

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS-PPGVET

**STÉFHANO LUÍS CÂNDIDO**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES PATOGÊNICOS EM PRIMATAS  
NEOTROPICAIS NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL**

CUIABÁ-MT

2021

STÉFHANO LUÍS CÂNDIDO

DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES PATOGÊNICOS EM PRIMATAS  
NEOTROPICAIS NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Valéria Dutra  
Coorientador: Luciano Nakazato

Cuiabá-MT  
2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

C217d Cândido, Stéfano Luís.

DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES PATOGÊNICOS EM PRIMATAS  
NEOTROPICAIS NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL / Stéfano Luís

Cândido. -- 2021

94 f. ; 30 cm.

Orientador: Valéria Dutra.

Co-orientador: Luciano Nakazato.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de  
Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, Cuiabá, 2021.

Inclui bibliografia.

1. PCR. 2. Zoonoses. 3. Bactérias. 4. Saúde única. 5. Mamíferos. I. Título.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO****PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO****PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS****FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES PATOGENICOS EM PRIMATAS NEOTROPICAIS NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL**

Autor: Doutorando Stéfano Luis Cândido

Tese defendida e aprovada em **14 de dezembro de 2021**

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

1. Doutora Valéria Dutra (Presidente Banca / Orientadora)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
2. Doutor Kledir Anderson Hofstaetter Spohr (Examinador Interno)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
3. Doutor Richard de Campos Pacheco (Examinador Interno)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
4. Doutor Marcelo Marques da Silveira (Examinador Externo)  
Instituição: SECRETARIA DE ESTADO DE EDUCAÇÃO-SEDUC/MT
5. Doutora Thábata dos Anjos Pacheco (Examinador Externo)  
Instituição: INSTITUTO FEDERAL DE RONDÔNIA
6. Doutora Janaína Marcela Assunção Rosa Moreira (Examinador Suplente)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Cuiabá, 14 de dezembro de 2021



Documento assinado eletronicamente por **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 14/12/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **VALERIA DUTRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 14/12/2021, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art.





6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **RICHARD DE CAMPOS PACHECO, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 15/12/2021, às 07:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Marques da Silveira, Usuário Externo**, em 05/01/2022, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thabata dos Anjos Pacheco, Usuário Externo**, em 07/01/2022, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.ufmt.br/sei/controlador\\_externo.php?](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4263054** e o código CRC **396D040F**.

## DEDICATÓRIA

A todos meus ancestrais aos quais a vida passou até chegar a mim. Em especial ao meu pai Osvaldo (*in memoriam*) e ao meu avô Dimas (*in memoriam*), sei que onde quer que estejam, vocês torcem por minhas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus. Aos meus pais, Osvaldo (*in memoriam*) e Andréia, pelo amor, dedicação, pelos esforços para que eu pudesse ter a melhor educação e por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Aos meus irmãos e a todos os meus demais familiares, em especial a minha avó e avô (*in memoriam*) que sempre quiseram um neto Doutor.

Ao Luiz Pita por sempre estar ao meu lado e me encorajar, à Sofia e Juliana também.

Agradeço a minha primeira orientadora de PIBIC, Cláudia Andrade, por me despertar o interesse pela pesquisa, juntamente com as professoras Amanda Baviera e Nair Honda (*in memoriam*).

Aos meus orientadores, Professora Valéria Dutra e Professor Luciano Nakazato, o meu agradecimento especial pela paciente orientação e principalmente pela oportunidade de me manter no mundo científico desde a graduação pelos projetos de Extensão, como bolsista PIBIC, no mestrado e agora Doutorado. Obrigado por compartilharem os seus conhecimentos e por todos os ensinamentos que levarei para vida.

A todos os amigos dos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular por quem tenho um carinho enorme. Muitos momentos de descontração e aprendizados compartilhamos.

Aos amigos, professores e funcionários de outros setores do HOVET que trouxeram mais alegria para a Micro/Biomol durante minha estadia.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram comigo me incentivando

A todos os animais em especial a Julie, minha pinscher, a mais doce e amorosa do mundo.

Agradeço as as demais pessoas, que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse realizar este sonho.

A todos o meu muito obrigado!

## RESUMO

Com o crescimento das cidades, o desmatamento, a expansão da agricultura e a manutenção da fauna silvestre em cativeiro, os primatas neotropicais estão mais próximos dos humanos, aumentando o risco de disseminação das zoonoses, pois podem atuar como reservatórios de inúmeros patógenos. No Brasil, as informações sobre a sanidade desses animais são escassas e o diagnóstico pode auxiliar no entendimento epidemiológico para implementação de medidas profiláticas e controle dessas doenças. Portanto, o presente estudo teve como objetivo verificar o perfil sanitário de primatas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entre 2017 e 2019, foram coletadas amostras de sangue total de 38 primatas Neotropicais de vida livre e cativos de seis espécies diferentes (*Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Aotus infulatus*, *Ateles marginatus*, *Mico melanurus* e *Sapajus apella*), oriundas de sete cidades do estado de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil. Os agentes pesquisados foram: *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. Para os tripanossomatídeos, nove (23,68%) amostras positivas foram identificadas para o gênero *Leishmania*: sete (18,42%) como *L. infantum* e dois (5,26%) animais foram positivos para *L. (L.) amazonensis*; e dois (5,26%) animais para o gênero *Trypanosoma*: um *T. minasense* e outro *T. rangeli*. Foi detectado *L. infantum* na espécie *Aotus azarae*, sendo a primeira descrição dessa associação espécie-hospedeiro. Para os demais agentes, 11 (28,95%) amostras foram positivas para *T. gondii*, 10 (26,32%) foram positivas para *N. caninum* e 13 (34,21%) amostras apresentaram DNA de *Brucella* spp. Nesse estudo não foi encontrado a presença de material genético de *Leptospira* spp. nas amostras testadas. Esta pesquisa contribuiu para o entendimento do perfil sanitário de primatas neotropicais de vida livre e de cativeiro no Estado de Mato Grosso, Brasil, e demonstrou a importância desses animais em desempenhar o papel de hospedeiros e possíveis fontes de infecção dos agentes encontrados para outros animais e humanos. A detecção molecular evidenciou a susceptibilidade dos animais dessa região a inúmeros patógenos potencialmente fatais, implicando diretamente na sua conservação. Este é o primeiro estudo realizado no Estado de Mato Grosso em que se avalia o perfil sanitário de primatas neotropicais de vida livre e cativos.

**Palavras-chave:** PCR, zoonoses, tripanossomatídeos, bactérias, macacos.

## ABSTRACT

With the growth of cities, deforestation, the expansion of agriculture and the maintenance of wild fauna in captivity, neotropical primates are closer to humans, increasing the risk of spreading zoonoses, as they can act as reservoirs for numerous pathogens. In Brazil, information about the health of these animals is scarce and the diagnosis can assist in the epidemiological understanding for the implementation of prophylactic measures and control of these diseases. Therefore, the present study aimed to verify the health profile of primates through the Polymerase Chain Reaction (PCR). Between 2017 and 2019, whole blood samples were collected from 38 free-living and captive Neotropical primates of six different species (*Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Aotus infulatus*, *Ateles marginatus*, *Mico melanurus* and *Sapajus apella*), from seven cities in the state of Mato Grosso, Midwest of Brazil. The investigated agents were: *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. For trypanosomatids, nine (23.68%) positive samples were identified for the genus *Leishmania*: seven (18.42%) as *L. infantum* and two (5.26%) animals were positive for *L. (L.) amazonensis*; and two (5.26%) animals for the genus *Trypanosoma*: one *T. minasense* and another *T. rangeli*. *L. infantum* was detected in the species *Aotus azarae*, being the first description of this species-host association. For the other agents, 11 (28.95%) samples were positive for *T. gondii*, 10 (26.32%) were positive for *N. caninum* and 13 (34.21%) samples showed DNA from *Brucella* spp. In this study, the presence of *Leptospira* spp. genetic material was not found in the tested samples. This research contributed to the understanding of the health profile of free-living and captive neotropical primates in the State of Mato Grosso, Brazil, and demonstrated the importance of these animals in playing the role of hosts and possible sources of infection of the agents found for other animals and humans. Molecular detection showed the susceptibility of animals in this region to numerous potentially fatal pathogens, directly implying their conservation. This is the first study carried out in the State of Mato Grosso in which the health profile of free-living and captive neotropical primates is assessed.

**Key-words:** PCR, zoonosis, trypanosomatids, bacterial, monkeys.

## SUMÁRIO

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO                                                         | 12 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                              | 14 |
| 2.1 PRIMATAS NEOTROPICAIS                                            | 14 |
| 2.2 TRIPANOSSOMATÍDEOS                                               | 16 |
| 2.2.1 <i>LEISHMANIA</i> spp.                                         | 17 |
| 2.2.1.1 <i>Leishmania infantum</i>                                   | 21 |
| 2.2.1.2 <i>Leishmania amazonensis</i>                                | 25 |
| 2.2.2 <i>TRYPANOSOMA</i> spp.                                        | 27 |
| 2.2.2.1 <i>Trypanosoma minasense</i>                                 | 28 |
| 2.2.2.2 <i>Trypanosoma rangeli</i>                                   | 29 |
| 2.3 <i>NEOSPORA CANINUM</i>                                          | 31 |
| 2.4 <i>TOXOPLASMA GONDII</i>                                         | 34 |
| 2.5 <i>BRUCELLA</i> spp.                                             | 38 |
| 2.6 <i>LEPTOSPIRA</i> spp.                                           | 41 |
| 3 OBJETIVOS                                                          | 44 |
| 3.1 Objetivo geral                                                   | 44 |
| 3.2 Objetivos específicos                                            | 44 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS                                                 | 45 |
| 4.1 Comitê de ética                                                  | 45 |
| 4.2 Amostras                                                         | 45 |
| 4.3 Extração de DNA e verificação de viabilidade                     | 46 |
| 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os agentes pesquisados | 47 |
| 4.5 Sequenciamento de DNA                                            | 48 |
| 4.6 Cladograma de <i>Trypanosoma</i> spp.                            | 48 |
| 4.7 Histopatológico e imuno-histoquímica para <i>T. gondii</i>       | 48 |
| 5 RESULTADOS                                                         | 49 |
| Artigo 1                                                             | 50 |
| Artigo 2                                                             | 57 |
| REFERÊNCIAS                                                          | 72 |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| APÊNDICE                                                                | 89 |
| Apêndice A – Tabela geral dos resultados obtidos                        | 89 |
| ANEXOS                                                                  | 92 |
| Anexo A – Certificado do Comitê de Ética – UFMT                         | 92 |
| Anexo B – Classificação dos Periódicos                                  | 93 |
| Anexo C - Confirmação de submissão do artigo 1 (Aceito para publicação) | 94 |
| Anexo D - Confirmação de submissão do artigo 2                          | 94 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os primatas não humanos estão presentes em aproximadamente 90 países, sendo que o Brasil, juntamente com Madagascar, Indonésia e República Democrática do Congo possuem 65% das espécies de primatas do mundo, e 60% dessas estão ameaçadas de extinção. Dessa forma, o Brasil tem um papel fundamental na conservação desses animais (Estrada et al., 2018).

Outra característica importante é que os primatas neotropicais se distribuem pelo continente americano, incluindo o Brasil, e apresentam grande variação quanto aos hábitos, porte físico e características próprias (Reeder e Wilson, 2005).

Esses animais são suscetíveis a infecções pelos mais variados tipos de patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitos, e possuem grande relevância epidemiológica, pois podem atuar como hospedeiros e reservatórios desses agentes (Solórzano-García e León, 2018).

O crescimento das cidades, expansão da agricultura, aumento do desmatamento e a manutenção da fauna silvestre em cativeiro são fatores que permitem maior proximidade entre os primatas neotropicais e os humanos o que aumenta consideravelmente o risco de disseminação de zoonoses. Assim sendo, o estudo e a compreensão dessa relação fornecem informações relevantes no âmbito epidemiológico, permitindo o conhecimento da dinâmica de transmissão, do papel sentinela do hospedeiro e dos riscos de surgimento/ressurgimento dessas doenças (Aysanoa et al., 2017).

As zoonoses constituem um sério problema de saúde pública, uma vez que há uma grande variedade de espécies de animais envolvidas, assim como de agentes etiológicos e, desta forma, estudos de prevalência, ocorrência e biodiversidade de patógenos são econômica e sanitariamente favoráveis por apresentarem um panorama que permite a intervenção e minimiza o surgimento de endemias e epidemias (Aysanoa et al., 2017).

Torna-se indispensável a aplicação da saúde única, onde o médico veterinário e as pesquisas por ele realizadas assumem um importante papel na identificação e acompanhamento das zoonoses, o que reflete de maneira positiva na conservação



das espécies animais, bem como na manutenção da saúde pública sobretudo nas particularidades da região sob estudo (Brandão, 2016).

No Brasil, as informações sobre o perfil sanitário e a possibilidade dos primatas de atuarem como reservatórios de doenças são escassas em comparação com a diversidade da fauna existente no país, e o diagnóstico pode facilitar a implementação de medidas profiláticas para o controle de zoonoses, especialmente para primatas não humanos devido à sua proximidade fisiológica, genética e geográfica com humanos (Wolfe et al., 1998; Coimbra et al., 2020).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo detectar molecularmente, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), os patógenos: *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em primatas neotropicais de vida livre e cativos no Estado de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRIMATAS NEOTROPICAIS

A ordem dos primatas é composta pelos animais mamíferos que apresentam cinco dígitos nos pés e mãos, unhas no lugar de garras, polegares opositores, visão de profundidade e comportamentos complexos aprendidos e não apenas instintivos, o que inclui o homem. Esses indivíduos possuem uma complexa organização social onde as crias são muito dependentes das mães e possuem uma infância prolongada (Lewin, 2005).

Os primatas não humanos são divididos em dois grandes grupos, sendo eles: os primatas do Velho Mundo (Europa, Ásia, África e Oceania) e os primatas do Novo Mundo (América). No último grupo, os primatas são conhecidos como neotropicais, no qual fazem parte os gêneros *Cebuella*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Callicebus*, *Pithecia*, *Lagothrix*, *Brachyteles*, *Ateles*, *Aotus*, *Saimiri*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Cebus*, *Alouatta* (Seuánez et al., 2005) e *Sapajus* (Alfaro et al., 2012).

Os primatas neotropicais são menores e possuem maior habilidade com os pés e mãos em relação aos do Velho Mundo, características que facilitam a adaptação à hábitos arborícolas. Algumas espécies possuem a cauda preênsil, que associada a mobilidade desenvolvida dos membros superiores, facilita a locomoção por braquiação (Chaves et al., 2011).

Enquanto os primatas do Velho Mundo vivem no solo, de maneira geral, os primatas neotropicais passam maior parte do tempo sobre as árvores e raramente descem ao chão. Diferenças anatômicas e os hábitos alimentares são bem variados ao se comparar as diferentes espécies do Novo Mundo, mesmo aquelas nativas de um mesmo país (Schneider e Sampaio, 2013).

Esses animais possuem grande relevância ecológica por dispersarem diversas sementes dos mais variados tipos de plantas sendo, portanto, importantes na manutenção do ecossistema florestal (Heymann et al., 2019). Outra característica de grande importância é que são susceptíveis aos mais variados tipos de patógenos,

muitos dos quais zoonóticos. Portanto, servem de hospedeiro/reservatório, tanto em situações de vida livre quanto em cativeiro (Solórzano-García e León, 2018).

A infecção por esses patógenos põe em risco a sobrevivência e a conservação das espécies primatas, pois muitas delas são altamente sensíveis e desenvolvem um quadro clínico-patológico agudo e potencialmente fatal, o qual pode ser em um único indivíduo ou, de maneira devastadora, em surtos. Dessa forma, o monitoramento e estudo das relações patógeno-hospedeiro são indispensáveis (Aysanoa et al., 2017; Santana et al., 2020).

Além do acometimento infeccioso, a invasão do habitat primata, comércio ilegal, caça e manutenção dos animais em cativeiros são fatores que se somam na contramão de sua preservação, o que também põe em risco a saúde humana, pois quanto maior o contato entre humanos e animais, mais expostos estão os humanos a adquirirem doenças zoonóticas e vice-versa (Estrada et al., 2018).

Dessa forma, devido à grande variedade de espécies envolvidas bem como dos agentes etiológicos, estudos de identificação dessa relação são imprescindíveis para a prevenção e o controle de doenças, o que reflete positivamente na conservação dos primatas neotropicais, bem como na Saúde Única no que tange as zoonoses (Brandão, 2016; Kluyber et al., 2020; Aliaga-Samanez et al., 2021).

Devido a escassa literatura acerca dos primatas neotropicais estudos envolvendo esses animais são importantes, principalmente no Brasil, que possui nativamente 102 das 439 espécies de primatas do mundo, distribuídas por todo o território nacional (Estrada et al., 2018).

## 2.2 TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os tripanossomatídeos são protozoários pertencentes a classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae, envolvem espécies que parasitam e/ou causam doenças em plantas, humanos e em animais vertebrados e invertebrados. São organismos móveis, uniflagelados onde este flagelo se estende a partir da bolsa flagelar situada próxima ao cinetoplasto. O cinetoplasto, por sua vez, é uma rede condensada de inúmeras cópias do DNA mitocondrial, denominado de kDNA, presente dentro da mitocôndria do parasito, a qual é grande e única (Maslov et al., 2019).

Outra característica desse grupo é a presença de organelas denominadas glicossomos, que são peroxissomos modificados, onde ocorre a maioria das reações da glicólise e também da via das pentoses-fosfato e beta oxidação de ácidos graxos, que são vias metabólicas usadas na produção de energia celular (Michels et al., 2006).

A família *Trypanosomatidae* compreende os seguintes gêneros: seis que abrigam parasitas monoxênicos de insetos (*Sergeia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Wallaceina*), um de parasitas heteroxênicos de insetos e plantas (*Phytomonas*) e os gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma* que abrigam espécies de importância médica e veterinária, e que possuem ciclo dioxeno, ou seja, são capazes de infectar dois hospedeiros (insetos e vertebrados), sendo transmitidos pelo inseto vetor (Maslov et al., 2001; Stevens et al., 2001).

É nesse grupo que se encontram os agentes etiológicos de doenças de grande importância em saúde pública como a Doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e pela Doença do Sono causada por *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), além das inúmeras espécies do gênero *Leishmania*, causadoras dos diferentes tipos de leishmaniose (Kaufer et al., 2017).

Grandes modificações morfológicas e bioquímicas são responsáveis pela sobrevivência e multiplicação desses organismos nos hospedeiros. Dessa forma, os tripanossomatídeos assumem durante o seu ciclo de vida várias morfologias, diferenciadas pelo tamanho do flagelo e local de inserção deste em relação ao núcleo. Dentre estas estão: tripomastigota, amastigota (dentro de macrófagos de vertebrados), epimastigota, forma intermediária, promastigota, paramastigota, opistomastigota, opistomorfo e coanomastigota (De Souza, 2002).

A divisão das células/reprodução dos tripanossomatídeos ocorre por fissão binária. A sequência de eventos dessa divisão se dá por: 1 - produção do novo flagelo; 2 - duplicação e divisão do núcleo; 3 - duplicação e divisão do cinetoplasto; 4 - segregação dos núcleos, flagelos e dos cinetoplastos para as extremidades; 5 - citocinese anteroposterior no eixo longitudinal direcionada pela zona de ligação do flagelo (Maslov et al., 2019).

### 2.2.1 *LEISHMANIA* spp.

A primeira descrição do gênero *Leishmania* foi realizada pelo médico inglês Ronald Ross em 1903, quando nomeou a doença em homenagem ao patologista escocês William Boog Leishman. Uma das características deste gênero é a grande diversidade de espécies, e a classificação destas é um processo contínuo, que abrange subdivisões em subgêneros e complexos. São parasitas intracelulares obrigatórios, heteroxenos, onde uma parte do ciclo de vida ocorre no vetor invertebrado [fêmeas dos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo)] e a outra em hospedeiros vertebrados mamíferos (Mann et al., 2021).

Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada que infecta principalmente as populações da Ásia, África, Oriente Médio e América Latina e possui como fatores de risco a desnutrição, pobreza, migração da população, estado de imunocomprometimento, falta de higiene e a presença do vetor (Oryan e Akbari, 2016).

O gênero *Leishmania* possui mais de 20 espécies, as quais são agrupadas em dois subgêneros, baseado na localização do parasito no intestino do inseto vetor: *Leishmania* (intestino médio e anterior) e *Viannia* (intestino anterior, intestino médio e posterior). Entre as principais que pertencem ao subgênero *Viannia* estão: *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (V) shawi*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) peruviana*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) colombiensis*; e nas do subgênero *Leishmania* estão: *L. (L) amazonensis*, *L. (L) chagasi*, *L. (L) mexicana*, *L. (L) pifanoi*, *L. (L) venezuelensis*, *L. (L) donovani*, *L. (L) tropica*, *L. (L) aethiopica* e *L. (L) major* (Torres-Guerrero et al., 2017).

Dentro da família *Trypanosomatidae*, o gênero *Leishmania* é o que possui o maior número de espécies envolvidas na transmissão a humanos e animais, e apresentam variações no que se refere a preferência por inseto vetor, distribuição geográfica e virulência, que reverberam diretamente no diagnóstico, tratamento, criação de vacinas e controle da doença (Alvar et al., 2012).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. apresenta dois estágios morfológicos distintos: promastigotas e amastigotas. A forma promastigota é móvel, alongada e apresenta flagelo desenvolvido. Se desenvolve no intestino médio do inseto vetor. A forma amastigota apresenta-se tipicamente com formato oval/arredondo e possui o flagelo muito pequeno, visto apenas sob microscopia eletrônica. Ocorre de forma exclusivamente intracelular que se desenvolve no interior do vacúolo parasitóforo, que se forma no citoplasma de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (Teixeira et al., 2013).

De maneira geral, o ciclo de vida das leishmanias é semelhante entre as espécies. A transmissão ocorre ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos vetores contaminadas, por meio da inoculação na derme de formas promastigotas juntamente com a saliva do flebotomíneo (Scott et al., 2016).

Após a inoculação na pele, os parasitos são fagocitados pelos macrófagos e internalizados no vacúolo parasitóforo, onde se diferenciarão na forma amastigota, que por divisão binária se multiplicam, por um período de 4 a 6 dias, até que os macrófagos se rompam, liberando os parasitos que serão fagocitados por novas células hospedeiras em ciclos sucessivos, culminando na infecção, propagação e estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero. Neutrófilos, células dendríticas, fibroblastos e monócitos também são recrutados para o local da infecção e podem servir de células hospedeiras (Bogdan, 2020).

A transmissão da *Leishmania* para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, se alimenta em um hospedeiro infectado e, nesse processo, ingere macrófagos contendo as formas amastigotas do sangue. As formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas, se multiplicam, sofrem metaciclogênese transformando-se em promastigotas metacíclicas, as quais não possuem capacidade proliferativa, porém caracterizam-se por possuírem alta capacidade de infectar as células dos mamíferos e serão

transmitidas a um novo hospedeiro mamífero durante a alimentação da fêmea do vetor. O curso da doença é intimamente ligado aos estágios iniciais da infecção, pelas interações das células de defesa e o parasito (Bogdan, 2020).

