	óbito em 18/01/09 trauma	4 m	negativo	negativo	negativo	dermatite multifocal aguda leve	negativo	Leishmania spp.	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P055	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	22/05/09	Santos (SP)	não informado	8 m	positivo	positivo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P159	UNIMONTE	<i>Brachyteles arachnoides</i>	06/03/10	Sete Barras (SP)	não informado	1 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P160	CRAS-PET	<i>Callicebus nigrifrons</i>	11/03/10	Parque da Cantareira/SP	óbito	1 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P188	Zoológico de Bauru	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	07/03/11	Boca do Acre (AM)	óbito (11/2011)	10a e 3m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P189	Zoológico de Bauru	<i>Alouatta clamitans</i>	07/03/11	Zoológico de São Paulo	não houve destinação	9a e 3m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P190	Zoológico de Bauru	<i>Alouatta belzebul</i>	07/03/11	Pará	não houve destinação	7a e 4m	negativo	negativo	positivo (1:80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P191	Zoológico de Bauru	<i>Callicebus personatus</i>	07/03/11	Rondônia	não houve destinação	8 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P192	Zoológico de Bauru	<i>Callicebus personatus</i>	07/03/11	Rondônia	não houve destinação	8 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P193	Zoológico de Bauru	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	07/03/11	IBAMA do Amazonas, Manaus	não houve destinação	2a e 9m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P194	Zoológico de Bauru	<i>Alouatta caraya</i>	07/03/11	Zoológico de Goiania (SP)	não houve destinação	6a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo <i>Viannia</i>	não testado
P195	Zoológico de Bauru	<i>Ateles chamek</i>	07/03/11	nasceu no Zoológico de Bauru	não houve destinação	2a e 4m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P196	Zoológico de Bauru	<i>Lagothrix poeppigii</i>	07/04/11	IBAMA do Amazonas, Manaus	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo <i>Viannia</i>	não testado
P197	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	07/04/11	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P198	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	07/04/11	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P199	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	07/04/11	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Data da coleta	Captura	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P200	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	07/04/11	Roraima	não houve destinação	3a e 5m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P201	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	07/04/11	Zoológico de Brasília	não houve destinação	4a e 6m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania complexo Viannia	não testado
P202	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	07/04/11	Zoológico do Rio de Janeiro	não houve destinação	15a e 5m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

APÊNDICE H – Resultados para as provas diagnósticas de *Leishmania* spp. das amostras de primatas *in situ* por espécie, local de captura e local de destinação, São Paulo, 2012.

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA					PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata	RIFI (título)	He	IHQ		
P001	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	<i>Cebus</i> spp.	10/01/09	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P056	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	<i>Cebus</i> spp.	19/03/09	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P057	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	12/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P058	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	12/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P064	Fazenda Sta. Cecília (Patrocínio Paulista)	<i>Cebus</i> spp.	26/07/08	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P066	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	14/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo
P067	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	18/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P068	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	18/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P069	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	18/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata					
P070	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	18/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P071	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	18/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P073	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	18/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P074	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	19/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P075	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	19/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P076	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	20/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P077	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	21/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P078	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	21/05/09	Zoológico de Americana (SP)	positivo	negativo	positivo (160)	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P079	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	21/05/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P080	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	21/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P081	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	23/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado

P082	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	23/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo
P083	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	29/05/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P084	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P085	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P086	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/06/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P087	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	01/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P088	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Allouata caraya</i>	01/06/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P089	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Allouata caraya</i>	01/06/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P090	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Allouata caraya</i>	02/06/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P091	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Allouata caraya</i>	02/06/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P092	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Allouata caraya</i>	02/06/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata					
P093	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/06/09	CENP	positivo	negativo	positivo (80)	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P094	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P095	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P096	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Allouata caraya</i>	03/06/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P097	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	08/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P098	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	08/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P099	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	08/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P101	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	12/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P102	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	20/06/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P104	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	23/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P105	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	23/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA					PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata	RIFI (título)	He	IHQ		
P106	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	23/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P107	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	24/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	positivo	positivo	positivo (320)	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)	não testado
P108	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P109	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	CPRJ	positivo	positivo	positivo (320)	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P110	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)	não testado
P111	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	30/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P112	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	30/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	negativo
P114	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/07/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P115	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/07/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	leishmania spp.	não testado
P123	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	positivo (80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata					
P124	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P125	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P126	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P127	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	CENP	positivo	positivo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P128	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P129	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	17/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P130	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	20/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P132	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	20/07/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	complexo viannia	não testado
P133	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	22/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	Leishmania spp. (amazonensis ou lainsoni)
P134	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	22/07/09	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P135	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 8)	<i>Allouata caraya</i>	28/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata					
P136	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P137	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	positivo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P138	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P139	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P140	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P141	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P142	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P143	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P144	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P145	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P146	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata					
P147	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/08/09	CENP	negativo	negativo	positivo (80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P148	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5 a)	<i>Callithrix penicillata</i>	10/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P149	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	31/05/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P150	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	31/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P151	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	31/05/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P152	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Allouata caraya</i>	02/09/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P153	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	23/09/09	CENP	positivo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P154	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P155	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	19/09/09	CENP	positivo	positivo	positivo (80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P156	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 8)	<i>Callithrix penicillata</i>	18/11/09	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo
P157	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5b)	<i>Callithrix penicillata</i>	24/11/10	DEPAVE (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata					
P158	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	11/08/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P161	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5b)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/11/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P163	Rondônia	<i>Saimiri boliviensis</i>	29/3/10	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P164	Rondônia	<i>Aotus infulatus</i>	29/3/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P165	Rondônia	<i>Callicebus brunneus</i>	30/3/10	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P166	Rondônia	<i>Lagothrix lagotrica cana</i>	30/3/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P167	Rondônia	<i>Cebus apella</i>	30/3/12	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P168	Rondônia	<i>Callicebus brunneus</i>	30/3/13	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P169	Rondônia	<i>Callicebus dubius</i>	31/3/10	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P170	Rondônia	<i>Lagothrix cana</i>	31/3/10	óbito	negativo	negativo	positivo (160)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P171	Rondônia	<i>Pithecia sp.</i>	01/04/10	óbito	sem soro	sem soro	sem soro	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA			RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata						
P172	BR 319 (AM)	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	29/01/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	não testado
P173	BR 319 (AM)	<i>Saguinus labiatus rufiventer</i>	30/1/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	negativo
P174	BR 319 (AM)	<i>Lagothrix cana</i>	02/01/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	<i>L. chagasi</i>
P175	BR 319 (AM)	<i>Saguinus fuscicollis mura</i>	02/01/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	não testado
P176	BR 319 (AM)	<i>Cebus macrocephalus</i>	02/02/11	óbito	positivo	positivo	não testado	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	<i>L. chagasi</i>	
P177	BR 319 (AM)	<i>Callicebus caligatus</i>	02/06/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P178	BR 319 (AM)	<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>	02/06/11	óbito	positivo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	não testado
P179	BR 319 (AM)	<i>Cebus macrocephalus</i>	02/06/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P182	BR 319 (AM)	<i>Callicebus caligatus</i>	02/07/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp.
P183	BR 319 (AM)	<i>Callicebus caligatus</i>	02/08/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp.

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína- A	anti-IgG de Primata					
P184	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P185	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	negativo
P186	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P187	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P203	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P204	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P205	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P206	Horto Florestal de Bauru (SP)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/07/11	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

APÊNDICE I – Resultados positivos para as provas diagnósticas de *Leishmania* spp. das amostras de primatas *in situ* por espécie, local de captura e local de destinação, São Paulo, 2012.