A leishmaniose, de maneira geral, é caracterizada por um conjunto de síndromes com sitomatologias complexas, causadas pelas diferentes espécies do gênero. Por isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as leishmanioses em grupos clínicos diferentes: leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (Burza et al., 2018)

A cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas na pele, principalmente na face e extremidades, apresentam-se como pápulas indolores que progridem para nódulos e depois úlceras. A forma cutânea difusa é caracterizada por lesões não ulceradas por toda a pele, acomete principalmente indivíduos com deficiência na resposta celular, tendo a gravidade relacionada pela característica das lesões disseminadas e da dificuldade de tratamento. A mucocutânea causa extensiva destruição da cavidade oral/nasal e faringe com lesões desfigurantes, leva a secreções e obstruções nasais, epistaxe e dor. Envolve inicialmente nariz e boca, mas pode progredir para faringe e laringe. A forma mais grave é a visceral, de caráter sistêmico atinge o baço, fígado, linfonodos, entre outros órgãos, e possui elevada taxa de mortalidade em pacientes não tratados (Burza et al., 2018; Mann et al., 2021).

Na forma cutânea *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. infantum* e *L. donovani* são as de maior importância no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* no Novo Mundo. Para a forma cutânea difusa *L. aethiopica* é a mais importante no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* no Novo Mundo. Na forma mucocutânea *L. tropica*, *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum* são as mais importantes para o Velho mundo e *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* e *L. amazonensis* para o Novo Mundo. Dentre a forma visceral *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica* são as mais importantes no Velho Mundo e *L. chagasi* (espécie idêntica a *L. infantum*, mas no Novo Mundo) e *L. amazonensis* são as mais significativas no Novo Mundo (Mann et al., 2021).

A profilaxia se dá pela erradicação do vetor por meio de inseticidas, eliminação de água estagnada e uso de repelentes. A utilização de roupas grossas com mangas

e calças compridas, que também podem ser impregnadas de inseticidas. Evitar caminhada em áreas de mata, principalmente à noite, e o tratamento dos casos humanos (Torres-Guerrero et al., 2017).

O diagnóstico nem sempre é de fácil realização. Deve-se levar em consideração o histórico clínico, epidemiologia do local e exames laboratoriais confirmatórios. A presença de úlcera cutânea indolor e não purulenta no rosto ou nas extremidades pode indicar uma leishmaniose cutânea. Febres prolongadas, leucopenia, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia podem sugerir leishmaniose visceral. Como diagnóstico direto é preferido microscopia, cultura e PCR de tecido por raspagem, biópsia ou aspirado para a forma cutânea e biópsia do baço, sangue total ou medula óssea para a visceral, principalmente (Aronson et al., 2017). Outras técnicas mais recentes como a técnica de sonda de nanopartículas de ouro (AuNPprobes) também são empregadas e possuem boa sensibilidade e especificidade (Rosa et al., 2013).

O tratamento da leishmaniose pode ser bastante desafiador. Geralmente, é adaptado individualmente de acordo com a apresentação clínica, hospedeiro e tipo de espécie. Desse modo, o diagnóstico exato do agente por meio de testes moleculares é útil por orientar a terapia mais adequada. Alguns dos fármacos utilizados em humanos são: estibogluconato de sódio, anfotericina B lipossomal, antimoniato de meglumina, pentamidina, miltefosina, fluconazol e cetoconazol (Burza et al., 2018).

Dentre os animais, os cães assumem grande importância na leishmaniose pela alta prevalência da doença nesses animais nas áreas endêmicas, os quais apresentam um intenso parasitismo cutâneo. A leishmaniose visceral canina é uma doença sistêmica severa cujas manifestações clínicas são dependentes do tipo de resposta imune que o animal infectado expressa. O quadro clínico varia desde casos assintomáticos até estágio de acometimento fatal (Giunchetti et al., 2006).

A leishmaniose canina é mais resistente ao tratamento do que a leishmaniose humana; poucos casos obtêm a cura e as recidivas são frequentes, onde muitos protocolos apresentam ótimas reduções dos sinais clínicos, mas poucos curam. Dentre as drogas indicadas, destacam-se o alopurinol, antimoniato de n-metilglucamina, combinações dos dois, aminosidina, anfotericina B, pentamidina e miltefosina (Salzo, 2008).



### 2.2.1.1 *Leishmania infantum*

A *L. infantum*, pertencente ao subgênero *Leishmania*, é o agente etiológico da leishmaniose visceral americana, e foi relatada pela primeira vez por Cunha e Chagas em 1937, descrita como uma nova espécie em razão da incapacidade de produzir, de modo experimental, a leishmaniose visceral no cão doméstico. É uma doença de notificação obrigatória (Silveira et al., 2010).

Ao comparar cepas de *L. (L.) chagasi* isoladas de diferentes origens e países da América do Sul e cepas de *L. (L.) infantum* originadas de países europeus da Bacia do Mediterrâneo, pela técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), demonstrou que as sequências de DNA de ambas as espécies de parasita eram idênticas. Desse modo, concluiu-se que *L. (L.) chagasi* é equivalente a *L. (L.) infantum* e os autores propuseram que *L. (L.) chagasi* não deveria ser considerada uma espécie válida (Mauricio et al., 1999).

Alguns autores, porém, defendem a utilização de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, ou seja, em um nível subespecífico (Lainson e Shaw, 2005; Silveira et al., 2010).

Existem vacinas contra a leishmaniose canina sendo comercializadas no Brasil. Estudos de segurança e eficácia nos estados de São Paulo e Minas Gerais, demonstraram a eficácia vacinal em 76 - 80% e proteção em 92 - 96% dos cães. E, com a vacinação, foi percebida a diminuição da doença em cães e humanos (Moreira, 2013). Outra possibilidade é o uso de coleiras para cães impregnadas com inseticida, que servem como uma alternativa viável para inclusão como medida de saúde pública para o controle da leishmaniose canina e, conseqüentemente, diminuição dos riscos à saúde humana (Yimam e Mohebal, 2020).

No Brasil, o *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* são os principais vetores responsáveis pela transmissão da Leishmania Visceral. Esses vetores possuem atividade crepuscular e noturna, hábitos peridomiciliar e adaptam-se a diversas temperaturas, dessa forma possuem alta capacidade de dispersão dessa zoonose (Olivier et al., 2005).

Em um estudo conduzido em Cuiabá, Mato Grosso, que objetivou descrever a fauna flebotomínica da região, observou que dos 1.909 vetores coletados, as espécies

mais frequentes foram *Lu. cruzi* (81,25%), *Lu. whitmani* (13,88%) e *Lu. longipalpis* (2,62%), concomitante ao avaliar a prevalência de leishmaniose canina nos cães da região estudada, observou-se uma taxa de 26,86% de soropositividade, onde as áreas com grande densidade de vetores coincidiam com as de maior prevalência da doença (Mestre et al., 2011).

Uma importante relação epidemiológica é que os mamíferos silvestres servem como reservatório primário de infecção para o vetor, e na região urbana o cão doméstico é a principal fonte de infecção o que é intensificado pela sua alta carga parasitária cutânea (Giunchetti et al., 2006).

Embora menos frequente, *L. infantum* acomete também gatos. Um estudo da prevalência de *Leishmania* em gatos errantes de áreas urbanas de Zaragoza (Espanha) utilizando diversas técnicas, evidenciou que das 179 amostras de sangue coletadas foi encontrado 2,2% (4/179) de positividade para infecção por *Leishmania* pelo teste de anticorpos imunofluorescentes (IFAT), 2,8% (5/179) por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e 14,5% (26/179) por western blot (WB). O DNA de *Leishmania* foi detectado por qPCR em 5,6% (10/179) dos gatos. Os resultados obtidos demonstraram a existência de infecção assintomática por *L. infantum* em gatos errantes aparentemente saudáveis na região estudada (Alcover et al., 2021).

Em 2018, foi reportado o primeiro relato de leishmaniose felina com manifestação ocular no Brasil, cujo diagnóstico foi confirmado pela análise do humor aquoso, o qual continha amastigotas de *L. infantum*, confirmada por cultura parasitológica e PCR. O felino de 8 anos era residente da cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, e apresentou resultados negativos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV) e *T. gondii*, patógenos a serem considerados no diagnóstico diferencial para o quadro clínico apresentado (Madruga et al., 2018).

Também em Cuiabá, 16 felídeos selvagens do Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso foram submetidos a pesquisa de *L. infantum* por meio de PCR-RFLP, onde o DNA do parasito foi identificado em cinco pumas (*Puma concolor*) e em uma onça-pintada (*Panthera onca*), reforçando a susceptibilidade desses animais como hospedeiros e possíveis reservatórios (Dahroug et al., 2009).

Um estudo comparativo entre tigres (*Panthera tigris*) de cativeiro positivos para *L. infantum* e negativos para esse agente, demonstrou que os animais positivos se apresentavam assintomáticos, o que pode levar a um desconhecimento da existência da infecção nesses animais, sendo um potencial reservatório de infecção para os animais vizinhos. Os achados reforçam a importância de exames de rotina para avaliar a sanidade dos animais cativos (Cavalera et al., 2020).

Ao avaliar a situação epidemiológica das leishmanioses nos sete municípios mato-grossenses que abrangem o bioma Pantanal, foi reportado pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificação que de 2007 a 2016 essa região apresentou dez casos da forma visceral e 499 da forma tegumentar em humanos, em seis das cidades avaliadas. A presença dos vetores da leishmaniose tegumentar ocorreu em seis municípios e da leishmaniose visceral ocorreu em cinco. O estudo demonstrou que leishmaniose é endêmica na região tanto em humanos quanto em cães (Brito et al., 2019).

Na avaliação das anormalidades clínico-dermatológicas, histológicas e prevalência *L. infantum* em 150 cães da região Centro-Oeste do Brasil, demonstraram que do total dos animais avaliados 15 (10%) apresentaram infecção por *L. infantum*, dos quais não houve associação ( $p > 0,05$ ) dessas infecções com a raça, sexo, idade ou alterações cutâneas. Dos 15 animais positivos, 12 apresentaram achados histopatológicos que incluíam infiltrados inflamatórios granulomatosos crônicos e estruturas compatíveis com amastigotas, causando, portanto, alteração cutânea macro e microscópica (Makino et al., 2020).

Em outro estudo conduzido na cidade de Nossa Senhora do Livramento, também no Estado de Mato Grosso, que avaliou a percepção, prevalência e distribuição espacial de *L. infantum*, em cães, demonstrou que dos 385 animais testados no teste rápido imunocromatográfico e por ELISA, 54 (14%) apresentaram-se positivos. Estatisticamente, foi associada o conhecimento dos sinais da leishmaniose canina pelos tutores ( $p = 0,038$ ), a ocorrência prévia da doença na vizinhança ( $p = 0,022$ ), o cão sintomático ( $p = 0,014$ ), esplenomegalia ( $p = 0,055$ ) e a presença de úlcera em ponta de orelha ( $p = 0,059$ ). A doença apresentou-se distribuída tanto em meio urbano quanto no rural e ficou evidente a expressiva prevalência da leishmaniose visceral canina na cidade estudada, onde requer a

implementação de estratégias de controle e prevenção, focadas na educação em saúde e no manejo ambiental (Carvalho et al., 2020).

Em uma pesquisa para averiguar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* (IgG) pelo teste de imunofluorescência de anticorpos em 660 cavalos, aparentemente saudáveis distribuídos nas regiões centro e norte da Itália entre 2016 e 2019, demonstrou uma soroprevalência média de 13,9% para *L. infantum*. O estudo reforça que os cavalos são frequentemente expostos a *L. infantum*, principalmente em lugares em cães estão presentes (Gazzonis et al., 2020).

No Brasil, 100 amostras de sangue bovino foram submetidas a PCR geral para tripanossomatídeos, uma amostra obteve resultado positivo, onde após sequenciamento do DNA amplificado, concluiu-se que era *L. infantum*. O estudo evidencia a possibilidade de infecção de bovinos por *L. infantum* no rebanho brasileiro (Vioti et al., 2019).

A descrição de *L. infantum* já foi reportada em animais silvestres incomuns como a lontra euroasiática (*Lutra lutra*) em cativeiro na Espanha. O animal apresentava sintomatologia clínica como epistaxe bilateral, anorexia, apatia, perda de peso, além de hiperproteinemia, hiperglobulinemia, diminuição da paraoxonase-1, aumento da haptoglobina e ferritina e proteinúria. Nefropatia bilateral com hidronefrose, linfadenomegalia mesentérica e ascite também foram observadas. A confirmação da infecção por *L. infantum* foi por microscopia, qPCR e sorologia. Desse modo, ficou evidente a susceptibilidade dessa espécie à infecção com desenvolvimento de sinais clínicos severos (Cantos-Barreda et al., 2020).

*L. infantum* já foi detectada também em morcegos (59,2% (16/27)) urbanos da espécie *Pipistrellus pipistrellus* na Europa. Esse foi o primeiro relato da detecção nessa espécie (Azami-Conesa et al., 2020) e em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) na França (Medkour et al., 2020).

Em primatas, alguns estudos têm sido realizados. Em um deles cinquenta e dois primatas não humanos mantidos em cativeiro em uma área endêmica para leishmaniose na cidade de Belo Horizonte, Brasil, foram testados sorologicamente para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Posteriormente, fêmeas do vetor *Lu. longipalpis* foram alimentadas com estes animais e testadas por qPCR para

identificar e quantificar a presença de promastigotas de *L. infantum*. Oito animais dos 52 primatas não humanos submetidos ao estudo foram positivos, incluindo três chimpanzés (*Pan troglodytes*), três mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), um macaco-prego (*Sapajus apella*) e um talapoim (*Miopithecus talapoin*). Desta forma, o estudo comprovou que primatas não humanos em cativeiro são capazes de infectar *Lu. longipalpis* com *L. infantum*, demonstrando a importância desses animais como sentinelas de zoonoses e seu acometimento pode refletir negativamente na saúde pública (Oliveira et al., 2019).

Dois casos de leishmaniose clínica já foram relatadas em orangotangos (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) em Madrid, Espanha. Os animais apresentavam anemia, hipoalbuminemia e esplenomegalia. Amastigotas de *L. infantum* foram detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica em amostras de sangue e medula óssea. Os animais foram tratados com miltefosina oral por 28 dias; alopurinol também foi administrado. Houve uma considerável melhora clínica, mas não obtiveram a cura parasitológica, pois molecularmente amostras de sangue e medula óssea dos dois orangotangos ainda se apresentavam positivas. Nos recintos foi confirmada a presença do vetor flebotomíneo identificado como *Phlebotomus perniciosus* (Miró et al., 2018).

Em um estudo investigativo em 26 saguis em São Paulo, no sudeste do Brasil, demonstrou que sete saguis (7/26; 26,9%), sendo cinco *Callithrix penicillata* e dois *Callithrix jacchus* apresentaram títulos na sorologia realizada por meio do teste de aglutinação direta, embora baixos. Dos mesmos animais foram coletados sangue e fragmento de pele para investigar a presença de DNA de *Leishmania* spp., onde foi detectado a presença de *L. infantum* na pele de um sagui da espécie *C. penicillata*. Os resultados apontaram para a infecção natural dos saguis por *L. infantum* e sugerem a participação desses animais no ciclo de transmissão desse protozoário. O estudo sinaliza para os cuidados referente a proximidade desses animais com o ser humano e demais animais (Paiz et al., 2019).

### **2.2.1.2 *Leishmania amazonensis***

A *L. (L.) amazonensis* juntamente com a *L. (V.) braziliensis* são relatadas como as espécies de maior importância entre as causadoras da leishmaniose tegumentar

americana, por apresentarem o maior potencial patogênico para o homem mediante a sintomatologia apresentada (Silveira et al., 2008).

*L. amazonensis* pode causar várias formas clínicas de leishmaniose, porém as mais comuns são as formas cutânea e cutânea difusa. Em camundongos, experimentalmente, apresentaram manifestações similares as de *L. infantum* na leishmaniose visceral (Abreu-Silva et al., 2004).

Na infecção por essa espécie de *Leishmania* os macrófagos apresentam-se muito parasitados, onde nos vacúolos parasitóforos fica contido um grande número de amastigotas. Não apresentam cura espontânea, o que requer tratamento, e a ocorrência de recidivas é comum, uma vez que a resposta imune do hospedeiro não é eficaz frente ao parasito (Prina et al., 1993).

Modelos em camundongos também são indicados para avaliar a virulência e a resposta do hospedeiro vertebrado na interação com *L. amazonensis* na leishmaniose cutânea causadas por essa espécie (Aoki et al., 2020).

Em um estudo com ratos (*Rattus rattus*) capturados na área urbana de Londrina, Paraná, Brasil, de 127 animais testados na PCR com posterior sequenciamento, 9 foram positivos, sendo sete identificados como *L. (L.) amazonensis*, um como *L. (L.) infantum* e um não foi sequenciado, não sendo, portanto, identificado. Este foi o primeiro relato de roedores sinantrópicos infectados por *L. amazonensis* no mundo. Os dados sugerem a importância desses animais como reservatórios bem como da urbanização desse agente etiológico (Caldart et al., 2017).

A infecção *L. amazonensis* já foi relatada também em marsupiais da espécie *Micoureus paraguayanus* no Parque Estadual do Morro do Diabo, São Paulo, por meio de técnicas moleculares (Quintal et al., 2011); em um gato doméstico (*Felis domesticus*), por meio de microscopia e sorologia, que apresentava lesão nodular única no nariz e vários nódulos de diferentes tamanhos nas orelhas e regiões digitais de todas as patas, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (de Souza et al., 2005) e em um macaco-aranha (*Ateles paniscus*) com sintomatologia clínica, cativo do zoológico do município de Bauru, São Paulo, através de PCR de sangue venoso (Lima et al., 2012).

Assim como ocorre com *L. infantum*, *L. amazonensis* tem a capacidade de infectar primatas não humanos causando a leishmaniose tegumentar. Em um estudo experimental animais da espécie *Macaca mulatta* foram infectados com *L. amazonensis*. Nas análises patológicas foi evidenciado que as lesões continham amastigotas com um infiltrado mononuclear de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas e havia a formação de granulomas. O estudo mostrou que a progressão e resolução da infecção desse patógeno nos macacos estudados são muito semelhantes às observadas em humanos e, desta forma, esse modelo primata poderia ser empregado para elucidar os mecanismos de imunidade protetora e patogenia na leishmaniose tegumentar (Amaral et al., 1996).

### **2.2.2 TRYPANOSOMA spp.**

A primeira espécie do gênero *Trypanosoma* foi descrita em 1843 em uma rã na Europa. A partir desse achado inúmeras outras espécies foram descritas nos mais diversos tipos de hospedeiros. O gênero *Trypanosoma* compreende cerca de 28 espécies, onde algumas possuem importância tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Dentre as espécies, as que mais se destacam são as *T. cruzi* e *T. brucei* por causarem a Doença de Chagas e a Doença do Sono em humanos, respectivamente (Simpson et al., 2006).

Essas doenças também podem ser denominadas de tripanossomíases, nome dado as doenças causadas pelos protozoários parasitas do gênero *Trypanosoma*, ocorrendo principalmente na África e América Latina, onde são consideradas endêmicas e possuem grande importância para a saúde humana e animal (Moraes et al., 2020).

De acordo com o comportamento do parasito nos seus hospedeiros, principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos distintos. O primeiro, chamado de Stercoraria, inclui tripanossomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, que progride no sentido da porção intestinal e leva a liberação de formas infectantes pelas fezes. São exemplos o *T. lewisi* e *T. cruzi*. O segundo, chamado de Salivaria, inclui aqueles cujo o início do desenvolvimento ocorre no tubo digestivo e que posteriormente atravessam o epitélio digestivo até atingirem as

glândulas salivares onde encontra-se as formas infectantes que são inoculadas mecanicamente. São exemplos o *T. brucei*, *T. rangeli* e *T. congolense* (El-Bahnasawy et al., 2014).

De maneira geral, em ambos os grupos, os vetores se infectam ao se alimentarem de sangue humano ou de um animal, que contenham o parasito circulante na corrente sanguínea, o parasito adentra no intestino do vetor onde se transforma em epimastigotas e depois em tripomastigostas metaciclícos infecciosos, onde chegarão a um novo hospedeiro pela liberação e inoculação salivar ou fecal pelo vetor, de acordo com a classificação da espécie a qual pertence (Kaufer et al., 2017).

Há uma grande variação entre os vetores do gênero *Trypanosoma*, desde sanguessugas, moscas picadoras e outros insetos como os percevejos (gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*). Como exemplo, pode-se citar a mosca tsé-tsé (gênero *Glossina*) vetor de *T. brucei* e os percevejos da subfamília *Triatominae*, que são os vetores de *T. cruzi* (Kaufer et al., 2017).

#### **2.2.2.1 *Trypanosoma minasense***

Foi descrito pela primeira vez por Chagas em 1908, onde encontrou tripomastigotas no sangue de saguis (*Callithrix penicillata*) no estado de Minas Gerais e caracteriza-se por apresentar ritmo circadiano com pico de parasitemia às 16h (Ziccardi et al., 1996)

Outra característica marcante desta espécie é que são considerados altamente pleomórficos na corrente sanguínea, apresentando morfologia e morfometria distintas, condicionada a hospedeiros e condições de crescimento (Ziccardi e Oliveira, 1999). Essa mesma afirmação foi observada na infecção de *Trypanosoma minasense* (*T. minasense*) em primatas *Saguinus midas* como animais experimentais de laboratório, onde apenas pelo diagnóstico molecular e caracterização filogenética foi possível distinguir *T. minasense* de *T. theileri*, por apresentarem morfologia semelhantes (Sato et al., 2008).

*T. minasense* é relatado como um agente não patogênico e é considerado um parasito altamente específico de primatas não humanos, não sendo relatados em humanos. Já foi encontrado em saguis do gênero *Callithrix* no jardim botânico do Rio



de Janeiro, Brasil, porém devido a essas características o autor descreve o achado como isento de risco à saúde pública tanto pela ótica animal quanto humana (Coimbra et al., 2020).

Em uma avaliação de parasitas sanguíneos de 148 saguis da espécie *Saguinus geoffroyi* realizada no Panamá, revelou que o uso de vários testes diagnósticos associados aumenta a detecção deste parasito, uma vez que apenas com o exame direto *T. minasense* foi observado em 52,7% dos animais e na associação das técnicas de exame microscópico direto, hemocultura, xenodiagnóstico e inoculação animal esse valor subiu para 87%. O alto índice encontrado sugere que esses animais são hospedeiros naturais importantes, principalmente para a região estudada (Sousa e Dawson, 1976).

Outro estudo, porém, na região Amazônica brasileira, detectou que de um total de 165 macacos-esquilo (*Saimiri* spp.) 55 (33,3%) apresentaram infecção para *T. minasense*, reforçando a importância de primatas para a manutenção de *T. minasense* (Ziccardi e Oliveira, 1997).

Com a evolução da biologia molecular e maior acessibilidade dos pesquisadores a esta, o diagnóstico molecular de *Trypanosoma* passou a ser mais específico. Em um estudo de caracterização molecular de infecções por tripanossomatídeos em macacos bugios selvagens (*Alouatta caraya*) no nordeste da Argentina, foram identificados 9 animais positivos par *T. minasense* entre os 109 testados através de PCR e sequenciamento dos *amplicons* (Martínez et al., 2016).

#### **2.2.2.2 *Trypanosoma rangeli***

O *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) foi descrito pela primeira vez por Tejera em 1920 na Venezuela. Sua distribuição é endêmica na América Central e América do Sul, juntamente com *T. cruzi*, causador da Doença de Chagas, doença que acomete o sistema cardíaco e gastrointestinal podendo levar a morte (Ferreira et al., 2020).

*T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios mamíferos correspondentes às Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata (que inclui o homem e primatas não humanos) (Maia da Silva et al., 2004). Esse parasito não é considerado

patogênico para seus hospedeiros vertebrados, e para humanos o período de resolução espontânea na infecção por *T. rangeli* é estimado em aproximadamente 18 meses (Jiménez et al., 2019).

Triatomíneos do gênero *Rhodnius* são considerados o vetor de *T. rangeli*, e nesses organismos causam efeitos deletérios como: desenvolvimento tardio das ninfas, lise de células musculares durante invasão da hemolinfa, mortalidade, dificuldade de mudas devido a deformações morfológicas e dificuldade na alimentação (Mejia-Meneses et al., 2005).

Esses vetores, por serem hematófagos, se contaminam ao se alimentarem do sangue dos animais reservatórios contaminados, e infectados ao se alimentarem de outro animal depositam fezes e urina na pele do hospedeiro, entrando neste através do local da picadura induzido por fricção ou arranhão do próprio hospedeiro. Outro dado importante é que *Rhodnius* spp. também são vetores de *T. cruzi* que neste caso não causam danos ao vetor (Wu et al., 2020).

Não é possível diferenciar a infecção *T. rangeli* de *T. cruzi* morfológicamente e nem por meio de exames sorológicos devido a suas similaridades, sendo os testes moleculares as ferramentas mais adequadas para essa diferenciação (Maia da Silva et al., 2009). A infecção por *T. rangeli* produz uma boa resposta humoral em mamíferos e que os anticorpos apresentam reatividade cruzada com *T. cruzi*, o que pode inferir em diagnósticos falso-positivos para a doença de Chagas (Moraes et al., 2008).

Embora *T. rangeli* não seja patogênico, é importante compreender a sua dinâmica de transmissão por haver uma série de fatores que o aproxima do causador da Doença de Chagas como o compartilhamento de pelo menos 60% dos antígenos, possuírem a mesma distribuição geográfica e compartilharem os mesmos hospedeiros e vetores (Wu et al., 2020). Desta forma, há estudos que testam *T. rangeli* para uma potencial vacina contra o *T. cruzi* em animais domésticos (Basso et al., 2014).

*T. rangeli* já foi identificado no Estado de Minas Gerais em gambás e em triatomíneos. Ao todo vinte e um gambás (*Didelphis albiventris*) foram capturados, e o parasito foi detectado no sangue de 57,1% (12/21) dos animais. Infecções únicas por

*T. rangeli* ou *T. cruzi* foram diagnosticadas, respectivamente, em 58,4 e 8,3% dos gambás. Dos 44 triatomíneos coletados 22 (50%), apresentaram *Trypanosoma* spp. no trato digestivo e fezes. Os dados demonstraram a importância do gambá na manutenção do ciclo silvestre e peridoméstico de *T. rangeli* e *T. cruzi* (Ramirez et al., 2002).

Em um estudo avaliando o perfil sanitário de 43 tatus de vida livre no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, que compreende o bioma do Cerrado e Pantanal, dois animais apresentaram-se positivos para *Trypanosoma* spp. em hemocultura, que após caracterização molecular identificaram-se com um *T. cruzi* e outro *T. rangeli*, ambos na espécie *Dasypus novemcinctus* (tatu-galinha). Os autores sinalizam a importância do monitoramento dos animais silvestres para o entendimento da epidemiologia e controle de doenças (Kluyber et al., 2020).

Em um estudo que levantou a ocorrência de *Trypanosoma* spp. em primatas ameaçados de extinção da espécie *Saguinus bicolor* na Floresta Amazônica, identificou que dos 96 animais coletados, 45 (46,8%) apresentaram esfregaço positivo, sendo que *T. rangeli* foi encontrado em 38 animais (39,6%), não havendo a detecção de *T. cruzi*. Já nas hemoculturas dos mesmos animais 84 foram positivas, onde 72 (85,75%) para *T. rangeli* e 3 (3,1%) para *T. cruzi*. O autor ressalta a importância de primatas neotropicais como mantenedores dos tripanossomas, bem como reservatórios de zoonoses (Maia da Silva et al., 2008).

### **2.3 NEOSPORA CANINUM**

A neosporose possui como agente etiológico o *Neospora caninum* (*N. caninum*), protozoário intracelular obrigatório, cosmopolita, de ciclo heterógeno, pertencente ao filo Apicomplexa e família Sarcocystidae (Dubey et al., 1988).

A sua primeira descrição ocorreu na Noruega, em 1984, em cães de uma ninhada da raça Boxer, esses animais apresentaram sinais clínicos neurológicos, miosite e encefalite, e foi identificado cistos no cérebro e tecido muscular, causados por um protozoário muito semelhante ao *Toxoplasma gondii*, porém não foi identificado anticorpos para este parasito, dessa forma suspeitava-se que era um novo microrganismo (Bjerkas et al., 1984).

No ano de 1988, em um estudo retrospectivo com cérebros parafinados de cães, onde ao analisar os cortes histológicos, foi constatado que definitivamente os organismos encontrados eram diferentes de *T. gondii*, causando inclusive um quadro clínico mais severo, e, dessa forma, foram alocados como um novo gênero (*Neospora*) e uma nova espécie (*N. caninum*), as diferenças estruturais e histopatológicas, além da ausência de reatividade na sorologia e imunohistoquímica para *T. gondii* foram os achados primordiais para essa nova caracterização (Dubey et al., 1988).

O *N. caninum* necessita de mais de um hospedeiro para desenvolver seu ciclo biológico, tendo como hospedeiro definitivo os canídeos, tanto domésticos quanto os selvagens, e os hospedeiros intermediários abrangem os ovinos, caprinos, bovinos, equinos e cães (Dubey e Schares, 2011). Os cães podem atuar tanto como hospedeiro definitivo quanto intermediário (Gondim et al., 2004).

Por ser heteróxico, o ciclo biológico ocorre em hospedeiros distintos, com fases assexuada e sexuada, as quais envolvem três formas infecciosas do parasito sendo elas: taquizoítos (livres ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos), onde em todas elas as formas estão envolvidas na transmissão do parasito (Donahoe et al., 2015).

Os canídeos (hospedeiros definitivos) se infectam ao ingerirem cistos teciduais (bradizoítos) presentes nos hospedeiros intermediários, da água e demais alimentos contaminados ou por via transplacentária (Dubey et al., 2002). Infectados eliminam nas fezes os oocistos não-esporulados, que no ambiente na presença de oxigenação, temperatura e umidade adequadas, sofrem esporogônia, esporulando-se, passando, dessa forma, a conter dois esporocistos onde cada um contém quatro esporozoítos (Dubey e Schares, 2011).

Os hospedeiros intermediários se infectam ao ingerirem água ou alimentos contendo os oocistos esporulados, onde no trato digestivo há a liberação dos esporozoítos os quais invadem as células do epitélio intestinal e multiplicam-se como taquizoítos, que irão se disseminar por todo o organismo podendo invadir e infectar células neurais, fibroblastos, células musculares, hepatócitos e macrófagos (Goodswen et al., 2013).

Os taquizoítos causam a destruição dos tecidos e, conseqüentemente, uma resposta inflamatória forte, sendo os responsáveis pela forma aguda da neosporose (Monney e Hemphill, 2014). Os taquizoítos transforma-se em bradizoítos que por multiplicação formam os cistos teciduais, principalmente nos músculos e cérebro, onde podem persistir por toda a vida do hospedeiro sem desenvolver manifestações clínicas importantes (fase crônica) (McAllister, 2016).

O ciclo biológico de *N. caninum* fica completo quando os cistos presentes nos tecidos das presas são ingeridos pelos hospedeiros definitivos, onde os bradizoítos são liberados e invadem as células epiteliais intestinais, e pela fase sexuada liberam os merozoítos, que por gamogonia produz-se os oocistos não esporulados os quais serão eliminados nas fezes, repetindo o ciclo (Gondim et al., 2004; Monney e Hemphill, 2014).

A neosporose em bovinos geralmente apresenta-se subclínicamente, sendo o aborto o principal problema gerado pela infecção, que ocorre entre o 4º mês até o final da gestação, causados pelos danos ocorrentes no feto e/ou placenta e a liberação de prostaglandinas, impedindo a evolução da gestação (McAllister, 2016). Também podem ocorrer morte, mumificação, reabsorção e recém-nascidos clinicamente acometidos ou não, porém cronicamente infectados (Donahoe et al., 2015).

Nos cães, os casos graves evoluem para uma doença neuromuscular no animal jovem, com paresia que progride para uma paralisia. Já nos adultos é mais comum encefalomielite onde as manifestações clínicas estão diretamente ligadas ao local afetado pela infecção no sistema nervoso central (Goodswen et al., 2013).

Nesses animais podem ter um curso clínico generalizado ou localizado, onde outras manifestações menos comuns podem se desenvolver como: flacidez muscular, miocardite, paralisia dos nervos faciais, pancreatite, atrofia muscular, pneumonia, dificuldade de deglutição e acometimentos cutâneos (Donahoe et al., 2015; Mann et al., 2016).

O tratamento para neosporose não é viável economicamente em bovinos por ser necessário aplicar por longos períodos, além da presença dos resíduos na carne e no leite, dessa forma é realizado apenas em cães (Dubey et al., 2007). Nos canídeos a resposta ao tratamento é relacionada a fase da infecção em que se encontra, sendo

a clindamicina, trimetoprim e sulfadiazina os antibióticos mais utilizados (Jitender et al., 2014)

A neosporose não é considerada zoonose, entretanto, seu DNA foi detectado em duas amostras de sangue de cordão umbilical em humanos (Duarte et al., 2020). Dessa forma, o potencial zoonótico de *N. caninum* ainda é discutível, não existem evidências que determinam a extensão e importância da exposição do parasito aos seres humanos (Bártová et al., 2016). Porém, a suscetibilidade de primatas não humanos foi confirmada pela primeira vez com a infecção experimental de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (Barr et al., 1994).

Uma infecção natural foi descrita em um macaco-da-noite (*Aotus azarae infulatus*) que apresentava sinais clínicos inespecíficos e mesmo com a terapia de suporte instituída evoluiu a óbito. Os tecidos e sangue do animal foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) onde o resultado para *N. caninum* e *T. gondii* foi positivo e negativo, respectivamente. Tais achados forneceram evidências que o animal em questão se infectou naturalmente, incentivando novos estudos a investigar o real papel dos primatas neotropicais no ciclo de vida de *N. caninum* (Costa et al., 2018).

## **2.4 TOXOPLASMA GONDII**

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário, parasita intracelular obrigatório, cosmopolita, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (Levine, 1988). Apresenta ciclo heteroxeno e oocisto do tipo isospora, isto é, com dois esporocistos e com quatro esporozoítos no interior de cada esporocisto (Souza e Belfort, 2014).

Os felídeos domésticos e os silvestres são seus únicos hospedeiros definitivos (Frenkel et al., 1970) e possui a capacidade de infectar a maioria dos animais de sangue quente, incluindo os animais silvestres, domésticos, aves e o homem (Dubey, 2012).

Tanto em animais quanto em humanos as principais formas de infecção são: por carnivorismo pela ingestão de tecidos animais contendo cistos teciduais (bradizoítos), ingestão de oocistos esporulados em alimentos e/ou água contaminados

ou ainda por via transplacentária (transmissão vertical) por meio de taquizoítos que possuem a capacidade de atravessarem a placenta causando infecção congênita a qual é uma das mais significativas causas de aborto e mortalidade perinatal entre os animais infectados (Dubey, 2012).

Nos felídeos há a multiplicação enteroepitelial (fase sexuada), com a produção de oocistos ainda não esporulados que são eliminados no ambiente juntamente com as fezes. Além dos oocistos, os taquizoítos e cistos também são formas de vida do parasito (aguda e crônica) que podem ser transmitidas ao hospedeiro susceptível, potencializando a infecção para humanos e animais (Souza e Belfort, 2014).

Após a ingestão, os cistos ou oocistos têm a parede externa degradada por ação enzimática digestiva e os bradizoítos e esporozoítos, que são as formas infectantes, são liberados no lúmen intestinal, onde invadem as células tornando-se taquizoítos que possuem a reprodução assexuada por endodiogenia, esta de multiplicação rápida (Tenter et al., 2000).

Quando a transmissão está associada à água, existe um risco maior de acontecerem surtos, uma vez que inúmeros indivíduos podem se infectar. Esse tipo de transmissão é agravado, pois os oocistos permanecem viáveis por longos períodos na água e resistem a diferentes temperaturas, além de não serem destruídos facilmente pelos tratamentos de água como a cloração ou aplicação de ozônio (Karanis et al., 2013).

Indiscutivelmente *T. gondii* possui a capacidade de infectar diversos hospedeiros, essa característica ocorre principalmente diante dos inúmeros processos parasito-hospedeiro os quais envolvem os antígenos de superfície (SAG, surface antigens), as proteínas de micronemas (MIC), as proteínas de róptrias (ROP e RON) e as proteínas de grânulos densos (GRA) de *T. gondii* (Souza e Belfort, 2014).

Dessa forma, os animais selvagens tanto na natureza quanto em cativeiros podem agir como reservatório ou portadores dessa zoonose e, por isso, possuem grande importância no contexto de saúde pública (Epiphany et al., 2003; Tsokana et al., 2020).

Os exames sorológicos são os mais utilizados na realização de estudos epidemiológicos da toxoplasmose, pois são indicativos de que o animal entrou em

contato com o *T. gondii* em algum momento de sua vida ou possuem infecção ativa (Dubey, 2010). Outros métodos de diagnósticos também são utilizados como parasitológico, isolamento e a reação em cadeia da polimerase, a qual inclusive permite a correta e precisa caracterização das cepas e verificação da variabilidade genética desse agente (Su e Dubey, 2020).

Testes moleculares são importantes para confirmar surtos, como o empregado para caracterizar um surto de toxoplasmose fatal em 7 primatas do gênero *Alouatta* sp. em Minas Gerais - Brasil, onde por meio da genotipagem foi identificado o mesmo tipo clonal em todos os animais acometidos, exames histopatológicos também reafirmaram a infecção e causa da morte por toxoplasmose (Santana et al., 2020).

A manifestação clínica da toxoplasmose é facilmente confundida com outras enfermidades, como a neosporose, brucelose, cinomose entre outras, dessa forma o diagnóstico laboratorial é de suma importância para a correta identificação do agente etiológico (Souza e Belfort, 2014).

O tratamento para a toxoplasmose varia de espécie para espécie, mas de maneira geral é de suporte e consiste na utilização da associação de inibidores da dihidrofolato redutase (DHFR) (pirimetamina e trimetoprim) e dihidropteroato sintetase (sulfonamidas, como sulfadiazina, sulfametoxazol e sulfadoxina) que bloqueiam a síntese de ácido fólico no parasito, é importante ressaltar que o tratamento só tem efeito na fase aguda da infecção, sendo ineficiente na fase crônica (Dunay et al., 2018).

Ao ser avaliado a soroprevalência de *T. gondii* em cães de comunidades ribeirinhas do Rio Cuiabá (Cuiabá, Pantanal Mato-grossense, Brasil), dos 248 animais pesquisados, 107 (43,15%) foram soropositivos pelo teste de imunofluorescência indireta (IFAT), e das possíveis associações a única significativa estatisticamente foi a convivência dos cães com gatos. Dessa forma, ficou evidente as altas taxas de infecção agravada pela presença dos felinos (Rodrigues et al., 2016).

A detecção de *T. gondii* em um tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) já foi relatada tanto por sorologia quanto por PCR de sangue periférico. O animal era de vida livre no estado de Mato Grosso, e foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. O animal não apresentava



sintomatologia clínica, podendo ser devido a vários fatores como patogenicidade e virulência do parasito, além da imunidade do hospedeiro (Morgado et al., 2017).

Um grupo de grande importância são os primatas não humanos de vida livre ou cativeiro, onde geralmente a toxoplasmose apresenta-se como uma infecção aguda e fatal, e comumente leva a morte desses animais, principalmente em surtos. Nesses animais, há necrose tecidual resultado da replicação e, conseqüentemente, ruptura da célula hospedeira que abrigam os taquizoítos. Já nos casos crônicos são visíveis cistos de bradizoítos na musculatura cardíaca e esquelética, bem como em alguns casos no cérebro (Souza e Belfort, 2014).

Nos primatas em cativeiro a infecção se dá pelo contato com fezes de felídeos, incluindo os do próprio zoológico, ou pela presença de animais sinantrópicos, uma vez que nesses recintos os primatas estão em maior contato com o solo. Dessa forma, é importante que os primatas sejam mantidos distante dos recintos dos felídeos, e que os tratadores recebam treinamento para que não haja contaminação cruzada na preparação da alimentação (Casagrande et al., 2013).

Em um estudo em 33 primatas neotropicais da Fundação Parque Zoológico de São Paulo acometidos por toxoplasmose o sinal clínico mais comum foi apatia com 40,6%, seguido por dispneia (18,7%), hipotermia (15,6%), secreção nasal (12,5%), anorexia (9,4%) e vômito (9,4%). Do total, 43,7% dos animais vieram a óbito sem apresentar sinais clínicos. Nesse mesmo estudo, na análise *post-mortem* a congestão pulmonar foi encontrada em 78,8% dos animais, seguido de edema pulmonar em 75,8% e esplenomegalia em 57,6%. Em 97% das lâminas histopatológicas foi encontrado hepatite necrótica multifocal, linfadenite em 95,4% e pneumonia intersticial em 90,3% (Epiphany et al., 2003).

Independente da região brasileira, é comum o contato de primatas não humanos com o *T. gondii*. Em um estudo de detecção de anticorpos para *T. gondii* em primatas não humanos cativos da região Amazônica, dos 179 animais testados quase metade 88 (49,2%) foram positivos para IgG em doze das dezoito espécies pesquisadas (Minervino et al., 2017).

Na China 15 macacos foram coletados em zoológicos na província de Henan. No teste de aglutinação mostrou que 46,7% (7/15) dos soros tinham *T. gondii*

apresentavam anticorpos contra o parasito. Uma cepa viável de *T. gondii* foi isolada com sucesso do miocárdio de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*) por bioensaio em camundongos e o genótipo foi determinado por PCR-RFLP com 10 marcadores e os genes de virulência *ROP5* e *ROP18*. O genótipo encontrado não corresponde a nenhum outro conhecido. Além disso, o agente isolado formou baixo número de cistos teciduais e não foi letal para camundongos do bioensaio. Esse estudo trouxe o primeiro isolado de *T. gondii* em macacos do Velho Mundo, descrevendo o macaco rhesus como um novo registro de hospedeiro para *T. gondii*. Estudos como esses encorajam novos experimentos na busca pelos mesmos resultados, porém em primatas neotropicais (Xin et al., 2021).

## 2.5 *BRUCELLA* spp.

A brucelose, também conhecida como febre de Malta ou febre ondulante, é uma doença infectocontagiosa, zoonótica, que acomete animais domésticos e selvagens, com impactos significativos para a saúde animal, comércio internacional e saúde pública. É causada pelas bactérias do gênero *Brucella*, que se caracterizam por serem coco-bacilos gram-negativos, imóveis, intracelulares facultativos, não formadoras de esporos e não encapsulam (Abedi et al., 2020).

Essas bactérias não são consideradas espécie-específicas, mas possuem predileção pelo hospedeiro. A literatura relata mais de 10 espécies, cada qual com um hospedeiro preferencial. Das espécies já descritas, seis são consideradas “clássicas” por serem as mais comuns e conhecidas, são elas: *B. canis* (cães), *B. abortus* (bovinos e bubalinos), *B. melitensis* (ovinos e caprinos), *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (suínos), e *B. neotomae* (rato do deserto). Outras que foram mais recentemente identificadas são: *B. pinnipedialis* e *B. ceti* (mamíferos marinhos), *B. microti* (roedores), *B. inopinata* (isolado de infecção em prótese mamária de humanos), *B. vulpis* (raposas) e *B. papionis* (babuíno) (Whatmore et al., 2014; Soler-Lloréns et al., 2016).

Dentre as espécies citadas, *B. melitensis* é a mais patogênica e infectante para os seres humanos, seguida por *B. suis*, *B. abortus* e *B. canis*, sendo que a infecção por *B. abortus* é a mais comum devido à sua maior difusão entre os animais (Paulin et al., 2008).

Possuem a capacidade infectar por meio da penetração na pele íntegra ou lesionada, pelas mucosas e como aerossóis, dessa forma, profissionais como veterinários e trabalhadores de fazendas e frigoríficos estão constantemente expostos ao risco de infecção (Lage et al., 2008).

Outra preocupação no aspecto da saúde única é que o contágio ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, geralmente leite cru e derivados não pasteurizados, e a transmissão também ocorre, embora mais rara devido ao número das bactérias serem reduzidos na musculatura, pela ingestão de carnes e embutidos crus ou mal passados oriundos de animais infectados (Khurana et al., 2021). Diante disso, no Brasil desde a década de 70 o comércio de leite cru está proibido pelo decreto nº 66.183, tornando obrigatório a pasteurização do leite (Brasil, 1970).

Após a infecção, ocorre a fagocitose de *Brucella* spp. pelos macrófagos e são transportadas para os linfonodos regionais, onde ocorre a multiplicação causando linfadenite e hiperplasia. Desses linfonodos iniciais migram para outros, além do baço e fígado; e em seguida para os tecidos osteoarticulares, órgãos reprodutores e mamas, por possuírem eritritol, um álcool do qual a *Brucella* utiliza como fonte de energia por reações metabólicas próprias (López-Santiago et al., 2019).

Na gestação, a concentração de eritritol aumenta, atingindo níveis máximos próximo ao parto; dessa forma a infecção deixa de ser latente e ocorre intensa multiplicação bacteriana, que lesionam a placenta, causam descolamento das vilosidades e, conseqüentemente, morte fetal pelo baixo suprimento sanguíneo, que leva ao aborto (Khurana et al., 2021).

A brucelose é uma doença de difícil diagnóstico por apresentar sinais clínicos inespecíficos, o que leva a um grande número de subnotificações, sendo os mais comuns: febre, fraqueza, sudorese noturna com odor peculiar, dores musculares e calafrios (Seleem et al., 2010). A *B. melitensis* causa sinais clínicos mais severos, com infecção aguda. Já as formas menos severas da doença apresentam-se como uma evolução crônica e são causadas principalmente por *B. suis* e *B. abortus* (Khurana et al., 2021).