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA					PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata	RIFI (título)	He	IHQ		
P001	Fazenda Sta. Cecília (Patrocinio Paulista)	<i>Cebus spp.</i>	10/01/09	Área de Captura	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P067	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	18/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania spp.</i>	não testado
P070	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	18/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P075	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	19/05/09	Zoológico de Americana (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P076	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	20/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P077	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	21/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania spp.</i>	não testado
P078	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	21/05/09	Zoológico de Americana (SP)	positivo	negativo	positivo (160)	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P081	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Allouata caraya</i>	23/05/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P085	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA					PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata	RIFI (título)	He	IHQ		
P086	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/06/09	Zoológico de VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania spp.</i>	não testado
P093	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/06/09	CENP	positivo	negativo	positivo (80)	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P095	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/06/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P099	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	08/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P101	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 6)	<i>Callithrix penicillata</i>	12/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P107	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	24/06/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	positivo	positivo	positivo (320)	sem alterações	negativo	<i>Leishmania spp. (amazonensis ou lainsoni)</i>	não testado
P109	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	CPRJ	positivo	positivo	positivo (320)	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P110	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania spp. (amazonensis ou lainsoni)</i>	não testado
P112	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	30/06/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	negativo
P114	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/07/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA					PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata	RIFI (título)	He	IHQ		
P115	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 3)	<i>Callithrix penicillata</i>	01/07/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	leishmania spp.	não testado
P123	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	positivo (80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P126	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 5)	<i>Callithrix penicillata</i>	16/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P127	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	25/06/09	CENP	positivo	positivo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P132	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 4b)	<i>Callithrix penicillata</i>	20/07/09	CPRJ	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	complexo viannia	não testado
P133	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	22/07/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	Leishmania spp. (amazonensis ou lainsoni)
P137	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	positivo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	L. chagasi	não testado
P143	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	03/08/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P147	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	06/08/09	CENP	negativo	negativo	positivo (80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P150	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	31/05/09	Zoológico de Ribeirão Preto (SP)	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA					PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata	RIFI (título)	He	IHQ		
P151	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	31/05/09	Zoo VGS	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P152	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Allouata caraya</i>	02/09/09	CENP	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P153	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	23/09/09	CENP	positivo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P155	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	19/09/09	CENP	positivo	positivo	positivo (80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P158	São Joaquim da Barra - PCH - ADA 2 (área 9)	<i>Callithrix penicillata</i>	11/08/09	Óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P170	Rondônia	<i>Lagothrix cana</i>	31/3/10	óbito	negativo	negativo	positivo (160)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P174	BR 319 (AM)	<i>Lagothrix cana</i>	02/01/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>L. chagasi</i>
P176	BR 319 (AM)	<i>Cebus macrocephalus</i>	02/02/11	óbito	positivo	positivo	não testado	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	<i>L. chagasi</i>
P177	BR 319 (AM)	<i>Callicebus caligatus</i>	02/06/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P178	BR 319 (AM)	<i>Saimiri [ustus] madeirae</i>	02/06/11	óbito	positivo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	não testado

N° Animal	Local de captura	Nome científico	Data de coleta	Local de destino	ELISA		RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
					proteína-A	anti-IgG de Primata					
P179	BR 319 (AM)	<i>Cebus macrocephalus</i>	02/06/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp. (amazonensis ou lainsoni)
P182	BR 319 (AM)	<i>Callicebus caligatus</i>	02/07/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp.
P183	BR 319 (AM)	<i>Callicebus caligatus</i>	02/08/11	óbito	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp.

APÊNDICE J – Resultados positivos para as provas diagnósticas de *Leishmania* spp. das amostras de primatas *ex situ* por espécie, local de captura e local de destinação, São Paulo, 2012.