A infecção pode se manifestar desde uma forma branda com evolução para a cura espontânea, quanto para formas graves e prolongadas, acarretando em toxemia. Outras complicações descritas são endocardite, trombocitopenia, e outras, podendo levar à morte, e geralmente não apresentam sintomatologia neurológica, mas esse quadro já foi relatado (Ceran et al., 2011).

No diagnóstico clínico da brucelose os padrões epidemiológicos e as informações relacionadas, bem como a história da doença, são muito importantes, e devem ser associados com técnicas de cultura bacteriana e por diversos métodos sorológicos. Vários métodos de laboratório, incluindo isolamento e identificação da bactéria, antígeno específico de *Brucella*, métodos de detecção de anticorpos, e detecção molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase, são úteis no diagnóstico de brucelose (Mantur et al., 2007).

O tratamento antibiótico da brucelose em animais domésticos é frequentemente malsucedido devido à sobrevivência intracelular de *Brucella* e sua adaptabilidade nos macrófagos (Seleem et al. 2010). Em cães uma alternativa é o uso de enrofloxacin via oral por um período de 30 dias (Wanke et al., 2006).

Em humanos protocolos de associação antibiótica são utilizados, tais como o uso conjunto de doxiciclina com rifampicina durante 6 semanas por via oral (Villate e Casallas, 2020).

Alguns pontos importantes como a sua característica de não ser espécie específica, constante capacidade de adaptação, a proximidade dos animais de vida livre com rebanhos domésticos, aparecimento de novos reservatórios, as práticas de manejo inadequado em propriedades, abatedouros e frigoríficos clandestinos, fazem com que fontes de infecção se perpetuem, potencializando infecções cruzadas entre diferentes espécies animais e o homem, mantendo a *Brucella* como um dos principais agentes zoonótico do planeta (Khurana et al., 2021).

Em um estudo de detecção molecular de *B. canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso, das 327 amostras de sangue submetidas a PCR, 79 (24,1%) foram positivas, demonstrando a ocorrência deste patógeno na região estudada (Silva et al., 2012).

Ao avaliar a presença de *Brucella* spp. em felídeos selvagens do Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, foram coletadas amostras de sangue

de sete pumas (*Puma concolor*), cinco onças-pintadas (*Panthera onca*), quatro jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e um leão (*Panthera leo*). A presença de anticorpos e DNA de *B. abortus* e *B. canis* não foi detectada no leão. A amplificação do DNA de *B. abortus* e *B. canis* foi observada nas quatro jaguatiricas. Um jaguar foi positivo para *B. abortus* na PCR, e o DNA de *B. canis* também foi detectado em dois pumas e um jaguar. Dois pumas e duas onças-pintadas foram soropositivas para *B. abortus* e uma jaguatirica e duas onças-pintadas foram soropositivas para *B. canis* (Almeida et al., 2012).

Nos primatas embora sejam suscetíveis à infecção por *Brucella*, há poucos relatos e estudos acerca dessa relação patógeno-hospedeiro. Em 2009, no Texas – Estados Unidos - foi descrito um novo isolado de *Brucella*, por meio de isolamento, caracterização bioquímica e testes moleculares, associada a dois casos de morte neonatal em primatas (babuíños) a qual recebeu o nome de *Brucella papionis* (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009; Whatmore et al., 2014).

## 2.6 LEPTOSPIRA spp.

A leptospirose é uma doença zoonótica causada pelas bactérias espiroquetas do gênero *Leptospira* pertencentes a família Leptospiraceae e ordem Spirochaetales. Caracterizam-se por apresentarem tamanho de aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e entre 6-20 µm de comprimento, estrutura delgada e formato em espiral, aeróbias obrigatórias, móveis, catalase e oxidase positivas e sua estrutura e organização são semelhantes as bactérias gram-negativas, possuindo membrana externa que envolve a célula e a capa peptidoglicano da parede celular (Cameron et al., 2015; Samrot et al., 2021).

Após estudos de biologia molecular, o gênero *Leptospira* foi reorganizado da seguinte forma: 10 espécies patogênicas para humanos e animais (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. alstonii*, *L. terpstrae*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi* e *L. kmetyi*), 5 espécies intermediárias que causam manifestações clínicas leves em animais e humanos (*L. inadai*, *L. licerasiae*, *L. broomii*, *L. wolffii* e *L. fainei*) e as saprófitas, consideradas ambientais que não causam doenças em animais e humanos (*L. biflexa*, *L. idoniie*, *L. wolbachii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*

e *L. meyeri*). Vale ressaltar que cada grupo possui inúmeros sorovares (Adler e de la Peña, 2010; Sun et al., 2020).

Estão presentes no mundo todo, mas principalmente em regiões tropicais, pois o clima quente e úmido favorece a sobrevivência dessas bactérias, portanto, são sazonais mais associadas a épocas chuvosas principalmente em inundações, o que é um agravante, pois essas bactérias podem penetrar no organismo não só através das mucosas, mas também em pele íntegra (Levett, 2001; Picardeau, 2013).

Aproximadamente mais de 200 espécies animais, incluindo gado e cães, foram confirmados como hospedeiros de *Leptospira*, onde *L. interrogans* é a genoespécie mais prevalente no mundo (Adler e de la Peña, 2010).

Os organismos infectados alojam as bactérias nos rins e as eliminam vivas no meio ambiente, contaminando o solo, a água, animais e humanos. Os roedores são os principais reservatórios sinantrópicos (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) e quando infectados são de forma crônica e assintomática. Já os humanos são hospedeiros acidentais e terminais dentro da cadeia de transmissão (De Farias et al., 2008; Haake e Lavett, 2015).

A leptospirose não apresenta lesão patognomônica, sendo a principal alteração relacionada a lesão endotelial, principalmente nos rins, onde possuem sorovares mais ou menos patogênicos (Evangelista et al, 2010).

A sintomatologia clínica varia entre as espécies hospedeira. De forma geral, as manifestações clínicas ocorrem de forma aguda e inclui febre, icterícia, vômito, depressão, diarreia, aborto, falha renal, hemoglobinúria e alguns casos até a morte. A mortalidade está relacionada principalmente a susceptibilidade de cada espécie infectada e também a quantidade de microrganismos aos quais o indivíduo foi exposto (Bolin, 2003).

O diagnóstico deve ser realizado preferencialmente por métodos laboratoriais devido a inespecificidade dos sintomas e por estes serem característicos na fase mais avançada da doença, dessa forma, o diagnóstico mais preciso pode ser realizado por meio de sorologia, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e imunohistoquímica, principalmente (Khaki, 2016).

O tratamento para a leptospirose é de suporte e baseia-se na sintomatologia clínica. É fundamental a administração de antimicrobianos, principalmente a estreptomicina e tetraciclina, pois acabam com a eliminação do agente na urina,

evitando a contaminação de outros indivíduos e do ambiente (Bolin, 2003; Liegeon et al., 2018).

O javali (*Sus scrofa*) é considerado um reservatório da leptospirose. Em um estudo realizado na Toscana (Itália) 287 amostras de soro, rins e fígado, de animais caçados, foram coletadas e submetidas a testes de aglutinação microscópica, isolamento bacteriano e PCR em tempo real. Os resultados mostraram que 39 (13,59%) dos soros foram positivos na sorologia, 32 rins (11,15%) apresentaram DNA patogênico de *Leptospira* e também foi detectado 4 culturas positivas para o gênero *Leptospira*. Dessa forma, é evidente o papel dos animais silvestres na manutenção e transmissão da leptospirose ao homem e demais animais e que caçadores são expostos a altos riscos de infecção pelo manejo e abate de animais (Cilia et al., 2020).

Um estudo realizado a fim de verificar a capacidade de macacos verdes africanos (*Chlorocebus sabeus*), da ilha caribenha de São Cristóvão, assintomáticos serem reservatório de *Leptospira*, demonstrou que dos 83 animais do estudo, 48% continham anticorpos contra *Leptospira* no teste de aglutinação e, na PCR, o DNA de *Leptospira* spp. foi detectado em 4% (2/50) das amostras de rins testadas. O trabalho esclareceu que esses primatas podem servir como reservatórios assintomáticos, além de serem fontes de contaminação ambiental e transmitirem a *Leptospira* para humanos e animais (Rajeev et al., 2020).

Recentemente, um estudo em macacos-prego adultos de vida livre (*Cebus apella nigritus*) em uma reserva florestal no sudeste do Estado de São Paulo – Brasil, identificou anticorpos anti-*Leptospira* no sangue de 78% dos animais estudados (39/50), entretanto na urina de nenhum dos animais foi encontrado DNA deste agente, indicando que não havia infecção ativa (Girio et al., 2020).

Em um experimento realizado em primatas de cativeiro do Zoológico de Barranquilla - Colômbia, detectou que dos 29 primatas testados 2 (6,9%) apresentaram sorologia positiva para *Leptospira*, o mesmo aconteceu com ratos 66,7% (10/15) e esquilos 60% (6/10). Foi identificado que os primatas das espécies *Ateles hybridus* e *Ateles fusciceps* tiveram títulos positivos para os sorogrupos Cynopteri e Ictohaemorrhagiae, respectivamente. Nenhum animal do estudo apresentou cultura ou PCR positivas para *Leptospira*, o que também indicou que não havia infecção ativa nesses animais (Woolf et al., 2021).

Almeida e colaboradores (2016) estudaram uma população de 58 primatas, dos quais 42 eram macacos do Parque Zoológico de Salvador (Parque Zoobotânico

Getúlio Vargas), Bahia, Brasil, e 16 primatas (*Cebus* spp.) resgatados do comércio ilegal que estavam alojados no Centro de Reabilitação de Fauna Silvestre de Salvador (CETAS) também da Bahia. Após análise sorológica, foi detectado anticorpos antileptospirais em 2% dos animais do zoológico e em 31% dos animais resgatados. Todas as amostras de sangue e urina foram negativas na PCR. O estudo trouxe um alerta do risco potencial de transmissão da leptospirose ao manter esses animais como animais de estimação ou em contato próximo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

- Detectar molecularmente agentes patogênicos de primatas neotropicais de vida livre e cativeiro do Estado de Mato Grosso, Brasil, e verificar eventuais reservatórios de zoonoses.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Verificar a presença de material genético de *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. em primatas neotropicais.
- Analisar os resultados a fim de obter um panorama de agentes patogênicos de primatas neotropicais do Estado de Mato Grosso.
- Identificar a presença de eventuais patógenos que estão associados diretamente à conservação dos primatas neotropicais em vida livre ou em cativeiro.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Comitê de ética

Os procedimentos das coletas dos animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) sob o protocolo nº. 23108.015878 / 2019–65 e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), alvará nº 40617-1 e 42303.

### 4.2 Amostras

Entre 2017 e 2019, foram coletadas 38 amostras de sangue total de primatas neotropicais, independentemente dos sinais clínicos, do Estado de Mato Grosso (em liberdade e cativos) de seis diferentes espécies (*Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Aotus infulatus*, *Ateles marginatus*, *Mico melanurus* e *Sapajus apella*) oriundas das cidades de Cuiabá (15 ° 35'46,0 "S 56 ° 05'48,0" W), Chapada dos Guimarães (15 ° 27'38,0 "S 55 ° 44'59,0" O), Diamantino (14 ° 24'31,0 "S 56 ° 26'46,0" O), Nobres (14 ° 43'13,0 "S 56 ° 19 '39 .0 "W), Poconé (16 ° 15'24.0" S 56 ° 37'22.0 "W), Tangará da Serra (14 ° 37'40"S 57 ° 30 '25"W) e Várzea Grande ( 15 ° 38'48.0 "S 56 ° 07'57.0" W) (Tabela 1), as quais foram armazenadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária e Biologia Molecular da UFMT, Cuiabá, Brasil.

As capturas dos animais foram realizadas pela Secretaria de Meio Ambiente do Estado de Mato Grosso (SEMA) e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Cuiabá. As coletas das amostras de sangue foram realizadas pelo Setor de Animais Silvestres do Hospital Veterinário da UFMT – Cuiabá, onde para as imobilizações foram utilizadas cetamina e midazolam de acordo com o peso corporal de cada animal (Cubas et al., 2014). As amostras foram armazenadas a -80°C até a utilização nos testes moleculares.

**Tabela 1.** Animais testados e seus respectivos dados epidemiológicos.

| <b>Município</b>             | <b>Espécie primata (n)</b>   | <b>Habitat</b> | <b>Sexo</b> |
|------------------------------|------------------------------|----------------|-------------|
| <b>Chapada dos Guimarães</b> | (1) <i>Aotus azarae</i>      | Vida Livre     | Fêmea       |
| <b>Cuiabá</b>                | (1) <i>Alouatta caraya</i>   | Vida Livre     | Macho       |
|                              | (1) <i>Alouatta caraya</i>   | Cativeiro      | Fêmea       |
|                              | (1) <i>Aotus azarae</i>      | Vida Livre     | Macho       |
|                              | (3) <i>Aotus azarae</i>      | Vida Livre     | Fêmea       |
|                              | (2) <i>Aotus infulatus</i>   | Vida Livre     | Macho       |
|                              | (1) <i>Aotus infulatus</i>   | Vida Livre     | Fêmea       |
|                              | (4) <i>Ateles marginatus</i> | Cativeiro      | Fêmea       |
|                              | (4) <i>Mico melanurus</i>    | Vida Livre     | Fêmea       |
|                              | (5) <i>Mico melanurus</i>    | Vida Livre     | Macho       |
|                              | (3) <i>Sapajus apella</i>    | Cativeiro      | Fêmea       |
|                              | (2) <i>Sapajus apella</i>    | Vida Livre     | Fêmea       |
|                              | (2) <i>Sapajus apella</i>    | Vida Livre     | Macho       |
| <b>Diamantino</b>            | (1) <i>Mico melanurus</i>    | Vida Livre     | Macho       |
| <b>Nobres</b>                | (1) <i>Sapajus apella</i>    | Vida Livre     | Macho       |
| <b>Poconé</b>                | (1) <i>Sapajus apella</i>    | Vida Livre     | Macho       |
| <b>Tangará da Serra</b>      | (1) <i>Sapajus apella</i>    | Cativeiro      | Fêmea       |
| <b>Várzea Grande</b>         | (1) <i>Alouatta caraya</i>   | Cativeiro      | Macho       |
|                              | (1) <i>Mico melanurus</i>    | Vida Livre     | Fêmea       |
|                              | (1) <i>Sapajus apella</i>    | Cativeiro      | Fêmea       |
|                              | (1) <i>Sapajus apella</i>    | Cativeiro      | Macho       |

### 4.3 Extração de DNA e verificação de viabilidade

Uma alíquota de 250µL do sangue total de cada animal foi submetida à extração de DNA pelo método do fenol/clorofórmio/proteinase K, conforme descrito por Sambrook e Russell, 2001. Para verificar a presença de inibidores de PCR nas amostras de DNA e o sucesso da extração, garantindo a viabilidade, os DNA's extraídos foram submetidos a PCR para o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), com os oligonucleotídeos GAPDHF e GAPDHR, segundo Birkenheuer et al. (2003).

#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os agentes pesquisados

A detecção molecular dos agentes etiológicos foi pela Reação em Cadeia da Polimerase. Foram utilizados como controles positivos *amplicons* previamente sequenciados de acordo com cada agente pesquisado e água ultrapura como controle negativo das reações. Na tabela abaixo (Tabela 2) encontra-se a sequência de oligonucleotídeos, o tamanho do *amplicon* e autor referenciado, de acordo com cada agente pesquisado.

**Tabela 2** - Sequências de oligonucleotídeos, tamanho do *amplicon* e seus respectivos autores, de acordo com cada agente pesquisado.

| Agente                                     | Oligonucleotídeos                | Sequência do oligonucleotídeo                                                                                    | Tamanho do <i>amplicon</i> | Autor                   |
|--------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>Leishmania</i> spp.                     | Leish F<br>Leish R               | 5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)-<br>CTAT(A/T)TTACACCAACCCC-3'<br>5'-GGGGAGGGG-CGTTCTGCGAA-3'                           | 120 pb                     | Degrave et al., (1994)  |
| <i>Leishmania infantum</i>                 | RV1<br>RV2                       | 5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3'<br>5'-CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3'                                         | 145 pb                     | Lachaud et al., (2002)  |
| <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> | LSPF<br>LLAR                     | 5'-GGGTAGGGGCGTTCTG-3'<br>5'-CCCCAGTTGTGACCG-3'                                                                  | 100pb                      | Conter et al., (2018)   |
| <i>Trypanosoma</i> spp.                    | 609F<br>706R                     | 5'-GAT CCG CGG TAA TTC CAG C-3'<br>5'-TTG AGG TTA CAG TCT CAG-3'                                                 | 900 pb                     | da Silva et al., (2004) |
| <i>Neospora caninum</i>                    | NN1<br>NN2<br><br>NP1<br>NP2     | 5'-TCAACCTTTGAATCCCAA-3<br>5'-CGAGCCAAGACATCCATT-3'<br><br>5'-TACTACTCCCTGTGAGTTG-3'<br>5'-TCTCTTCCCTCAAACGCT-3' | 213 pb                     | Buxton et al., (1998)   |
| <i>Toxoplasma gondii</i>                   | Toxo 1<br>Toxo 2                 | 5'-GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG-3'<br>5'-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC-3'                                                       | 194 bp                     | Burg et al., (1989)     |
| <i>Brucella</i> spp.                       | B2N-1<br>B2N-2                   | 5'-GTCGCGGATTCTACCTCACCT-3'<br>5'-TAAGCAGGTAAGAGGCAATTT-3'                                                       | 280 pb                     | Kim et al., (2006)      |
| <i>Leptospira</i> spp.                     | <i>lipL32F</i><br><i>lipL32R</i> | 5'-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3<br>5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3'                                                          | 474 pb                     | Ahmed et al., (2006)    |

Todas as reações foram processadas em termociclador (Simpliamp thermo cycler – ThermoFischer Scientific™) com desnaturação inicial, seguido de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, finalizando com a extensão final de acordo com a descrição de cada autor.

Os produtos obtidos na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed™ (Nucleic Acid gel stain, Biotium®), a 10 V/cm e visualizados em fotodocumentador ChemiDoc™ XRS utilizando o software Image

Lab™ para verificação dos resultados. O marcador de massa molecular utilizado foi o *Ladder* 100pb (Ludwig®).

#### 4.5 Sequenciamento de DNA

Para a identificação da espécie do gênero *Trypanosoma*, o produto de PCR, foi sequenciado. O DNA foi purificado usando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Chicago, EUA), preparados para sequenciamento com o kit BigDye™ (Applied Biosystems, Foster, EUA) e submetidos ao sequenciamento automático (ABI3500 Applied Biosystems, Foster, EUA) com os oligonucleotídeos usados na PCR. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados de DNA utilizando o algoritmo BLAST® (versão 2.8.0) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) para determinar as identidades mais próximas com organismos congêneros disponíveis no GenBank®.

#### 4.6 Cladograma de *Trypanosoma* spp.

Sequências da região V7-V8 do gene SSU (Subunidade Ribossômica Pequena) rRNA geradas neste estudo e sequências homólogas recuperadas do GenBank® foram usadas para análises filogenéticas para caracterizar as espécies de *Trypanosoma*. O cladograma foi construído com base na técnica de *neighbour-joining* com o método *bootstrap* com 1000 repetições utilizando o software MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 10.1.8 (Tamura et al., 2004). Espécies do gênero *Leishmania* foram alocadas como *out-group*.

#### 4.7 Histopatológico e imuno-histoquímica para *T. gondii*

A carcaça de oito animais encontrados falecidos recentemente ou que morreram durante o estudo foram submetidas a necropsia, e amostras de cérebro, pulmão e fígado foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10%. As amostras foram então incluídas em parafina, cortadas em seções de 4<sup>a</sup>µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para triagem em exame histológico ao microscópio, bem como com técnicas de imuno-histoquímica para detecção de *T. gondii* de acordo com Antoniassi et al., 2011.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados no formato de artigo:

- **Artigo 1** – Molecular detection of trypanosomatids in neotropical primates in the state of Mato Grosso, Midwest, Brazil.

Artigo (Short communication) submetido e publicado na: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

- **Artigo 2** – Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in neotropical primates

Artigo submetido na revista: Journal of Medical Primatology.

## Artigo 1

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Brazilian Journal of  
Veterinary ParasitologyISSN 1984-2961 (Electronic)  
www.cbpv.org.br/rbpv

Short Communication

## Molecular detection of trypanosomatids in neotropical primates in the state of Mato Grosso, Midwest, Brazil

Detecção molecular de tripanossomatídeos em primatas neotropicais no estado de Mato Grosso, Centro-Oeste, Brasil

Stéffhano Luís Cândido<sup>1</sup>; Lucas Avelino Dandolini Pavelegini<sup>2</sup>; Thábata dos Anjos Pacheco<sup>3</sup>; Richard de Campos Pacheco<sup>3\*</sup>; Victória Luiza de Barros Silva<sup>3</sup>; Thais Oliveira Morgado<sup>4</sup>; Edson Moleta Colodel<sup>2</sup>; Luciano Nakazato<sup>1</sup>; Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida<sup>5</sup>; Valéria Dutra<sup>1</sup><sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular Veterinária, Hospital Veterinário – HOVET, Faculdade de Medicina Veterinária – FAVET, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Hospital Veterinário – HOVET, Faculdade de Medicina Veterinária – FAVET, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil<sup>3</sup> Laboratório de Parasitologia Veterinária e Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos e Silvestres, Hospital Veterinário – HOVET, Faculdade de Medicina Veterinária – FAVET, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil<sup>4</sup> Setor de Animais Silvestres, Hospital Veterinário – HOVET, Faculdade de Medicina Veterinária – FAVET, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil<sup>5</sup> Laboratório de Leishmanioses, Hospital Veterinário – HOVET, Faculdade de Medicina Veterinária – FAVET, Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, MT, Brasil**How to cite:** Cândido SL, Pavelegini LAD, Pacheco TA, Pacheco RC, Silva VLB, Morgado TO, et al. Molecular detection of trypanosomatids in neotropical primates in the state of Mato Grosso, Midwest, Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(2): e001321. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021041>

## Abstract

Trypanosomatids are uniflagellate protozoa belonging to the Trypanosomatidae family. The genera *Trypanosoma* and *Leishmania* are of paramount importance as they contain species that cause serious diseases, such as Chagas disease and Leishmaniasis, respectively. The objective of the present study was to identify trypanosomatids present in the whole blood of free-living and captive neotropical primates in Mato Grosso State, Midwest Brazil. Between 2017 and 2019, 38 blood samples were collected from seven different neotropical primate species in seven cities in the state. Through molecular techniques, including polymerase chain reaction (PCR) to amplify a fragment of the kinetoplast DNA (kDNA) and 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene, sequencing, and phylogenetic analysis, nine *Leishmania* spp. [seven *L. infantum* and two *L. (Leishmania) amazonensis*] and two *Trypanosoma* spp. (*T. minasense* and *T. rangeli*) were identified. This study contributes to understanding the occurrence and epidemiology of trypanosomatids in Mato Grosso State and the importance of neotropical primates as trypanosome hosts and possible infection sources for other animals and humans. Future identification of other blood pathogens in neotropical primates will assist in disease control and prevention strategies.

**Keywords:** PCR, protozoan, phylogenetic analysis, zoonosis, Leishmaniasis.

## Resumo

Tripanossomatídeos são protozoários uniflagelados pertencentes à família Trypanosomatidae. Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são de suma importância por conterem espécies causadoras de doenças graves, como doença de Chagas e Leishmaniose, respectivamente. O objetivo do presente estudo foi identificar tripanossomatídeos presentes no sangue total de primatas neotropicais de vida livre e cativos no Estado de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil. Entre 2017 e 2019, foram coletadas 38 amostras de sangue de sete diferentes espécies de primatas neotropicais em sete cidades do Estado. Foram identificados por meio de técnicas moleculares, incluindo reação em cadeia da polimerase (PCR), para amplificar um fragmento do DNA do cinetoplasto (kDNA) e do gene do RNA ribossômico 18S (rRNA 18S), sequenciamento e análise filogenética, nove

Received January 19, 2021. Accepted April 5, 2021.

\*Corresponding author: Richard de Campos Pacheco. E-mail: richard@ufmt.br



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Braz J Vet Parasitol 2021; 30(2): e001321 | <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021041>

1/7

*Leishmania* spp. [sete *L. infantum* e dois *L. (Leishmania) amazonensis*] e dois *Trypanosoma* spp. (*T. minasense* e *T. rangeli*). Este estudo contribui para o entendimento da ocorrência e epidemiologia dos tripanossomatídeos no Estado de Mato Grosso e a importância dos primatas neotropicais como hospedeiros tripanossômicos e possíveis fontes de infecção para outros animais e humanos. A identificação futura de outros patógenos do sangue em primatas neotropicais ajudará no controle de doenças e em estratégias de prevenção.

**Palavras-chave:** PCR, protozoário, análise filogenética, zoonoses, Leishmanioses.

*Trypanosoma* and *Leishmania* are uniflagellate protozoa belonging to the Trypanosomatidae family (Ortiz & Solari, 2019). Some species are pathogenic to animals and humans, such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*, which are responsible for Chagas disease and Visceral Leishmaniasis, respectively (Kaufer et al., 2017).

Wild animals are susceptible to infection, and as a group, neotropical primates are of great significance as they can act as reservoirs for these pathogens (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018). The growth of cities, deforestation, expansion of agriculture, and maintenance of wild fauna in captivity have promoted interaction between neotropical primates and humans, increasing the risk of spreading anthroponoses. Therefore, studying and understanding this relationship provides pertinent information within an epidemiological scope, allowing knowledge acquisition of transmission dynamics, the sentinel role of the host, and the risks of disease emergence (Aysanoa et al., 2017).

In Brazil, information regarding the potential role of primates as a reservoir of trypanosomatid infections is scarce, and diagnosis may represent a prophylactic measure for zoonoses control, especially for non-human primates because of their physiological, genetic, and geographic proximity to humans (Wolfe et al., 1998; Coimbra et al., 2020).

Therefore, the present study aimed to detect trypanosomatid infection from the whole blood of free-living and captive neotropical primates in Mato Grosso State, Midwest Brazil, using molecular techniques, including polymerase chain reaction (PCR), sequencing, and phylogenetic analysis.

Sample collection procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Mato Grosso (UFMT) under protocol no. 23108.015878/2019-65 and Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), permit no. 40617-1 and 42303.

Animals captured by the Environmental Agency of the State of Mato Grosso (SEMA) and Zoonosis Disease Control (CCZ) of Cuiabá municipality were admitted at the UFMT veterinary hospital between 2017 and 2019. The primates were immobilized using ketamine and midazolam according to the body weight of each animal (Cubas et al., 2014). Whole blood samples were collected from free-ranging and captive neotropical primates, stored in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), regardless of clinical signs, and sent to the Veterinary Microbiology and Molecular Biology Laboratory at the UFMT, Cuiabá, Brazil.

The samples were stored at -80°C before molecular tests, and DNA extraction was then conducted using the phenol/chloroform/proteinase K method, as previously described (Sambrook & Russell, 2001). To verify the presence of PCR inhibitors in the DNA samples and extraction success, we tested for the presence of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, with the oligonucleotides GAPDHF and GAPDHR, following the method by Birkenheuer et al. (2003).

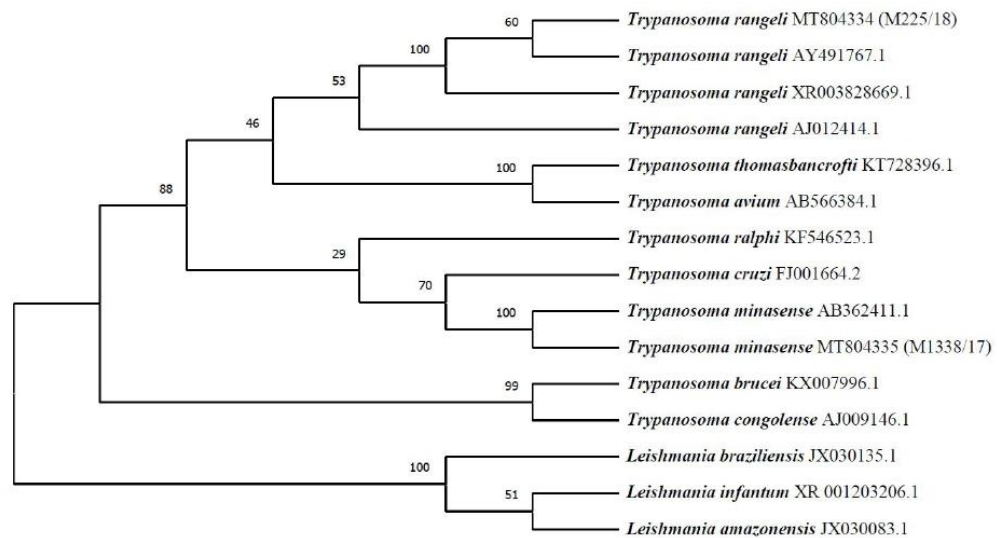
All DNA-extracted samples were screened for *Leishmania* by conventional PCR performed with LeishF and LeishR primers, as described by Degraeve et al. (1994). Two additional PCR protocols were applied for further testing of positive samples: one using the primers RV1 and RV2, which amplify a fragment of the kinetoplast DNA (kDNA) of *L. infantum* (Lachaud et al., 2002), and another using LSPF and LLAR primers to amplify a region from the kDNA minicircle of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Conter et al., 2018). For molecular identification of *Trypanosoma*, a fifth PCR targeting a fragment of the 18S ribosomal RNA (18S) rRNA gene was performed as previously described (Silva et al., 2004). Amplicons previously sequenced for each *Leishmania* parasite [*L. infantum* and *L. (L.) amazonensis*] were used as positive controls for PCR reactions, and *T. vivax* was used for *Trypanosoma* with ultrapure water acting as a negative control.

PCR products were resolved in 1% agarose gels stained with GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) and visualized using a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The expected-size amplicons of *Trypanosoma* were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Cytiva, Chicago, IL, USA) and prepared for sequencing using a BigDye™ kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). An ABI-PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) was used for sequencing using the same primers used for



PCR. The obtained sequences were compared with the DNA database using the BLAST® algorithm (version 2.8.0) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2021) to determine the closest identities with congeneric organisms available in GenBank®.

Sequences of the V7-V8 region of the small ribosomal subunit (SSU) rRNA gene generated in this study and homolog sequences retrieved from GenBank® were used for phylogenetic analyses to characterize *Trypanosoma* species. A cladogram was built based on the neighbor-joining technique with the bootstrap method with 1,000 replicates using MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 10.1.8 (Tamura et al., 2004). GenBank® DNA sequences of *Trypanosoma* spp. were included for phylogenetic analysis. *Leishmania* species were allocated as the out-group (Figure 1).



**Figure 1.** Cladogram of *Trypanosoma* spp. detected in neotropical primates, constructed using MEGA-X version 10.1.8. The cladogram was generated using the neighbor-joining technique performed with 805 base pairs of the V7-V8 region of parasite SSU rRNA genes. The initialization values are shown next to the nodes (1,000 replicates). All sequences obtained in this study are within one group, and *Leishmania* species were used as an out-group.

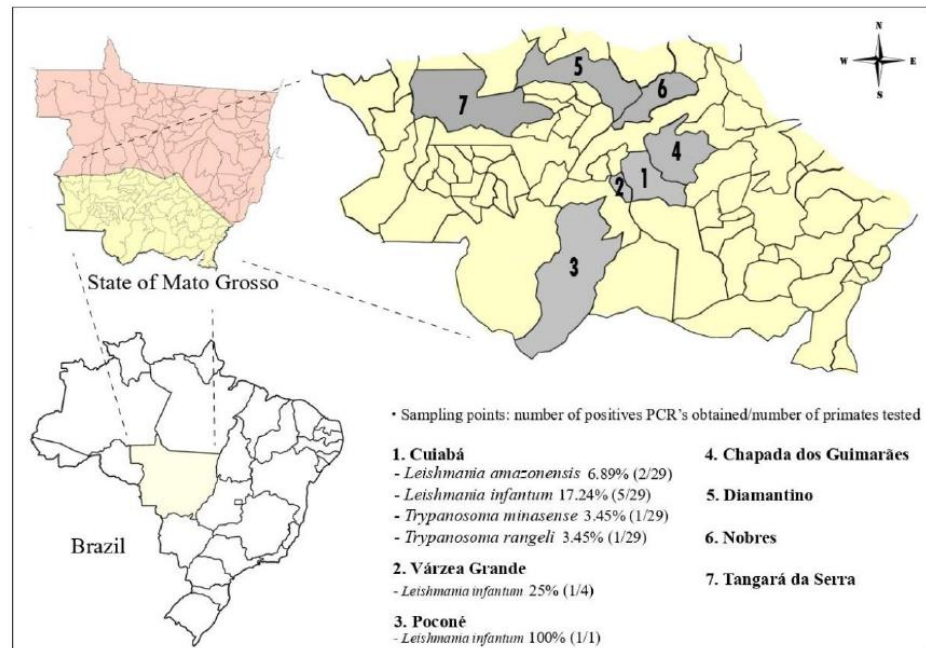
Thirty-eight neotropical primates representing *Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Aotus infulatus*, *Ateles marginatus*, *Mico melanurus*, and *Sapajus apella* species were captured from Cuiabá (15°35'46.0"S 56°05'48.0"W), Chapada dos Guimarães (15°27'38.0"S 55°44'59.0"W), Diamantino (14°24'31.0"S 56°26'46.0"W), Nobres (14°43'13.0"S 56°19'39.0"W), Poconé (16°15'24.0"S 56°37'22.0"W), Tangará da Serra (14°37'40"S 57° 30' 25"W), and Várzea Grande (15°38'48.0"S 56°07'57.0"W) municipalities, Mato Grosso (Figure 2).

PCR results showed that among the 38 samples evaluated, 11 (28.94%) contained trypanosomatid DNA (Table 1); 9 of these were from free-ranging animals (23.38%) that were positive for *Leishmania* spp. Among these, seven individuals (18.42%; including three *M. melanurus*, three *A. azarae*, and one *S. apella*) were infected with *L. infantum*, whereas two animals (5.26%; *S. apella* and *M. melanurus*) tested positive for *L. (L.) amazonensis*.

Furthermore, two (5.26%) of the 18S PCR-positive samples yielded amplicons for *Trypanosoma* species. Partial DNA sequences generated from *S. apella* yielded a haplotype with 99.20% (871/878 bp) similarity to *T. minasense*, designated as *T. minasense* isolate M1338/17 (GenBank number MT804335). Further, a DNA sequence obtained from *M. melanurus* had a 99.36% (938/944 bp) similarity with *T. rangeli*, designated as *T. rangeli* isolate M225/18 (GenBank number MT804334). The similarity of DNA and phylogenetic analysis were conclusive for accurate molecular classification. Coinfection was not observed in this study.

The best method for accurately identifying trypanosomatids is through molecular techniques, such as PCR and sequencing. They have greater specificity and differentiation capacity between species and are performed within a short time frame compared, for example, with blood cultures (Coimbra et al., 2020).





**Figure 2.** Map of the municipalities within the State of Mato Grosso where samples of the primates were collected for the polymerase chain reaction (PCR) with the respective infection rates (%).

**Table 1.** Epidemiological data of the animals tested and their respective results (F = Female, M = Male).

| Identification | Host                   | Habitat      | Sex | Municipality          | <i>Trypanosoma</i> spp. | <i>Leishmania</i> spp. |
|----------------|------------------------|--------------|-----|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| M05/17         | <i>Sapajus apella</i>  | Captive      | F   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M08/17         | <i>Sapajus apella</i>  | Captive      | F   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M530/17        | <i>Sapajus apella</i>  | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M1247/17       | <i>Sapajus apella</i>  | Captive      | M   | Várzea Grande         | -                       | -                      |
| M1249/17       | <i>Sapajus apella</i>  | Captive      | F   | Várzea Grande         | -                       | -                      |
| M1313/17       | <i>Sapajus apella</i>  | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M1328/17       | <i>Alouatta caraya</i> | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M1338/17       | <i>Sapajus apella</i>  | Free-ranging | F   | Cuiabá                | <i>T. minasense</i>     | -                      |
| M1339/17       | <i>Mico melanurus</i>  | Free-ranging | F   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M2043/17       | <i>Mico melanurus</i>  | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M35/18         | <i>Mico melanurus</i>  | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M64/18         | <i>Aotus infulatus</i> | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M81/18         | <i>Aotus azarae</i>    | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M133/18        | <i>Aotus azarae</i>    | Free-ranging | F   | Chapada dos Guimarães | -                       | -                      |
| M180/18        | <i>Mico melanurus</i>  | Free-ranging | M   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M204/18        | <i>Mico melanurus</i>  | Free-ranging | F   | Cuiabá                | -                       | -                      |
| M225/18        | <i>Mico melanurus</i>  | Free-ranging | M   | Cuiabá                | <i>T. rangeli</i>       | -                      |

Table 1. Continued...

| Identification | Host                     | Habitat      | Sex | Municipality     | <i>Trypanosoma</i> spp. | <i>Leishmania</i> spp. |
|----------------|--------------------------|--------------|-----|------------------|-------------------------|------------------------|
| M656/18        | <i>Sapajus apella</i>    | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | <i>L. amazonensis</i>  |
| M742/18        | <i>Alouatta caraya</i>   | Captive      | M   | Várzea Grande    | -                       | -                      |
| M897/18        | <i>Mico melanurus</i>    | Free-ranging | M   | Diamantino       | -                       | -                      |
| M970/18        | <i>Mico melanurus</i>    | Free-ranging | M   | Cuiabá           | -                       | <i>L. amazonensis</i>  |
| M1022/18       | <i>Aotus azarae</i>      | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M1057/18       | <i>Sapajus apella</i>    | Free-ranging | M   | Nobres           | -                       | -                      |
| M1098/18       | <i>Sapajus apella</i>    | Captive      | F   | Tangará da Serra | -                       | -                      |
| M1106/18       | <i>Sapajus apella</i>    | Captive      | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M1176/18       | <i>Aotus azarae</i>      | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M1241/18       | <i>Sapajus apella</i>    | Free-ranging | M   | Poconé           | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M522/19        | <i>Aotus infulatus</i>   | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M603/19        | <i>Alouatta caraya</i>   | Captive      | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M627/19        | <i>Mico melanurus</i>    | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M726/19        | <i>Aotus infulatus</i>   | Free-ranging | M   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M790/19        | <i>Mico melanurus</i>    | Free-ranging | F   | Várzea Grande    | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M1176/19       | <i>Aotus azarae</i>      | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M1460/19       | <i>Mico melanurus</i>    | Free-ranging | F   | Cuiabá           | -                       | <i>L. infantum</i>     |
| M1638/19       | <i>Ateles marginatus</i> | Captive      | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M1639/19       | <i>Ateles marginatus</i> | Captive      | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M1640/19       | <i>Ateles marginatus</i> | Captive      | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |
| M1641/19       | <i>Ateles marginatus</i> | Captive      | F   | Cuiabá           | -                       | -                      |

Considering this bias, the results obtained for *Leishmania* spp. indicated a high *L. infantum* occurrence, accounting for 77.77% (7/9) of the species identified. This finding points to a public health concern as non-human primates may be competent in transmitting *L. infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis* (Oliveira et al., 2019).

Molecular detection also was been reported for the first time with respect to *L. infantum* in three primates of the species, *A. azarae*, a species reported to be refractory to infection in a study of *in vitro* infection of peritoneal macrophages (Carneiro et al., 2012). This could be attributed to *in vivo* immune responses that have complex characteristics. Several factors, such as the nutritional status of the individual, particular immune response, and influence predisposition to clinical leishmaniasis infection; therefore, the presence of the trypanosome does not necessarily mean the animals had leishmaniasis, and the parasites may be eliminated from the animal (Serafim et al., 2010; Laurenti et al., 2014).

*L. (L.) amazonensis* is endemic to South America. In the current study, *L. (L.) amazonensis* DNA was detected by PCR in the blood of two primate species (*M. melanurus* and *S. apella*). After experimental infection, *S. apella* exhibited self-healing characteristics against *L. (L.) amazonensis* infection owing to components of their innate and acquired immunity with complete elimination of the disease after 150 days (Laurenti et al., 2014).

*T. minasense* was identified in free-living *S. apella*. This trypanosome is classified as non-pathogenic, specific to non-human primates, and therefore, there are no reports of human infections (Ziccardi et al., 1996). Moreover, *T. minasense* has been detected in *Alouatta caraya* in captivity in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil (Tenório et al., 2014), and three free-living *Callithrix* spp. at a botanical garden in downtown Rio de Janeiro, Brazil (Coimbra et al., 2020). Even with *T. minasense* present in several Brazilian regions, the public health risk is minimal since this protozoan is considered apathogenic; however, the reported finding is of descriptive importance.

In the present study, *T. rangeli* was identified in free-living *M. melanurus*. *T. rangeli* has already been detected in 72 primates of the species *Saguinus bicolor* (Callitrichidae) free-living in the Amazon rainforest (Silva et al., 2008). This protozoan is classified as non-pathogenic to vertebrates. However, unlike *T. minasense*, it has zoonotic potential (Silva et al., 2008). Moreover, detecting this parasite does not represent a public health issue because, in humans and domestic or wild reservoirs, parasitemia has a short duration and is low (Ramirez et al., 1998).

Our findings contribute to understanding the occurrence and epidemiology of diseases caused by *Trypanosoma* and *Leishmania* in Mato Grosso State, Brazil, and the importance of neotropical primates, which may play a role as hosts and possible infection sources of these protozoans for other animals and humans. Taken together, our study encourages further work to identify other pathogens in these animals, which will assist in disease control and prevention strategies.

## References

- Aysanoa E, Mayor P, Mendoza AP, Zariquiey CM, Morales EA, Pérez JG, et al. Molecular epidemiology of trypanosomatids and *Trypanosoma cruzi* in primates from Peru. *EcoHealth* 2017; 14(4): 732-742. <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-017-1271-8>. PMID:29098492.
- Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4172-4177. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>. PMID:12958243.
- Carneiro LA, Laurenti MD, Campos MB, Gomes CMC, Corbett CE, Silveira FT. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to *ex vivo* *Leishmania* (L.) *infantum* *chagasi*-infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2012; 54(2): 95-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652012000200007>. PMID:22499423.
- Coimbra DP, Penedo DM, Silva MOM, Abreu APM, Silva CB, Verona CE, et al. Molecular and morphometric identification of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *minasense* in blood samples of marmosets (*Callithrix*: Callitrichidae) from the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Int* 2020; 75: 101999. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2019.101999>. PMID:31669293.
- Conter CC, Lonardoni MVC, Aristides SMA, Cardoso RF, Silveira TGV. New primers for the detection *Leishmania* species by multiplex polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 2018; 117(2): 501-511. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5726-1>. PMID:29280072.
- Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. 2. ed. São Paulo: GEN/Roca; 2014.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*: a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89(3): 463-469. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761994000300032>. PMID:7476234.
- Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors* 2017; 10(1): 287. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>. PMID:28595622.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1): 210-215. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>. PMID:11773118.
- Laurenti MD, Passero LFD, Tomokane TY, Franceschini FC, Rocha MC, Gomes CM, et al. Dynamic of the cellular immune response at the dermal site of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Leishmania* (V.) *braziliensis* infection in *Sapajus apella* primate. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 134236. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/134236>. PMID:25309902.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. [online]. 2021 [cited 2021 Jan 05]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Oliveira AR, Pinheiro GRG, Tinoco HP, Loyola ME, Coelho CM, Dias ES, et al. Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13(4): e0007313. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007313>. PMID:30995227.
- Ortiz S, Solari A. Excavata-Kinetoplastea Trypanosomatidae parasites and the interaction with their hosts. *Int J Trop Dis* 2019; 2: 015. <http://dx.doi.org/10.23937/IJTD-20171710015>.
- Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Silva EL. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31(1): 99-102. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821998000100013>. PMID:9477704.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Serafim TD, Malafaia G, Silva ME, Pedrosa ML, Rezende SA. Immune response to *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(6): 811-817. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000600014>. PMID:20944998.

## Trypanosomatids in neotropical primates

- Silva FM, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D'Afonseca JA No, Naiff MF, et al. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop* 2008; 107(2): 168-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.015>. PMID:18603222.
- Silva FM, Noyes H, Campaner M, Junqueira ACV, Coura JR, Añez N, et al. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 2004; 129(5): 549-561. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182004005931>. PMID:15552400.
- Solórzano-García B, Pérez-Ponce de León G. Parasites of neotropical primates: a review. *Int J Primatol* 2018; 39(2): 155-182. <http://dx.doi.org/10.1007/s10764-018-0031-0>.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(30): 11030-11035. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404206101>. PMID:15258291.
- Tenório MS, Oliveira e Sousa L, Alves-Martin MF, Paixão MS, Rodrigues MV, Starke-Buzetti WA, et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Vet Parasitol* 2014; 203(1-2): 203-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.010>. PMID:24636787.
- Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg Infect Dis* 1998; 4(2): 149-158. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0402.980202>. PMID:9621185.
- Ziccardi M, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira R. The haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(4): 501-505. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000400019>. PMID:9070411.

## Artigo 2

Comprovante de submissão:

 **Manuscript submitted to Journal of Medical Primatology**

 Traduzir a mensagem para: Português (Brasil) | Nunca traduzir do: Inglês

 Journal of Medical Primatology <no-reply@atyponrex.com>  
Sex, 03/12/2021 15:30  
Para: Você

Dear Stefhano Candido,

Your manuscript entitled "Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in neotropical primates" has been successfully submitted online and is being delivered to the Editorial Office of *Journal of Medical Primatology* for consideration.