Nº Animal	Instituição	Nome científico	Local (captura)	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P002	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Perus/SP	CRAS	3a e 8m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P003	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P004	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Jd. São Luis/SP	CRAS	2 anos	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P006	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Nascimento DEPAVE-CRAS	eutanásia	1a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P009	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix</i> spp.	Parque Anhanguera/SP	cativoiro	2a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P010	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix jacchus</i>	Jd. Jabaquara/SP	cativoiro	1 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Local (captura)	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P011	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Bosque Brooklin/SP	cativeiro	2 m	negativo	negativo	positivo (1:80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P019	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Parque da Independência/SP	cativeiro	1 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	Leishmania spp.
P021	DEPAVE-CRAS	<i>Callithrix penicillata</i>	Osasco/SP	óbito	3 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P022	DEPAVE-Ibirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	4 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania complexo Viannia	não testado
P023	DEPAVE-Ibirapuera	<i>Callithrix penicillata</i>	Nascimento DEPAVE-CRAS	CRAS	6 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P025	DEPAVE-Ibirapuera	<i>Callithrix jacchus</i>	Vila Leopoldina/SP (CEAGESP)	cativeiro	2 a	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P038	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Zoológico de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado
P039	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Zoológico de Jardinópolis (SP)	PET	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	Leishmania spp.	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Local (captura)	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P040	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Zoológico de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	<i>Leishmania</i> spp.
P041	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Zoológico de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo Viannia	não testado
P042	CETAS LORENA	<i>Cebus spp.</i>	Zoológico de Jardinópolis (SP)	não informado	5 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	negativo	<i>Leishmania</i> spp.
P050	UNIMONTE	<i>Callithrix penicillata</i>	Mongaguá (SP)	não informado	2 m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo Viannia	não testado
P054	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	Praia grande (SP)	óbito em 18/01/09 trauma	4 m	negativo	negativo	negativo	dermatite multifocal aguda leve	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P055	UNIMONTE	<i>Callithrix jacchus</i>	Santos (SP)	não informado	8 m	positivo	positivo	negativo	sem alterações	negativo	<i>L. chagasi</i>	não testado
P190	Zoológico de Bauru	<i>Alouatta belzebul</i>	Pará	não houve destinação	7a e 4m	negativo	negativo	positivo (1:80)	sem alterações	negativo	negativo	não testado
P194	Zoológico de Bauru	<i>Alouatta caraya</i>	Zoológico de Goiania (SP)	não houve destinação	6a e 2m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo Viannia	não testado

N° Animal	Instituição	Nome científico	Local (captura)	Local de destino	Tempo de permanência na instituição	ELISA-Proteína A	ELISA-Anticorpo Específico (A140-102P-Bethyl)	RIFI (título)	He	IHQ	PCR-RFLP (sangue)	PCR-RFLP (linfonodo)
P196	Zoológico de Bauru	<i>Lagothrix poeppigii</i>	IBAMA do Amazonas, Manaus	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo Viannia	não testado
P199	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	Manaus (domiciliado)	não houve destinação	3a e 7m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> spp.	não testado
P201	Zoológico de Bauru	<i>Ateles paniscus</i>	Zoológico de Brasília	não houve destinação	4a e 6m	negativo	negativo	negativo	sem alterações	negativo	<i>Leishmania</i> complexo Viannia	não testado

APÊNDICE K – Protocolo para reação imunoenzimática (ELISA) para diagnóstico de anticorpos IgG anti-*P. falciparum* e anti- *P. vivax*. São Paulo 2012.

TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM *PF-ZW*

1. Placas Nunc *polysorp* de fundo plano foram sensibilizadas com 100 µL do extrato antigênico de *Plasmodium falciparum* a 5 µg/mL (em PBS) e incubadas por 2 horas a 37⁰C e 18 horas a 4⁰C em câmara úmida.
2. As placas foram lavadas por três vezes com PBS 0,01 M (pH 7,2) com Tween 20 a 0,05% (PBS-T).
3. As placas foram bloqueadas com 200 µL de leite desnatado a 5% em PBS-T (PBS-TL-5%) e incubadas por mais 2 horas a 37⁰C em câmara úmida.
4. Outro ciclo de lavagem foi realizado.
5. Foram adicionados 100 µL das amostras de soro diluídas em leite desnatado a 2% em PBS-T (PBS-TL-2%) às cavidades, em duplicata, com incubação de 40 minutos a 37⁰C em câmara úmida.
6. Outro ciclo de lavagem foi realizado.
7. Foram adicionados 100 µL do conjugado enzimático anti-IgG de primata-peroxidase, ou Proteína A–peroxidase, diluído em PBS-TL-2%, e incuba-se por 40 minutos a 37⁰C em câmara úmida.
8. Outro ciclo de lavagem foi realizado.

9. Adiciona-se em seguida a solução cromógena (100 μ L/cavidade): 5 mg de ortofenilenodiamina (OPD) e 5 μ L de H₂O₂ 30% em 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0), por 30 minutos a 37⁰C, em local protegido da luz.
10. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N (50 μ L/cavidade).
11. A leitura da reação foi feita medindo a absorbância em leitora de placas de ELISA com filtro de 492 nm.
12. Para cada amostra calculou-se o índice de reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste.
13. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentam IR igual ou superior a 1.

TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) COM P_vMSP1₁₉

1. Placas de poliestireno Costar 3590, *High Binding*, foram sensibilizadas com 50 μ L do antígeno P_vMSP1₁₉ (em tampão carbonato 0,05M – pH 9,6) e incubadas por 2 horas a 37⁰C e *overnight* a 4⁰C em câmara úmida.
2. As placas foram lavadas uma vez com PBS-T.
3. As placas foram bloqueadas com 200 μ L PBS-TL-5% e incubadas por 2 horas a 37⁰C em câmara úmida.
4. Outro ciclo de lavagem foi realizado.

5. Foram adicionadas 50 μL das amostras de soro diluídas em PBS-L-5% às cavidades, em duplicata, com incubação de 30 minutos a 37⁰C em câmara úmida.
6. Outro ciclo de lavagem foi realizado .
7. Foram adicionados 50 μL do conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase (Sigma 0170) diluído a 1/20.000 em PBS-L-5% e incuba-se por 30 minutos a 37⁰C em câmara úmida.
8. Outro ciclo de lavagem foi realizado.
9. Adiciona-se a solução cromógena (100 μL /cavidade): OPD a 1 mg/mL em tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0) e 5 μL de H₂O₂ 30%, por 30 minutos a 37⁰C, em local protegido da luz.
10. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N (50 μL /cavidade).
11. A leitura da reação foi feita medindo a absorbância em leitora de ELISA com filtro de 492 nm.
12. Para cada amostra calculou-se o índice de reatividade (IR) como a razão entre a absorbância pelo limiar de reatividade do teste.
13. Foram consideradas reagentes as amostras que apresentam IR \geq 1.

APÊNDICE L – Protocolo utilizado por Imunofluorescência indireta (IFI) para diagnóstico de anticorpos IgG anti-*P. falciparum*, anti-*P. vivax*. E anti-*P. malariae* - São Paulo - 2012.

- 1- As lâminas foram retiradas do congelador e deixadas secar na estufa a 37 C ou no;
- 2- Os soros foram diluídos (1:20) em PBS contendo 1% de Tween 80 (PBS-Tw 80);
- 3- Foram aplicados 15µL das diluições dos soros nas lâminas com antígeno de *P.falciparum* , *P. vivax* ou *P. malariae*;
- 4- Em seguida, foram incubadas por 30 minutos, a 37° C, em câmara úmida;
- 5- Retirou-se da estufa e as lâminas foram lavadas 2 vezes por PBS, 10 minutos cada;
- 6- Aplicar 15µL do conjugado fluorescente anti-IgG de macaco) diluído em PBS-Tw80 contendo azul de Evans;
- 7- As lâminas foram incubadas por 30 minutos, a 37° C;
- 8- Realizou-se novo ciclo de lavagens com PBS;
- 9- As lâminas foram secas ao ar;
- 10-Em seguida foram montadas com glicerina alcalina e examinadas ao microscópio fluorescente;

APÊNDICE M – Protocolo utilizado para a reação Imunoenzimática (ELISA) para diagnóstico de anticorpos IgG anti-*Leishmania* - São Paulo - 2012.

1. Microplacas de poliestireno de fundo plano de 96 poços foram sensibilizadas com um volume de 50 µL de antígeno solúvel de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, nas concentrações de 10 µg/mL de proteína, em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9.5, e incubadas em câmara úmida durante a noite a 4°C.
2. Em seguida, as placas serão lavada três vezes com 200µL por poço de Solução Tampão Fosfato 0,15M pH7.2 contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T).
3. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de leite em pó desnatado (MOLICO) a 10% em PBS (150µL por poço) e as placas incubadas em câmara úmida durante 2 horas a 37°C.
4. As placas foram lavadas novamente três vezes com PBS-T.
5. Amostras dos soros teste, assim como dos soros sabidamente positivos e negativos foram adicionadas à placa, em duplicata, no volume de 100 µL por poço, na diluição de 1:200, que mostrou melhores resultados na padronizada anteriormente realizada, e incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida.
6. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T.
7. O Conjugado anti-IgG de macaco e/ou proteína A conjugada foi adicionada no volume de 100 µL por poço, na diluição de 1:80.000, que mostrou melhores resultados na padronização anteriormente realizada, sendo as placas incubadas a 37°C, durante 45 minutos em câmara úmida.
8. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com PBS-T.