You will receive a follow-up email with further instructions from our electronic editorial office platform, ScholarOne, typically within one business day. That message will confirm that the Editorial Office has received your submission and will provide your Manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Medical Primatology*

Sincerely,  
The Editorial Staff at Journal of Medical Primatology



Stéfano Luís Cândido<sup>1</sup>; Maria Julia de Oliveira Rosa Fonseca<sup>2</sup>; Richard de Campos Pacheco<sup>3</sup>; Camila Gonçalves de Campos<sup>2</sup>; Thais Oliveira Morgado<sup>4</sup>; Edson Moleta Colodel<sup>2</sup>; Luciano Nakazato<sup>1</sup>; Valéria Dutra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Veterinary Microbiology and Molecular Biology, Veterinary Hospital – HOVET, Faculty of Veterinary Medicine - FAVET, Federal University of Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

<sup>2</sup>Veterinary Pathology Laboratory, Veterinary Hospital – HOVET, Faculty of Veterinary Medicine - FAVET, Federal University of Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratory of Veterinary Parasitology and Parasitic Diseases of Domestic and Wild Animals, Veterinary Hospital – HOVET, Faculty of Veterinary Medicine - FAVET, Federal University of Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

<sup>4</sup>Wild Animals Sector, Veterinary Hospital – HOVET, Faculty of Veterinary Medicine - FAVET, Federal University of Mato Grosso – UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

## **Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in neotropical primates**

### **ABSTRACT**

**Background:** *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in primates are potentially fatal and directly impact the conservation of these animals and public health.

**Materials and methods:** A total of 38 blood/clot, from free-living and captive Neotropical primates in Mato Grosso, Brazil, samples analyzed by PCR, for detection of *T. gondii* DNA and *N. caninum* DNA. Eight animals were subjected immunohistochemistry for the detection of *T. gondii*.

**Results:** We detected *T. gondii* DNA in 11 (28.95%) and *N. caninum* DNA in 10 (26.32%) of samples analyzed. Coinfection was observed in three individuals. One animal returned a positive result in the immunohistochemistry for the detection of *T. gondii*.

**Conclusion:** These findings indicate the importance of epidemiological surveillance and reflect a concern for the conservation of these mammals. As the pathogen-host interaction is unpredictable, infections by these protozoa can lead to animal mortality, which could have a substantial impact on endangered species.

**Keywords:** zoonoses, mammals, PCR, protozoa, conservation

## 1. INTRODUCTION

Non-human primates are present in approximately 90 countries, including Brazil, Madagascar, Indonesia, and the Democratic Republic of Congo, which together harbor 65% of the world's primate species, 60% of which are threatened with extinction. Consequently, Brazil has a fundamental role in the maintenance and conservation of these animals.<sup>1</sup>

The monitoring and identification of pathogens in Neotropical primates is essential for their conservation, and zoonotic species are particularly relevant, as they are sources of infection for humans and other animals.<sup>2</sup>

The protozoa *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), which causes toxoplasmosis, and *Neospora caninum* (*N. caninum*), which is responsible for neosporosis are the etiological agents of multisystemic diseases, especially in neurological and reproductive systems. Neotropical primates are intermediate hosts of these pathogens, and commonly contribute to acute and potentially fatal clinical outcomes.<sup>3,4</sup>

In Brazil, studies on the health profile of these animals are scarce because of the limited resources to adequately detail the great diversity of the country's fauna. Thus, molecular tests, especially polymerase chain reaction (PCR), which is highly sensitive and specific when compared to other methods, aid in providing the correct diagnosis of pathological agents that jeopardize the survival of free-living and captive Neotropical primates.<sup>3,5</sup>

This study aimed to molecularly detect *T. gondii* and *N. caninum* DNA in blood/clot samples from free-living and captive Neotropical primates from the Federal University of Mato Grosso (UFMT) Zoo, State Environmental Agency Mato Grosso (SEMA), and the Zoonoses Control Center (CCZ).

## 2. MATERIALS & METHODS

### 2.1 Samples

Between 2017 and 2019, 38 whole blood/clot samples were collected from six species of Neotropical primates in the State of Mato Grosso (free-living and captive) (*Alouatta caraya*, *Aotus azarae*, *Aotus infulatus*, *Ateles marginatus*, *Mico melanurus*, and *Sapajus apella*) from

the cities of Cuiabá (15°35'46.0" S 56° 05'48.0" W), Chapada dos Guimarães (15°27'38.0" S 55°44'59.0" W), Diamantino (14°24'31.0" S 56°26'46.0" W), Nobles (14°43'13.0" S 56°19'39.0" W), Poconé (16°15'24.0" S 56°37'22.0" W), Tangará da Serra (14°37'40" S 57°30'25" W), and Várzea Grande (15°38'48.0" S 56°07'57.0" W), as shown in Table 1.

Blood samples were collected from animals undergoing clinical care in the Wild Animals sector of the Veterinary Hospital of the Federal University of Mato Grosso, where they were contained and immobilized with ketamine and midazolam according to the body weight of each animal.<sup>6</sup> The animals were scrutinized for the presence of neurological signs (motor incoordination). Intracardiac clot samples were collected from deceased animals referred by the Environmental Agency of the State of Mato Grosso (SEMA) and the Center for Zoonoses Control (CCZ) in the municipality of Cuiabá. The collections were previously approved by the Ethics Committee in Animal Research at the Federal University of Mato Grosso under protocol number 23108.015878/2019–65, and the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), numbers 40617-1 and 42303.

## 2.2 DNA extraction

The DNA of whole blood/clot samples was extracted by the phenol/chloroform/proteinase K method<sup>7</sup>. DNA viability was verified by PCR for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene<sup>8</sup> (Table 2).

## 2.3 PCRs

The extracted DNA was subjected to PCR to detect the agents, as shown in Table 2. The reactions were performed in a thermocycler (Simpliamp Thermocycler, Thermo Fisher Scientific™). Positive controls were *amplicons*, previously sequenced according to each agent investigated [*T. gondii* (GenBank: KU288755) and *N. caninum* (GenBank: KY659810)] and ultrapure water was the negative control.

The *amplicons* were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, stained with GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain, Biotium®) at 10 V/cm. Ladder 100 pb (Ludwig®) was used as a molecular mass marker, and the bands were visualized in a ChemiDoc™ XRS photo documenter using Image Lab™ software.



## 2.4 Histopathological examination

The carcasses of animals found recently deceased or that died during the study were subjected to necropsy, and samples of brain, lung, and liver were collected and fixed in 10% buffered formalin. The samples were then embedded in paraffin, cut into 4 µm thick sections, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for screening in a histological examination under a microscope as well as with immunohistochemical techniques for the detection of *T. gondii*.<sup>11</sup>

## 3. RESULTS

Thirty-eight (n=38) animal samples were analyzed; 26 (69.42%) were free-living and 12 (31.58%) were captive animals, of which 22 (57.90%) were female and 16 (42.10%) were male. The PCR showed that 11 (28.95%) were positive for *T. gondii*: *S. apella* (n=6), *M. melanurus* (n= 3), and *A. azarae* (n=2), eight of which were free living animals and three were captive. *N. caninum* DNA was identified in 10 (26.32%) animals: *S. apella* (n=2), *A. marginatus* (n=2), *A. infulatus* (n=2), *A. azarae* (n= 2), *M. melanurus* (n=1), and *A. caraya* (n=1), six of which were free-living and four were captive. Three coinfections were observed during the molecular examination (M08/17, M2043/17, and M1022/18). All 38 samples tested had *GAPDH* gene amplification, demonstrating the quality and viability of the extracted DNA.

Of the 31 live animals observed, 7 (22.80%) had neurological signs compatible with *T. gondii*/*N. caninum* infection, of which 6 (85.71%) were positive for these protozoa in the PCR test, although the presence of positive PCR results for one or the other parasite was also observed, but with no neurological signs observed in the animals (7/31 = 22.80%).

Immunohistochemistry for the detection of *T. gondii* was performed in eight animals (21.05%) that presented viable carcasses. Only the primate M1022/18 (*Aotus azarae*, free-living female) showed positive immunohistochemical staining for *T. gondii*. Histopathological examination of this animal showed lungs with moderate and diffuse mononuclear infiltrate and deposition of amorphous multifocal eosinophilic interalveolar content (edema), with the occasional presence of structures similar to protozoan bradyzoites. In the liver, phantom nuclei, cytoplasm without delimitation, mild multifocal ballooning intracytoplasmic vacuolization, and accentuated and diffuse congestion were observed. The kidney revealed discrete and multifocal mononuclear infiltrate, while a severe and diffuse hemorrhage was identified in the spleen. In the morphological diagnosis, the lung presented moderate, diffuse, and chronic granulomatous bronchopneumonia; in the liver there was mild, diffuse, and subacute steatosis; and in the

kidneys, lesions compatible with mild multifocal and subacute interstitial nephritis were found. The other organs did not show any significant histopathological changes. In addition to coinfection, the animal presented neurological signs.

#### 4. DISCUSSION

Neotropical primates are important hosts and reservoirs of several pathogens/diseases in cases where the proximity between man and animals greatly increases the risk of dissemination of anthroponozoonoses. Environmental changes, deforestation, and the maintenance of wild fauna in captivity are risk factors for infections, which directly affect the survival, and consequently, the conservation of these animals<sup>12</sup>.

From the PCR analysis, 11 (28.95%) animals were positive for *T. gondii*, and toxoplasmosis in Neotropical primates varied according to the infected species, as well as the severity of the infection. There are marked differences in the natural resistance against *T. gondii* in this group of animals, due to behavioral, ecological, physiological, and evolutionary differences between the species; therefore, mortality rates vary from 0% to 100%, depending on the severity.<sup>2,13,4</sup> When infected with *T. gondii*, a primate may present neurological clinical signs such as motor incoordination due to encephalitis caused by the installation of protozoan cysts in the central nervous system<sup>11</sup>, which is the same clinical sign reported in the animals in this study.

Old World primates have comparatively low lethality for *T. gondii*, which can be attributable to the longer permanence in the soil. Thus, this group of animals probably acquired natural resistance due to greater exposure to feces from felines. Neotropical primates generally lack this resistance, as they have predominantly arboreal habits and are more susceptible to infection by *T. gondii*<sup>13</sup>, including those in captivity, which are more prone to outbreaks.<sup>14</sup>

Host susceptibility is also related to the genetic variability of this protozoan. Historically, only three *T. gondii* clones (Type I, II, and III) were defined in samples from Europe and the United States of America (USA), using the genetic marker SAG2<sup>15,16</sup> however, when multiple genetic markers were utilized, a high genetic variation was observed in this parasite, especially in South and Central America, when compared to those from Europe and North America.<sup>17,18,19,20,21</sup> A recent phylogeographic study revealed that South America is the likely origin of *T. gondii*, which could explain its diversity in this region.<sup>22</sup>

The species *S. apella*, although Neotropical, has periurban habits and contacts the soil in its search for food. These exposure risk factors are important for infection by protozoa, and there is the possibility that a selection of individuals exists that is naturally resistant to *T. gondii* infections, similar to old world primates.<sup>13</sup> This observation justifies the positive PCR for *T. gondii* for some animals that do not present neurological clinical signs.

*N. caninum* DNA was detected in 10 (26.32%) animals. The infection of primates by *N. caninum* has been described in a few studies, including through transplacental transmission, in which primates presented differing lesions in the central nervous system.<sup>23</sup>

More recent studies have also confirmed the infection of this group of animals by *N. caninum*, with acute and fatal clinical outcomes, and emphasized the importance of the differential diagnosis due to the similarities of tissue lesions and clinical signs with *T. gondii*.<sup>3</sup> *N. caninum* is not considered zoonotic; however, its DNA was detected in two samples of human umbilical cord blood, which requires further studies to clarify the importance of human exposure to this agent.<sup>24</sup>

In this study, three primates tested positive in the molecular detection of *T. gondii* and *N. caninum*, demonstrating co-infection in both free-living (one *Mico melanurus* and one *Aotus azarae*) and captive (one *Sapajus apella*) animals. Previous studies have reported the occurrence of co-infection with these agents in domestic mammals such as dogs<sup>25</sup>, wild animals such as rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)<sup>26</sup>, as well as wild animals kept in captivity, such as lions (*Panthera leo*), tigers (*Panthera tigris*), and reindeer (*Rangifer tarandus*).<sup>27</sup>

A necropsied animal (M1022/18) showed structures similar to protozoan bradyzoites in the histopathological examination of the lung, and the presence of DNA from *T. gondii* and *N. caninum* was detected by PCR; thus, the molecular diagnosis was congruent with the positive findings of the immunohistochemistry for *T. gondii*. The association of these techniques helps in the diagnosis of protozoan etiological agents in primates.<sup>3</sup>

Both *T. gondii* and *N. caninum* are protozoa whose infective forms are exclusively excreted in the feces of their respective definitive hosts<sup>24</sup>. Thus, infection is caused by coprophagy, a common habit in primates, and/or by the ingestion of water or food contaminated with infective oocysts.<sup>3</sup> Previous studies have shown the occurrence of *N. caninum*<sup>28</sup> and *T. gondii*<sup>29</sup> infecting canids and felids and their respective definitive hosts, as well as meningoencephalitis associated with *T. gondii* in a neotropical primate.<sup>11</sup>

The characterization of *T. gondii* and *N. caninum* infection as acute or chronic, as well as the clinical manifestation, is linked to factors such as the virulence of the strain, which is related to the genetic variety, and the host's immune status.<sup>30,31</sup> Due to the similarity between *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoites, the differential diagnosis is of great relevance<sup>3</sup>, which is reinforced by the possibility of coinfection.

## 5. CONCLUSION

This study demonstrates the importance of primates as reservoirs and/or carriers of pathogens as they act as maintainers of these agents in nature. Coinfections were also verified, which expand the ability to spread pathogens by the same individual. These findings reflect a concern for the conservation of these animals, as the pathogen-host interaction is unpredictable and infections by these protozoa can lead to animal mortality, which has a substantial impact on endangered species.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Estrada A, Garber PA, Mittermeier RA, et al. Primates in peril: the significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. *PeerJ*. 2018;6:e4869. Published 2018 Jun 15. doi:10.7717/peerj.4869
2. Catão-Dias JL, Epiphany S, Kierulff MCM. Neotropical Primates and Their Susceptibility to *Toxoplasma gondii*: New Insights for an Old Problem. *Primates, Pathogens, and Evolution*. 2013; Published 2013 Jun 20. *Developments in Primatology: Progress and Prospects*. Springer, New York, NY. doi.org/10.1007/978-1-4614-7181-3\_9
3. Costa TLC, Iglesias GA, Rosa JMA, Bento HJ, Rondelli LAS, Furlan F, Morgado TO, Dutra V, Corrêa SHR. Detecção molecular de *Neospora caninum* em macaco-da-noite (*Aotus azarae*) de vida livre no estado do Mato Grosso: relato de caso. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2018;70(4):1227-1232. doi:10.1590/1678-4162-9900.
4. Santana CH, de Oliveira AR, Dos Santos DO, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a lethal toxoplasmosis outbreak affecting captive howler monkeys (*Alouatta* sp.). *J Med Primatol*. 2021;50(2):99-107. doi:10.1111/jmp.12506

5. Robertson LJ, Clark CG, Debenham JJ, et al. Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife?. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2019;9:323-341. Published 2019 Feb 13. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.01.010
6. Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo: GEN/Roca; 2014. 1237 p.
7. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 2100 p.
8. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4172-4177. doi:10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003
9. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27(8):1787-1792. doi:10.1128/jcm.27.8.1787-1792.1989
10. Buxton D, Maley SW, Wright S, Thomson KM, Rae AG, Innes EA. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol.* 1998;118(4):267-279. doi:10.1016/s0021-9975(07)80003-x
11. Antoniassi NA, Boabaid FM, Souza RL, et al. Granulomatous meningoencephalitis due to *Toxoplasma gondii* in a black-headed night monkey (*Aotus nigriceps*). *J Zoo Wildl Med.* 2011;42(1):118-120. doi:10.1638/2009-0104.1
12. Solórzano-García B, Pérez-Ponce LG. Parasites of Neotropical Primates: A Review. *Int J Primatol.* 2018;39:155-182. doi:10.1007/s10764-018-0031-0
13. Paula NF, Dutra KS, Oliveira AR, et al. Host range and susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in captive neotropical and Old-world primates. *J Med Primatol.* 2020;49(4):202-210. doi:10.1111/jmp.12470
14. Niehaus C, Spínola M, Su C, et al. Environmental factors associated With *Toxoplasma gondii* Exposure in Neotropical Primates of Costa Rica. *Front Vet Sci.* 2020;7:583032. Published 2020 Oct 22. doi:10.3389/fvets.2020.583032
15. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995;172(6):1561-1566. doi:10.1093/infdis/172.6.1561
16. Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1411-1414. doi:10.1128/jcm.35.6.1411-1414.1997
17. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2004;34(10):1185-1196. doi:10.1016/j.ijpara.2004.06.007

18. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11423-11428. doi:10.1073/pnas.0601438103
19. Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):359-368. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.010
20. Shwab EK, Zhu XQ, Majumdar D, et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*. 2014;141(4):453-461. doi:10.1017/S0031182013001844
21. Vitaliano SN, Soares HS, Minervino AH, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014;3(3):276-283. Published 2014 Oct 13. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.09.003
22. Bertranpetit E, Jombart T, Paradis E, et al. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. *Infect Genet Evol*. 2017;48:150-155. doi:10.1016/j.meegid.2016.12.020
23. Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab Invest*. 1994;71(2):236-242.
24. Duarte PO, Oshiro LM, Zimmermann NP, et al. Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Sci Rep*. 2020;10(1):9043. Published 2020 Jun 3. doi:10.1038/s41598-020-65991-1
25. Yildiz K, Yasa Duru S, Yagci BB, et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. *Turkiye Parazitol Derg*. 2009;33(2):116-119
26. Hughes JM, Thomasson D, Craig PS, Georgin S, Pickles A, Hide G. *Neospora caninum*: detection in wild rabbits and investigation of co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis. *Exp Parasitol*. 2008;120(3):255-260. doi:10.1016/j.exppara.2008.07.011
27. Marková J, Macháčová T, Bártová E, et al. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* in Animals from Captivity (Zoo and Circus Animals). *J Eukaryot Microbiol*. 2019;66(3):442-446. doi:10.1111/jeu.12688
28. André MR, Adania CH, Teixeira RH, et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *J Parasitol*. 2010;96(5):1007-1009. doi:10.1645/GE-2502.1
29. Rodrigues JY, Almeida AD, Boa Sorte ED, Gasparetto ND, Cruz FA, Sousa VR. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs of riverside communities of Mato Grosso Pantanal, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016;25(4):531-535. doi:10.1590/S1984-29612016067

30. Innes EA. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1997;20(2):131-138. doi:10.1016/s0147-9571(96)00038-0
31. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):323-367. doi:10.1128/CMR.00031-06

**Table 1.** Epidemiological data of the animals tested and the respective results obtained. (F = Female, M = Male).

| Identification  | Host                     | Habitat     | Sex | City                  | PCR <i>T. gondii</i> . | PCR <i>N. caninum</i> | IHC <i>T. gondii</i> | Neurological signs |
|-----------------|--------------------------|-------------|-----|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| <b>M1328/17</b> | <i>Alouatta caraya</i>   | Free-living | M   | Cuiabá                | -                      | -                     | Unrealized           | YES                |
| <b>M742/18</b>  | <i>Alouatta caraya</i>   | Captivity   | M   | Várzea Grande         | -                      | -                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M603/19</b>  | <i>Alouatta caraya</i>   | Captivity   | F   | Cuiabá                | -                      | +                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M81/18</b>   | <i>Aotus azarae</i>      | Free-living | M   | Cuiabá                | -                      | +                     | Unrealized           | DEATH*             |
| <b>M133/18</b>  | <i>Aotus azarae</i>      | Free-living | F   | Chapada dos Guimarães | -                      | -                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M1022/18</b> | <i>Aotus azarae</i>      | Free-living | F   | Cuiabá                | +                      | +                     | +                    | YES                |
| <b>M1176/18</b> | <i>Aotus azarae</i>      | Free-living | F   | Cuiabá                | -                      | -                     | -                    | NO                 |
| <b>M1176/19</b> | <i>Aotus azarae</i>      | Free-living | F   | Cuiabá                | +                      | -                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M64/18</b>   | <i>Aotus infulatus</i>   | Free-living | M   | Cuiabá                | -                      | -                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M522/19</b>  | <i>Aotus infulatus</i>   | Free-living | F   | Cuiabá                | -                      | +                     | Unrealized           | YES                |
| <b>M726/19</b>  | <i>Aotus infulatus</i>   | Free-living | M   | Cuiabá                | -                      | +                     | Unrealized           | YES                |
| <b>M1638/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Captivity   | F   | Cuiabá                | -                      | +                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M1639/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Captivity   | F   | Cuiabá                | -                      | -                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M1640/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Captivity   | F   | Cuiabá                | -                      | -                     | Unrealized           | NO                 |
| <b>M1641/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Captivity   | F   | Cuiabá                | -                      | +                     | Unrealized           | NO                 |



|                 |                       |             |   |               |   |   |            |        |
|-----------------|-----------------------|-------------|---|---------------|---|---|------------|--------|
| <b>M1339/17</b> | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | F | Cuiabá        | - | - | -          | DEATH* |
| <b>M2043/17</b> | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | M | Cuiabá        | + | + | -          | DEATH* |
| <b>M35/18</b>   | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | M | Cuiabá        | - | - | Unrealized | DEATH* |
| <b>M180/18</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | M | Cuiabá        | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M204/18</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | F | Cuiabá        | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M225/18</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | M | Cuiabá        | + | - | -          | NO     |
| <b>M897/18</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | M | Diamantino    | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M970/18</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | M | Cuiabá        | + | - | -          | DEATH* |
| <b>M627/19</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | F | Cuiabá        | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M790/19</b>  | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | F | Várzea Grande | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1460/19</b> | <i>Mico melanurus</i> | Free-living | F | Cuiabá        | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M05/17</b>   | <i>Sapajus apella</i> | Captivity   | F | Cuiabá        | + | - | Unrealized | YES    |
| <b>M08/17</b>   | <i>Sapajus apella</i> | Captivity   | F | Cuiabá        | + | + | Unrealized | YES    |
| <b>M530/17</b>  | <i>Sapajus apella</i> | Free-living | M | Cuiabá        | + | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1247/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Captivity   | M | Várzea Grande | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1249/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Captivity   | F | Várzea Grande | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1313/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Free-living | M | Cuiabá        | - | + | -          | DEATH* |

|                 |                       |             |   |                  |   |   |            |        |
|-----------------|-----------------------|-------------|---|------------------|---|---|------------|--------|
| <b>M1338/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Free-living | F | Cuiabá           | + | - | -          | DEATH* |
| <b>M656/18</b>  | <i>Sapajus apella</i> | Free-living | F | Cuiabá           | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1057/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Free-living | M | Nobres           | + | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1098/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Captivity   | F | Tangará da Serra | - | - | Unrealized | NO     |
| <b>M1106/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Captivity   | F | Cuiabá           | + | - | Unrealized | YES    |
| <b>M1241/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Free-living | M | Poconé           | - | - | Unrealized | NO     |

\* Animals found dead by environmental organs, without parameters to identify the presence of neurological signs.

Table 2. *Primer* sequence with the respective sizes of *amplicons* and authors, according to the agents surveyed.

| Target DNA                              | Primer | Oligonucleotide Sequence (5' - 3') | Target         | Fragment | Author |
|-----------------------------------------|--------|------------------------------------|----------------|----------|--------|
| Mammal                                  | GAPDHF | CCTTCATTGACCTCAACTACAT             | <i>GAPDH</i>   | 590pb    | 8      |
|                                         | GAPDHR | CCAAAGTTGTCATGGATGACC              |                |          |        |
| <i>Toxoplasma gondii</i>                | TOXO 1 | GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG             | <i>B1</i> gene | 194pb    | 9      |
|                                         | TOXO 2 | TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC               |                |          |        |
| <i>Neospora caninum</i><br>(Nested PCR) | NN1    | TCAACCTTTGAATCCCAA                 | <i>ITS-1</i>   | 213pb    | 10     |
|                                         | NN2    | CGAGCCAAGACATCCATT                 |                |          |        |
|                                         | NP1    | TACTACTCCCTGTGAGTTG                |                |          |        |
|                                         | NP2    | TCTCTTCCCTCAAACGCT                 |                |          |        |

**DEMAIS RESULTADOS (*Brucella* spp e *Leptospira* spp):**

A presença de DNA de *Brucella* spp. ocorreu em 13 (34,21%) amostras (sete *S. apella*, dois *A. caraya*, dois *A. marginatus*, um *M. melanurus* e um *A. infulatus*). Este agente foi identificado tanto em animais de vida livre quanto em de cativeiro. Nesse estudo não foi encontrado a presença de material genético de *Leptospira* spp. nas amostras testadas.

## REFERÊNCIAS

- ABEDI, A. S.; HASHEMPOUR-BALTORK, F.; ALIZADEH, A. M.; BEIKZADEH, S.; HOSSEINI, H.; BASHIRY, M.; TASLIKH, M.; JAVANMARDI, F.; SHEIDAEI, Z.; SARLAK, Z.; MOFID, V.; FAKHRI, Y.; MOUSA, V. I.; KHANEGHAH, A. The prevalence of *Brucella* spp. in dairy products in the Middle East region: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**. v. 202, 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.105241.
- ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M. N.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S. F.; GONCALVES, C. S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**. v. 26, n. 121, p. 179-187, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.03.002.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, DE LA PEÑA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. v. 27, n. 140, p. 287-296, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M. D. E. L.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG'U, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 5, n. 28, p. 1-10, 2006. DOI: 10.1186/1476-0711-5-28.
- ALCOVER, M. M.; BASURCO, A.; FERNANDEZ, A.; RIERA, C.; FISA, R.; GONZALEZ, A.; VERDE, M.; GARRIDO, A. M.; RUÍZ, H.; YZUEL, A.; VILLANUEVA-SAZ, S. A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. **Parasites & Vectors**. v. 25, n. 14, 2021. DOI: 10.1186/s13071-021-04682-w.
- ALFARO, J. W. L.; SILVA, J. J. S.; RYLANDS, A. B. How different are robust and gracile Capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* or *Cebus*. **American Journal of Primatology**. v. 74, n. 4, p. 273-86, 2012. DOI: 10.1002/ajp.22007.
- ALIAGA-SAMANEZ, G. G.; LESCANO, J.; URDAY, M. J. Q.; RODRÍGUEZ, G. S. S.; WATSA, M. E.; ESCALANTE, J. E. C.; ERKENSWICK, G. A. First detection of antibodies against *Leptospira* among free-ranging neotropical non-human primates in the Peruvian Amazon lowland rainforest. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2021. DOI: 10.1111/tbed.14112. (2021).
- ALMEIDA, A. B. P. F.; SILVA, C. P. A.; PITCHENIN, L. C.; DAHROUG, M. A. A.; SILVA, G. C. P.; SOUSA, V. R. F.; SOUSA, R. L.; NAKAZATO, L. DUTRA, V. *Brucella abortus* and *Brucella canis* in Cataveiro wild felids in Brazil. **International Zoo Yearbook**. v. 34, n. 1, p. 204-207, 2012. DOI: 10.1111/j.1748-1090.2012.00188.x.
- ALMEIDA, D. S.; SANTOS, A. C.; SILVA, C. L. R.; ORIÁ, A. P.; OLIVEIRA, A. V. D.; LIBÓRIO, F. A.; ATHANAZIO, D. A.; PINNA, M. H. Evidence of leptospiral exposure in neotropical primates rescued from illegal trade and a Zoo in Bahia, Brazil.

**Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 36 n. 9, p. 864-868, 2016. DOI: 10.1590/s0100-736x2016000900012.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, D. B.; M., WHO, L. C. T. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.

AMARAL, V. F.; RANSATTO, V. A.; CONCEICÃO-SILVA, F.; MOLINARO, E.; FERREIRA, V.; COUTINHO, S. G.; MCMAHON-PRATT, D.; GRIMALDI, G. J. *Leishmania amazonensis*: the Asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology.** v. 82, n. 1, p. 33-34, 1996. DOI: 10.1006/expr.1996.0005.

ANTONIASSI, N. A.; BOABAID, F. M.; SOUZA, R. L. Granulomatous meningoencephalitis due to *Toxoplasma gondii* in a black-headed night monkey (*Aotus nigriceps*). **Journal Zoo Wild Medicine.** v. 42, p. 118-120, 2011. DOI: 10.1638/2009-0104.1

AOKI, J. I.; HONG, A.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; LARANJEIRA-SILVA, M. F. In vivo infection with *Leishmania amazonensis* to evaluate parasite virulence in mice. **Journal of Visualized Experiments.** v. 20, n. 156, p. 1-9, 2020. DOI: 10.3791/60617.

ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M.; PEARSON, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGILL, A. Diagnosis and treatment of Leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 11, n. 96, p. 24-45, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-84256.

AYSANO, E.; MAYOR, P.; MENDOZA, A. P.; ZARIQUIEY, C. M.; MORALES, E. A.; PÉREZ, J. G.; BOWLER, M.; VENTOCILLA, J. A.; GONZÁLEZ, C.; BALDEVIANO, G. C.; LESCANO, A. G. Molecular Epidemiology of Trypanosomatids and *Trypanosoma cruzi* in primates from Peru. **EcoHealth.** v. 14, n. 4, p. 732–742, 2017. DOI: 10.1007/s10393-017-1271-8.

AZAMI-CONESA, I.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; GONZÁLEZ, F.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T. First detection of *Leishmania infantum* in common urban bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. **Research in Veterinary Science.** v. 132, p. 172-176, 2020. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.06.019.

BARR, B. C.; CONRAD, P. A.; SVERLOW, K. W. et al. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation.** v. 71, n. 2, p.236-242, 1994.

BÁRTOVÁ, E.; SLEZÁKOVÁ, R.; NÁGL, I.; SEDLÁK, K. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Czech Republic. **Annals of Agricultural Environmental Medicine.** v. 23, n. 1, p. 84-86, 2016. DOI: 10.5604/12321966.1196858.

BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulente *Trypanosoma cruzi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 157, p. 119-123, 2014. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.10.011.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003. DOI: 10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003.

BJÄRKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**. v. 70, p. 271-274, 1984. DOI: 10.1007/BF00942230.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in Leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine X**. v. 12, p. 1-16, 2020. DOI: 10.1016/j.cytex.2020.100041.

BOLIN, C. A. Leptospirosis. Zoo and Wildlife Medicine. **Elsevier Science**, 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania, 2003.

BRANDÃO, M. V. A. P. D. Saúde Única em articulação com a saúde global: o papel da Medicina Veterinária do coletivo. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**. v. 13, n. 3, p. 77-77, 2016.

BRASIL. Decreto Nº 66.183, de 5 de fevereiro de 1970. Regulamenta o Decreto-lei n.923, de 10 de outubro de 1969, que dispõe sobre a comercialização de leite cru. Diário Oficial da União, Brasília, 5 fev, 1970.

BRITO, V. N.; DIAS, Á. F. L. R.; SOUSA, V. R. F. Epidemiological aspects of Leishmaniasis in the Pantanal region of Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 28, n. 4, p. 744-749, 2019. DOI: 10.1590/s1984-29612019061

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989. DOI: 10.1128/JCM.27.8.1787-1792.1989.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**. v. 15, n. 392, p. 951-970, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.; THOMSON, K. M.; RAE, A. G.; INNES, E. A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**. v. 118, p. 267-279, 1998. DOI: 10.1016/s0021-9975(07)80003-x.

CALDART, E.T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F.P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 26, n. 1, p. 17-27, 2017. DOI: 10.1590/S1984-29612017001.

CAMERON, C. E. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 387, p. 21-41, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-45059-8\_3.

CANTOS-BARREDA, A.; NAVARRO, R.; PARDO-MARÍN, L.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; ORTEGA, E.; CERÓN, J. J.; TECLES, F.; ESCRIBANO, D. Clinical Leishmaniasis in a Cativeiro Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Spain: a case report. **BMC Veterinary Research**. v. 16, n. 312, p. 1-6, 2020. DOI: 10.1186/s12917-020-02509-x.

CARVALHO, M. R.; DIAS, Á. F. L. R.; ALMEIDA, A. D. B. P. F.; ALVES, M. R.; PAES, A. S.; SOUSA, V. R. F. Canine Visceral Leishmaniasis: perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 29, n. 2, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1590/s1984-29612020017.

CASAGRANDE, R. A.; SILVA, T. C. E.; PESCADOR, C. A.; BORELLI, V.; SOUZA, J. S. J.; SOUZA, E. R.; TRAVERSO, S. D. Toxoplasmoses em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 1, p. 94-98, 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000100017.

CAVALERA, M. A.; IATTA, R.; LARICCHIUTA, P.; PASSANTINO, G.; ABRAMO, F.; MENDOZA-ROLDAN, J. A.; OTRANTO, D.; ZATELLI, A. Clinical, haematological and biochemical findings in tigers infected by *Leishmania infantum*. **BMC Veterinary Research**. v. 16, n. 214, p. 1-7, 2020. DOI: 10.1186/s12917-020-02419-y.

CERAN, N.; TURKOGLU, R.; ERDEM, I.; Asuman, I.; Derya, E.; Hulya, T.; Pasa, G. Neurobrucellosis: clinical, diagnostic, therapeutic features and outcome. Unusual clinical presentations in an endemic region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 1, p. 52-59, 2011. DOI: 10.1590/S1413-86702011000100010.

CHAVES, P. B.; ALVARENGA, C. S.; POSSAMAI, C.; DIAS, L. G.; BOUBLI, J. P.; STRIER, K. B.; MENDES, S. L.; FAGUNDES, V. Genetic diversity and population history of a critically endangered primate, the northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*). **PloS One**. v. 6, n. 6, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0020722.

CILIA, G.; BERTELLONI, F.; ANGELINI, M.; CERRI, D.; FRATINI, F. *Leptospira* survey in wild boar (*Sus scrofa*) hunted in Tuscany, Central Italy. **Pathogens**. v. 5, n. 377, p. 1-16, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9050377.

COIMBRA, D. P.; PENEDO, D. M.; SILVA, M.; ABREU, A. P. M.; SILVA, C. B.; VERONA, C. E.; HELIODORO, G. C.; MASSARD, C. L.; NOGUEIRA, D. M. Molecular and morphometric identification of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in blood samples of marmosets (*Callithrix: Callithrichidae*) from the city of

Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology International**. v. 75, 2020. DOI: 10.1016/j.parint.2019.101999.

CONTER, C. C.; LONARDONI, M. V. C.; ARISTIDES, S. M. A.; CARDOSO, R. F.; SILVEIRA, T. G. V. New primers for the detection *Leishmania* species by multiplex polymerase chain reaction. **Parasitology Research**. v. 117, n. 2, p. 501-511, 2018; DOI: 10.1007/s00436-017-5726-1.

COSTA, T. L. C.; IGLESIAS, G. A.; ROSA, J. M. A.; BENTO, H. J.; RONDELLI, L. A. S.; FURLAN, F.; MORGADO, T. O.; DUTRA, V.; CORRÊA, S. H. R. Detecção molecular de *Neospora caninum* em macaco-da-noite (*Aotus azarae*) de vida livre no estado do Mato Grosso: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 70, n. 4, p. 1227-1232, 2018. DOI: 10.1590/1678-4162-9900.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária. 2 ed. São Paulo: **GEN/Roca**; 2014.

DA SILVA, F. M.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; CAMPANER, A. C. V.; JUNQUEIRA, J. R.; COURA, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**. v. 129, n. 5, p. 549-561, 2004. DOI: 10.1017/s0031182004005931.

DAHROUG, M. A.; ALMEIDA, A. B.; SOUSA, V. R.; DUTRA, V.; TURBINO, N. C.; NAKAZATO, L.; DE SOUZA, R. L. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Cativoiro wild felids in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 104, n. 1, p. 73-74, 2009. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.08.003.

DE FARIAS, M. T.; CALDERWOOD, M. S.; ATHANAZIO, D. A.; MCBRIDE, A. J. A.; HARTSKEERL, R. A.; PEREIRA, M. M. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from a high endemic urban setting for Leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**. v. 108, n. 1, p. 1-5, 2008. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.07.005.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastide Biology and Disease**. v. 1, n. 3, 2002. DOI: 10.1186/1475-9292-1-3.

DE SOUZA, A. I.; BARROS, E. M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M.; MARIN, G. R.; NUNES, V. L. Feline Leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 10, n. 1, p. 41-45, 2005. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.11.020.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 89, n. 3, p. 463-469, 1994. DOI: 10.1590/S0074-02761994000300032.



DONAHOE, S. L.; LINDSAY, S. A.; KROCKENBERGER, M.; PHALEN, D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology**. v. 4, p. 216-238, 2015. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2015.04.002.

DUARTE, P. O.; OSHIRO, L. M.; ZIMMERMANN, N. P.; CSORDAS, B. G.; DOURADO, D. M.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. **Scientific reports**. v. 10, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-65991-1.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012. DOI: 10.1017/S0031182012000765.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals the last five years. **Veterinary Parasitology**. v. 4, n. 180, p. 90-108, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.031.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTER, M. M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L.; LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 929–946, 2002. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00094-2.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00031-06.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.

DUNAY, I. R.; GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. G. Treatment of Toxoplasmosis: Historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 31, n. 4, p. 1-33, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00057-17.

EL-BAHNASAWY, M. M.; KHATER, M. K. H.; MORSY, T. A. African trypanosomiasis with special reference to Egyptian *Trypanosoma evansi*: is it a neglected zoonosis? **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**. v. 44, n. 3, p. 741-748, 2014. DOI: 10.12816/0007877.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATAO-DIAS, J. L. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. **Journal of Comparative Pathology**. v. 129, p. 196-204, 2003. DOI: 10.1016/s0021-9975(03)00035-5.

ESTRADA, A.; GARBER, P. A.; MITTERMEIER, R. A.; WICH, S.; GOUVEIA, S.; DOBROVOLSKI, R.; NEKARIS, K. A. I.; NIJMAN, V.; RYLANDS, A. B.; MAISELS, F.; WILLIAMSON, E. A.; BICCA-MARQUES, J.; FUENTES, A.; JERUSALINSKY, L.; JOHNSON, S.; RODRIGUES, M. F.; OLIVEIRA, L.; SCHWITZER, C.; ROOS, C.; CHEYNE, S. M.; MARTINS, K. M. C.; RAHARIVOLOLONA, B.; TALEBI, M.; RATSIMBAZAFY, J.; SUPRIATNA, J.; BOONRATANA, R.; WEDANA, M.; SETIAWAN, A. Primates in peril: the significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. **PeerJ**. v. 15, n. 6, p. 1-57, 2018; DOI: 10.7717/peerj.4869.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**. v. 5, n. 9, p. 1-17, 2010. DOI: 10.2217/fmb.10.102.

FERREIRA, L. L.; ARAÚJO, F. F.; MARTINELLI, P. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ALVES-SILVA, J.; GUARNERI, A. A. New features on the survival of human-infective *Trypanosoma rangeli* in a murine model: Parasite accumulation is observed in lymphoid organs. **PLoS Neglected Tropical Disiases**. v. 14, n. 12, p. 1-21, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009015.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidian oocysts. **Science**. v. 167, p. 893-896, 1970. DOI: 10.1126/science.167.3919.893.

GAZZONIS, A. L.; BERTERO, F.; MORETTA, I.; MORGANTI, G.; MORTARINO, M.; VILLA, L.; ZANZANI, S. A.; MORANDI, B.; RINNOVATI, R.; VITALE, F.; MANFREDI, M. T.; CARDOSO, L.; VERONESI, F. Detecting antibodies to *Leishmania infantum* in horses from areas with different epizooticity levels of canine Leishmaniosis and a retrospective revision of Italian data. **Parasites & Vectors**. v. 13, n. 530, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1186/s13071-020-04385-8.

GIRIO, R. J. S.; DE ANDRADE-CRUVINEL, T. M.; VASCONCELLOS, S. A.; REPETTI, C. S. F.; FRIOLANI, M.; BUENO, P. C. D. S.; FELIX, M.; TEIXEIRA, D. B. Serological survey and DNA screening of *Leptospira* spp. in free-living adult tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigrilus*) in a forest reserve Southeast São Paulo State, Brazil. **Journal of Medical Primatology**. v. 50, n. 1, p. 3-8, 2021. DOI: 10.1111/jmp.12493.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. Relationship between Canine Visceral Leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**. n. 135, p. 100-107, 2006. DOI: 10.1016/j.jcpa.2006.06.005.

GONDIM, L. F.; MCALLISTER, M. M.; PITT, W. C.; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, n. 2, p. 159–161, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpara.2004.01.001.

GOODSWEN, S. J.; STEPHEN, J.; KENNEDY, J. P.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present,

infection, genetics and evolution. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**. v. 13, p. 133-150, 2013. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.08.012.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Current Topics in Microbiology Immunology**. v. 387, p. 65-97, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-45059-8\_5.

HEYMANN, E. W.; CULOT, L.; KNOGGE, C.; SMITH, A. C.; TIRADO HERRERA, E. R.; MÜLLER, B.; STOJAN-DOLAR, M.; LLEDO FERRER, Y.; KUBISCH, P.; KUPSCH, D.; SLANA, D.; KOOPMANN, M. L.; ZIEGENHAGEN, B.; BIALOZYT, R.; MENGEL, C.; HAMBUCKERS, J.; HEER, K. Small Neotropical primates promote the natural regeneration of anthropogenically disturbed areas. **Scientific reports**. v. 9, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46683-x.

JIMÉNEZ, P.; JAIMES, J.; POVEDA, C.; RAMÍREZ, J. D. A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. **Parasitology**. v. 143, n. 3, p. 269-283, 2019. DOI: 10.1017/S0031182018001506.

JITENDER, P.; DUBEY, L. E.; WHITESELL, W. E. C.; SHARON, D. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* associated dermatitis in a red fox (*Vulpes vulpes*) with concurrent *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 45, n. 2, p. 454-457, 2014. DOI: 10.1638/2013-0277.1.

KARANIS, P.; ALDEYARBI, H. M.; MIRHASHEMI, M. E.; KHALIL, K. M. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. **Environmental Science and Pollution Research International**. v. 20, n. 1, p. 86-99, 2013. DOI: 10.1007/s11356-012-1177-5.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**. v. 10, n. 287, p. 1-17, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2204-7.

KHAKI, P. Clinical Laboratory Diagnosis of Human Leptospirosis. **International Journal Enteric Pathogens**. v. 4, n. 1, p. 1-7, 2016. DOI: 10.17795/ijep31859.

KHURANA, S. K.; SEHRAWAT, A.; TIWARI, R.; PRASAD, M.; GULATI, B.; SHABBIR, M. Z.; CHHABRA, R.; KARTHIK, K.; PATEL, S. K.; PATHAK, M.; YATOO, I. M.; GUPTA, V. K.; DHAMA, K.; SAH, R.; CHAICUMPA, W. Bovine brucellosis - a comprehensive review. **The Veterinar Quarterly**. v. 41, n. 1, p. 61-88, 2021. DOI: 10.1080/01652176.2020.1868616.

KIM, S.; LEE, D. S.; SUZUKI, H.; WATARAI, M. Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by Multiplex Nested PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 68, n. 6, p. 615-618, 2006. DOI: 10.1292/jvms.68.615.

KLUYBER, D.; DESBIEZ, A. L. J.; ATTIAS, N.; MASSOCATO, G. F.; GENNARI, S. M.; SOARES, H. S.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; GARCÉS, H. G.; FERREIRA, J. D. S.; FONTES, A. N. B.; SUFFYS, P. N.; MEIRELES, L. R.; JANSEN, A. M.; LUNA, E. J. A.; ROQUE, A. L. R. Zoonotic parasites infecting free-living armadillos from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2020. DOI: 10.1111/tbed.13839.

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, 2020. DOI: 10.1128/JCM.40.1.210-215.2002.

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução animal**. v. 32, n. 3, p. 202-212, 2008.

LAINSON R, SHAW, J. J. Leishmaniasis in the new world. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. **Topley & Wilson's**. 10 ed. London: E Arnold; p. 313-349, 2005.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001. DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.

LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. **Boca Raton**. 2 ed., 1988.

LEWIN, R. Human evolution: an illustrated introduction. **Oxford: Blackwell**. 5 ed., 2005.

LIEGEON, G.; DELORY, T.; PICARDEAU, M. Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of *Leptospira*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 51, n. 5, p. 693-699, 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.

LIMA, V. M.; SANTIAGO, M. E.; SANCHES, L. D. A. C.; LIMA, B. D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a Cataveiro spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 43, n. 4, p. 943-945, 2012. DOI: 10.1638/2012-0059R1.1.

LÓPEZ-SANTIAGO, R.; SÁNCHEZ-ARGÁEZ, A. B.; DE ALBA-NÚÑEZ, L. G.; BALTIERRA-URIBE, S. L.; MORENO-LAFONT, M. C. Immune response to mucosal *Brucella* infection. **Frontiers in Immunology**. v. 20, n. 10, p. 1-21, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01759.

MADRUGA, G.; RIBEIRO, A. P.; RUIZ, T.; SOUSA, V. R. F.; CAMPOS, C. G.; ALMEIDA, A. B. P. F.; PESCADOR, C. A.; DUTRA, V. Ocular manifestations of Leishmaniasis in a cat: first case report from Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.70, n. 5, p. 1514-1520, 2018. DOI: 10.1590/1678-4162-9244.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M. J.; ORTIZ, P. A.; CAMPANER, M.; TAKEDA G. F.; PAIVA, F.; NUNES, V. L. B.; CAMARGO, E. P.;

TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced leader gene sequences. **Acta Tropica**. v. 109, n. 3, p. 199-207, 2009. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.11.005.

MAIA DA SILVA, F.; NAIFF, R. D.; MARCILI, A.; GORDO, M.; D'AFFONSECA, N. J. A.; NAIFF, M. F.; FRANCO, A. M.; CAMPANER, M.; VALENTE, V.; VALENTE, S. A.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M.; MILES, M. A. (2008). Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting *Vida livre Saguinus bicolor* (*Callitrichidae*), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Tropica**. v. 107, n. 2, p. 168–173, 2008. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.05.015.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ÃNEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**. v. 129, n. 5, p. 549–561, 2004. DOI: 10.1017/s0031182004005931.