9. Posteriormente, o revelador contendo o substrato e o cromógeno em tampão adequado foi adicionado no volume de 100 μ L por poço e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi interrompida com 50 μ L de Ácido Sulfúrico (2M) por poço, sendo a leitura da absorbância feita em leitor de ELISA com filtro adequado (450 nM).

APÊNDICE N – Protocolo utilizado para a reação Imunoistoquímica (IHQ) para diagnóstico de *Leishmania* spp.- São Paulo - 2012.

- 1 - Os cortes histológicos foram desparafinados utilizando banho de xilol por 15 minutos, posteriormente banho de xilol frio (TA) por 15 minutos;
- 2 – A Hidratação dos tecidos foi realizada imergindo-os em álcool absoluto em dois banhos de 5 minutos, seguidos de banhos sucessivos de 3 minutos em álcool a 95% e 70%, seguidos de um enxágue em água destilada corrente e água destilada;
- 3 – A recuperação antigênica foi feita em solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 em banho Maria a 96-98°C por 25 minutos. Esperou-se os cortes esfriarem para seguir a reação;
- 4 – Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com 8 banhos de 5 minutos com H₂O₂ (água oxigenada 10 volumes). A água oxigenada foi descartada e acrescentou-se água corrente por 2 minutos, água destilada e em seguida, mais dois banhos de 5 minutos em PBS 0,15M pH7,2;
- 5 – O bloqueio de reação inespecífica foi feito em seguida, com solução a 6% de leite em pó desnatado (MOLICO) em PBS , durante 1 hora, à 37° C;
- 6 – Foi incubado, em seguida, com os anticorpos primários: policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongo no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas – FMUSP na diluição de 1:800 em PBS com 1% de albumina bovina durante a noite, a 4° C;
- 7 - As lâminas foram lavadas com PBS por 15 minutos, por 3 trocas de 5 minutos;
- 8 – Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (kit LSAB – K0690, DakoCytomation) durante 1 hora, à 37° C;

- 9 - As lâminas foram lavadas com PBS por 15 minutos, por 3 trocas de 5 minutos;
- 10 – As lâminas foram novamente incubadas com solução de estreptavidina-peroxidase (kit LSAB – System-HRP, K0690, DakoCytomation), durante 45 minutos à 37° C;
- 11 - As lâminas foram lavadas com PBS por 15 minutos, por 3 trocas de 5 minutos;
- 12 – A revelação da reação foi feita com o substrato cromogênico, solução de diaminobenzidina (Liquid DAB+substrate chromogen System- K3468 - DakoCtomation). Solução com 20ul de DAB+ Chromogen e 1000ul de DAB+ substrate Buffer. Em seguida, foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada;
- 13 - A contra-coloração dos cortes foi feita com hematoxilina de Harris por 2 minutos. Após lavagem dos cortes em água corrente e água destilada, seguiu-se a desidratação dos cortes e montagem das lâminas com bálsamo diluído em xilol;

APÊNDICE O – Protocolo utilizado para a reação Imunofluorescencia (IFI) para diagnóstico de anticorpos anti- *Leishmania* spp.- São Paulo - 2012.

- Colocar as lâminas para secar na estufa, a 37°C de 15 a 20 min.
- Preparar as diluições do soro, isso pode ser numa placa de 96 wells, na diluição de 1:80 (padronizado) das amostras, e controle positivo e negativo.
- Colocar 20µL do soro diluído e controles positivo e negativo nas lâminas já secas.
- Incubar 30 min na estufa 37°C.
- Lavar 3X PBS, pH 7,2 por 5 min.
- Preparar 20µL para cada poço do anticorpo anti-IgG de primata fluoresceinado na diluição de 1:100 em azul de Evans 2% e incubar 30 min a 37°C.
- Lavar 3X PBS, pH 7,2 por 5 min.
- Montar em glicerina tamponada e lamínula, ler imediatamente, ou colocar em câmara escura em freezer.