MAKINO, H.; MOREIRA, J. M. A. R.; BEZERRA, K. S.; OTSUBO, A. A. F.; BORTOLINI, J.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M.; NAKAZATO, L.; ALMEIDA, A. D. B. P. F. Clinical-dermatological, histological abnormalities and prevalence of *Trypanosoma caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 29, n. 1, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1590/s1984-29612019100.

MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J. A. A Review of Leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**. v. 17, p. 1-12, 2021. DOI: 10.1007/s40475-021-00232-7.

MANN, T. R.; CADORE, G. C.; CAMILLO, G.; VOGEL, F. S.; SCHMIDT, C.; ANDRADE, C. M. Canine cutaneous neosporosis in Brazil. **Veterinary Dermatology**. v. 27, n. 3, p. 195-97, 2016. DOI: 10.1111/vde.12294.

MANTUR B.; AMARNATH, S.; SHINDE, R. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 25, n. 3, p. 188-202, 2007. DOI: 10.4103/0255-0857.34758.

MARTÍNEZ, M. F.; KOWALEWSKI, M. M.; SALOMÓN, O. D.; SCHIJMAN, A. G. Molecular characterization of trypanosomatid infections in wild howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 5, n. 2, p. 198-206, 2016. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2016.05.001.

MASLOV, D. A.; OPPERDOES, F. R.; KOSTYGOV, A. Y.; HASHIMI, H.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**. v. 146, n. 1, p. 1-27, 2019. DOI: 10.1017/S0031182018000951.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of Kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001. DOI: 10.1590/S0074-02762001000300021.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**. v. 199, n. 3, p. 237-246, 1999. DOI: 10.1017/s0031182099004710.

McALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 443-463, 2016. DOI: 10.1016/j.cvfa.2016.01.012.

MEDKOUR, H.; LAIDOUDI, Y.; MARIÉ, J. L.; FENOLLAR, F.; DAVOUST, B.; MEDIANNIKOV, O. Molecular investigation of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Southern France. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 56, n. 4, p. 837-850, 2020. DOI: 10.7589/2019-09-234.

MEJÍA-MENESES, A. J.; PALÁU-CASTAÑO, M. T.; ZÚÑIGA-MARTÍ, C. A. *Trypanosoma rangeli*: lo que se conoce y el impacto de su presencia / *Trypanosoma rangeli*: what we know about it and the impact of it's appearance. **MedUNAB**. v.7, n. 21, p. 166-171, 2005.

MESTRE, G. L.; RIBEIRO, A. L.; MIYAZAKI, R. D.; RODRIGUES, J. S.; DE ALMEIDA, A.; SOUSA, V. R.; MISSAWA, N. A. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human Visceral Leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 20, n. 3, p. 228-234, 2011. DOI: 10.1590/S1984-29612011000300010.

MICHELS, P. A. M.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HENNAERT, V. Metabolic functions of glycosomes in Trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research**. v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.019.

MINERVINO, A. H. H.; CASSINELLI, A. B. M.; DE SOUZA, A. J. S.; ALVES, M. M.; SOARES, M. D. C. P.; FERREIRA, D. A. C.; PEREIRA, W. L. A.; GENNARI, S. M. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in Cativeiro non-human primates in the Amazon region, Brazil. **Journal of Medical Primatology**. v. 46, n. 6, p. 343-346, 2017. DOI: 10.1111/jmp.12314.

MIRÓ, G.; TROYANO, A.; MONTOYA, A.; FARIÑAS, F.; FERMÍN, M. L.; FLORES, L.; ROJO, C.; CHECA, R.; GÁLVEZ, R.; MARINO, V.; FRAGÍO, C.; MARTÍNEZ-NEVADO, E. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. **Parasites & Vectors**. v. 11, n. 185, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2772-1.

MONNEY, T.; HEMPHILL, A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? **Experimental Parasitology**. v. 140, p. 52-70, 2014. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.02.015.

MORAES, M. H.; GUARNERI, A. A.; GIRARDI, F. P.; RODRIGUES, J. B.; EGER, I.; TYLER, K. M.; STEINDEL, M. GRISARD, E. C. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi* infected patients sera. **Parasites & Vectors**. v. 1, n. 20, p. 1-10, 2008. DOI: 10.1186/1756-3305-1-20.

MORAIS, M. C.; SOUZA, J. V.; DA SILVA, M. B. F. C.; DOLABELLA, S. S.; SOUSA, D. P. Trypanocidal essential oils: A Review. **Molecules**. v. 25, n. 19, p. 1-19, 2020. DOI: 10.3390/molecules25194568.

MOREIRA, M. L. Duração da imunidade vacinal na leishmaniose visceral canina: Perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica anti-Leishmania chagasi. Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado) - **Centro de Pesquisas René Rachou**. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, 2013.

MORGADO, T. O.; KAGUEYAMA, F. C.; ROSA, J. M. A.; BELIZÁRIO, M. D.; PACHECO, R. C.; DUTRA, V.; CORRÊA, S. H. R.; PAZ, R. C. R. Detection of *Toxoplasma gondii* in a Vida livregiant anteater. **Ciência Rural**. v. 47, n. 8, p. 1-4, 2017. DOI: 10.1590/0103-8478cr20161127.

OLIVEIRA, A. R., PINHEIRO, G. R. G.; TINOCO, H. P.; LOYOLA, M. E.; COELHO, C. M.; DIAS, E. S.; MONTEIRO, E. M.; DE OLIVEIRA, L. E. S. F.; PESSANHA, A. T.; SOUZA, A. G. M.; PEREIRA, N. C. L.; GONTIJO, N. F.; FUJIWARA, R. T.; ALVES DA PAIXÃO, T.; SANTOS, R. L. Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 13, n. 4, p. 1-14, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007313.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.2.293-305.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in Leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 9, n. 10, p. 925-932, 2016. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.06.021.

PAIZ, L. M.; MOTOIE, G.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H.; MENOZZI, B. D.; TOLEZANO, J. E.; DONALISIO, M. R. Antibodies and molecular detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in samples of Vida livremarmosets (Primates: *Callitrichidae*: *Callithrix* spp.) in an area of Canine Visceral Leishmaniasis in Southeastern Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v. 19, n. 4, p. 249-254, 2019. DOI:10.1089/vbz.2018.2348.

PAULIN, L. M. S.; FERREIRA, N. J. S. Brucelose em búfalos. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**. v. 75, n. 3, p. 389-401, 2008.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of Leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**. v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013. DOI: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.

- PRINA, E.; JOUANNE, C.; DE SOUZA, L. S.; SZABO, A.; GUILLET, J. G.; ANTOINE, J. C. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Journal of Immunology**. v. 15, n. 151, p. 2050-2061, 1993.
- QUINTAL, A. P.; RIBEIRO, E. D. E. S.; RODRIGUES, F. P.; ROCHA, F. S.; FLOETER-WINTER, L. M.; NUNES, C. M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 10, n. 176, p. 112-119, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.11.011.
- RAJEEV, S.; BOLFA, P.; SHIOKAWA, K.; BEIERSCHMITT, A.; PALMOUR, R. *Leptospira* infection in African Green Monkeys in an endemic area: An opportunity for comparative studies in a natural environment. **Pathogens**. v. 16, n. 9, p. 474-483, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9060474.
- RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas Disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**. v. 83, n. 3, p. 189-198, 2002. DOI: 10.1016/s0001-706x(02)00185-7.
- REEDER, D. M.; WILSON, D. E. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. 3ed. **Johns Hopkins University Press**. Baltimore, Maryland. 2142p., 2005.
- RODRIGUES, J. Y.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BOA SORTE, E. C.; GASPARETTO, N. D.; CRUZ, F. A. C. S.; SOUSA, V. R. F. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs of riverside communities of Mato Grosso Pantanal, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 25, n. 4, p. 531-535, 2016. DOI: 10.1590/s1984-29612016067.7.
- ROSA, J. M. A.; ALMEIDA, A. B. P. F.; CARVALHO, T. R. C.; BRANDÃO, L. N. S.; SOUSA, V. R. F.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L. Diagnóstico molecular da Leishmaniose Visceral Canina através da técnica de sonda de nanopartículas de ouro (AuNPprobes). **Semina: Ciências Agrárias**. v. 34, n. 2, p. 3777-3785, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3777.
- SALZO, P. S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico, São Paulo**. n. 63, p. 30-34, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 2001.
- SAMROT, A. V.; SEAN, T. C.; BHAVYA, K. S.; SAHITHYA, C. S.; CHANDRASEKARAN, S.; PALANISAMY, R.; ROBINSON, E. R.; SUBBIAH, S. K.; MOK, P. L. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis - A review. **Pathogens**. v. 10, n. 2, p. 145-175, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10020145.
- SANTANA, C. H.; DE OLIVEIRA, A. R.; DOS SANTOS, D. O.; PIMENTEL, S. P.; DE SOUZA, L. D. R.; MOREIRA, L. G. A.; BRAZ, H. M. B.; DE CARVALHO, T. P.;



LOPES, C. E. B.; OLIVEIRA, J. B. S.; DE PAULA, N. F.; DE CARVALHO, M. P. N.; ALVES, B. F.; PENA, H. F. J.; SANTOS, R. L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a lethal toxoplasmosis outbreak affecting Cativeiro howler monkeys (*Alouatta* sp.).

**Journal of Medical Primatology**. v. 50, n. 2, p. 99-107, 2020. DOI: 10.1111/jmp.12506.

SATO, H.; LEO, N.; KATAKAI, Y.; TAKANO, J.; AKARI, H.; NAKAMURA, S.; UNE, Y. Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *minasense* in the peripheral blood of small neotropical primates after a quarantine period. **Journal of Parasitology**. v. 94, n. 5, p. 1128-1138, 2008. DOI: 10.1645/GE-1513.1.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E.; WHATMORE, A. M.; QUANCE, C. R.; KOYLASS, M. S.; CUMMINS, L. B.; DICK, E. J.; SNIDER, C. L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLEM J. L. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. **Journal of Medical Primatology**. v. 38, p. 70–73, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2008.00314.x.

SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. The systematics and evolution of New World primates - A review. **Molecular phylogenetics and evolution**. v. 82, p. 348–357, 2015. DOI: 10.1016/j.ympev.2013.10.017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous Leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**. v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.72.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. **Veterinary Microbiology**. v. 129 n. 1, p. 1-14, 2008. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.11.023.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**. v. 140, n. 3, p. 392-398, 2010. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.06.021.

SEUÁNEZ, H. N.; BONVICINO, C. R.; MOREIRA, M. A. (2005). The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes. **Cytogenetic and genome research**. v.108, p. 38–46, 2005. DOI: 10.1159/000080800.

SILVA, C. P. A.; ALMEIDA, A. B. P. F.; GODOY, I.; ARAÚJO, A. C. P.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Detecção molecular de *Brucella canis* em cães do Município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**. v. 42, n. 6, p. 1051-1056, 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012005000032.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* e *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**. v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C. E. P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 2, p. 143-147, 2010. DOI: 10.5123/S2176-62232010000200018.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**. v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2006.02.006.

SOLER-LLORÉNS, P. F.; QUANCE, C. R.; LAWHON, S. D.; STUBER, T. P.; EDWARDS, J. F.; FICHT, T. A.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; O'CALLAGHAN, D.; KERIEL, A. A *Brucella* spp. isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical Brucellae. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 28, n. 6, p. 1-16, 2016. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00116.

SOLÓRZANO-GARCÍA, B.; LEÓN, P. P. G. Parasites of Neotropical Primates: A Review. **International Journal of Primatology**. v. 39, p. 155–182, 2018. DOI: 10.1007/s10764-018-0031-0.

SOUSA, O. E.; DAWSON, G. A. Trypanosome infections in the marmoset (*Saguinus geoffroyi*) from the Panama Canal Zone. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 25, n. 3, p. 407-409, 1976. DOI: 10.4269/ajtmh.1976.25.407.

SOUZA, W.; BELFORT, J.; R. Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Editora: **Fiocruz**, 214p, 2014. DOI: 10.7476/9788575415719.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. **Advances in Parasitology**. v. 48, p. 143-150, 2001. DOI: 10.1016/s0065-308x(01)48003-1.

SU, C.; DUBEY, J. P. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. **Methods in Molecular Biology**. v. 2071, p. 49-80, 2020. DOI: 10.1007/978-1-4939-9857-9\_3.

SUN, A. H.; LIU, X. X.; YAN, J. Leptospirosis is an invasive infectious and systemic inflammatory disease. **Biomedical Journal**. v. 43, n. 1, p. 24-31, 2020. DOI: 10.1016/j.bj.2019.12.002.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0404206101.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA P. F.; DE SOUZA, W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathogens**. v. 9, n. 10, p. 1-4, 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003594.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**. v. 30, n. 12, p. 1217-1258, 2000. DOI: 10.1016/s0020-7519(00)00124-7.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**. v. 26, n. 6, p. 1-15, 2017. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1.

TSOKANA, C. N.; SOKOS, C.; GIANNAKOPOULOS, A.; BIRTSAS, P.; VALIAKOS, G.; SPYROU, V.; ATHANASIOU, L. V.; RODI BURRIEL, A.; BILLINIS, C. European Brown hare (*Lepus europaeus*) as a source of emerging and re-emerging pathogens of Public Health importance: A review. **Veterinary Medicine and Science**. v. 6, n. 3, p. 550-564, 2020. DOI: 10.1002/vms3.248.

VILLATE, S. C. A.; CASALLAS, J. C. G. Update of antibiotic therapy of brucellosis. **New insight into *Brucella* infection and foodborne diseases**. p. 1-23. 2020. DOI: 10.5772/intechopen.86324.

VIOTI, G.; LEONEL, J. A. F.; LEMES, K. M.; PEREIRA, V.; FERREIRA, H. L.; KEID, L. B.; MADUREIRA, E. H.; SOARES, R. M.; BENASSI, J. C.; OLIVEIRA, T. M. F. S. Molecular detection of *Leishmania* spp. in cattle from Brazil by means of PCR using internal transcribed spacer 1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 28, n. 2, p. 303-305, 2019. DOI: 10.1590/S1984-29612019003.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). **Theriogenology**. v. 66, n. 6, p. 1573-1578, 2006. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.034.

WHATMORE, A. M.; DAVISON, N.; CLOECKAERT, A. A. L.; DAHOUK, S.; ZYGMUNT, M. S.; BREW, S. D.; PERRETT, L. L.; KOYLASS, M. S.; VERGNAUD, G.; QUANCE, C.; SCHOLZ, H. C.; DICK, E. J.; HUBBARD, G.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N. E. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, p. 4120-4128, 2014. DOI: 10.1099/ij.s.0.065482-0.

WOLFE, N. D.; ESCALANTE, A. A.; KARESH, W. B.; KILBOURN, A.; SPIELMAN, A.; LAL, A. A. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. **Emerging Infectious Diseases**. v.4, n. 2, p. 149-158, 1998. DOI: 10.3201/eid0402.980202

WOOLF, D.; SANCHEZ, C.; GONZALEZ-ASTUDILLO, V.; NAVARRO, M.; TAPIA, C. C.; FRANCO, M.; BUSTAMANTE, J. A.; ASTUDILLO, M.; MUKHERJEE, J. *Leptospira* species status of cative nonhuman primates and Vida liverodents at the Barranquilla Zoo, Colombia, 2013. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 51, n. 4, p. 780-788, 2021. DOI: 10.1638/2019-0192.

WU, X.; GAO, D.; SONG, Z.; WU, J. Modelling triatomine bug population and *Trypanosoma rangeli* transmission dynamics: Co-feeding, pathogenic effect and linkage with chagas disease. **Mathematical Biosciences**. v. 324, 2020. DOI: 10.1016/j.mbs.2020.108326.

XIN, S.; JIANG, N.; YANG, L.; ZHU, N.; HUANG, W.; LI, J.; ZHANG, L.; SU, C.; YANG, Y. Isolation, genotyping, and virulence determination of a *Toxoplasma gondii* strain from non-human primate from China. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2021. DOI: 10.1111/tbed.14047.

YIMAM, Y.; MOHEBALI, M. Effectiveness of insecticide-impregnated dog collars in reducing incidence rate of Canine Visceral Leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. v. 15, n. 9, p. 1-15, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0238601.

ZICCARDI, M.; OLIVEIRA, L. R. Polymorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in the blood of experimentally infected squirrel monkey and marmosets. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 5, p. 649-653, 1999. DOI: 10.1590/s0074-02761999000500016.

ZICCARDI, M.; OLIVEIRA, L. R.; NOGUEIRA, R. The haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 91, n. 4, p. 501-505, 1996. DOI: 10.1590/S0074-02761996000400019.

ZICCARDI, M.; OLIVEIRA, L. R. The infection rates of Trypanosomes in squirrel monkeys at two sites in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, n. 4, p. 465-470, 1997. DOI: 10.1590/S0074-02761997000400003.

## APÊNDICE

### Apêndice A – Tabela geral dos resultados obtidos

**Tabela:** Dados epidemiológicos dos animais testados e seus respectivos resultados. F = Fêmea, M = Macho, + (Positivo), - (Negativo).

| Identificação | Hospedeiro             | Habitat    | Sexo | Cidade                   | <i>Leishmania</i><br><i>spp.</i> | <i>Trypanosoma</i><br><i>spp.</i> | <i>Toxoplasma</i><br><i>gondii</i> | <i>Neospora</i><br><i>caninum</i> | <i>Brucella</i><br><i>spp.</i> | <i>Leptospira</i><br><i>spp.</i> |
|---------------|------------------------|------------|------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| M1328/17      | <i>Alouatta caraya</i> | Vida livre | M    | Cuiabá                   | -                                | -                                 | -                                  | -                                 | +                              | -                                |
| M742/18       | <i>Alouatta caraya</i> | Cativeiro  | M    | Várzea Grande            | -                                | -                                 | -                                  | -                                 | -                              | -                                |
| M603/19       | <i>Alouatta caraya</i> | Cativeiro  | F    | Cuiabá                   | -                                | -                                 | -                                  | +                                 | +                              | -                                |
| M81/18        | <i>Aotus azarae</i>    | Vida livre | M    | Cuiabá                   | -                                | -                                 | -                                  | +                                 | -                              | -                                |
| M133/18       | <i>Aotus azarae</i>    | Vida livre | F    | Chapada dos<br>Guimarães | -                                | -                                 | -                                  | -                                 | -                              | -                                |
| M1022/18      | <i>Aotus azarae</i>    | Vida livre | F    | Cuiabá                   | <i>L. infantum</i>               | -                                 | +                                  | +                                 | -                              | -                                |
| M1176/18      | <i>Aotus azarae</i>    | Vida livre | F    | Cuiabá                   | <i>L. infantum</i>               | -                                 | -                                  | -                                 | -                              | -                                |
| M1176/19      | <i>Aotus azarae</i>    | Vida livre | F    | Cuiabá                   | <i>L. infantum</i>               | -                                 | +                                  | -                                 | -                              | -                                |
| M64/18        | <i>Aotus infulatus</i> | Vida livre | M    | Cuiabá                   | -                                | -                                 | -                                  | -                                 | -                              | -                                |
| M522/19       | <i>Aotus infulatus</i> | Vida livre | F    | Cuiabá                   | -                                | -                                 | -                                  | +                                 | +                              | -                                |
| M726/19       | <i>Aotus infulatus</i> | Vida livre | M    | Cuiabá                   | -                                | -                                 | -                                  | +                                 | -                              | -                                |

|                 |                          |            |   |               |                       |                   |   |   |   |   |
|-----------------|--------------------------|------------|---|---------------|-----------------------|-------------------|---|---|---|---|
| <b>M1638/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Cativeiro  | F | Cuiabá        | -                     | -                 | - | + | + | - |
| <b>M1639/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Cativeiro  | F | Cuiabá        | -                     | -                 | - | - | + | - |
| <b>M1640/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Cativeiro  | F | Cuiabá        | -                     | -                 | - | - | - | - |
| <b>M1641/19</b> | <i>Ateles marginatus</i> | Cativeiro  | F | Cuiabá        | -                     | -                 | - | + | - | - |
| <b>M1339/17</b> | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | F | Cuiabá        | -                     | -                 | - | - | - | - |
| <b>M2043/17</b> | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | M | Cuiabá        | -                     | -                 | + | + | - | - |
| <b>M35/18</b>   | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | M | Cuiabá        | -                     | -                 | - | - | - | - |
| <b>M180/18</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | M | Cuiabá        | -                     | -                 | - | - | - | - |
| <b>M204/18</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | F | Cuiabá        | -                     | -                 | - | - | - | - |
| <b>M225/18</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | M | Cuiabá        | -                     | <i>T. rangeli</i> | + | - | - | - |
| <b>M897/18</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | M | Diamantino    | -                     | -                 | - | - | - | - |
| <b>M970/18</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | M | Cuiabá        | <i>L. amazonensis</i> | -                 | + | - | - | - |
| <b>M627/19</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | F | Cuiabá        | <i>L. infantum</i>    | -                 | - | - | + | - |
| <b>M790/19</b>  | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | F | Várzea Grande | <i>L. infantum</i>    | -                 | - | - | - | - |
| <b>M1460/19</b> | <i>Mico melanurus</i>    | Vida livre | F | Cuiabá        | <i>L. infantum</i>    | -                 | - | - | - | - |

|                 |                       |              |   |                  |                       |                     |   |   |   |   |
|-----------------|-----------------------|--------------|---|------------------|-----------------------|---------------------|---|---|---|---|
| <b>M05/17</b>   | <i>Sapajus apella</i> | Cativeiro    | F | Cuiabá           | -                     | -                   | + | - | + | - |
| <b>M08/17</b>   | <i>Sapajus apella</i> | Cativeiro    | F | Cuiabá           | -                     | -                   | + | + | + | - |
| <b>M530/17</b>  | <i>Sapajus apella</i> | Vida livre   | M | Cuiabá           | -                     | -                   | + | - | + | - |
| <b>M1247/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Cativeiro    | M | Várzea Grande    | -                     | -                   | - | - | - | - |
| <b>M1249/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Cativeiro    | F | Várzea Grande    | -                     | -                   | - | - | + | - |
| <b>M1313/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Vida livre   | M | Cuiabá           | -                     | -                   | - | + | - | - |
| <b>M1338/17</b> | <i>Sapajus apella</i> | Free-ranging | F | Cuiabá           | -                     | <i>T. minasense</i> | + | - | - | - |
| <b>M656/18</b>  | <i>Sapajus apella</i> | Free-ranging | F | Cuiabá           | <i>L. amazonensis</i> | -                   | - | - | - | - |
| <b>M1057/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Vida livre   | M | Nobres           | -                     | -                   | + | - | + | - |
| <b>M1098/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Cativeiro    | F | Tangará da Serra | -                     | -                   | - | - | + | - |
| <b>M1106/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Cativeiro    | F | Cuiabá           | -                     | -                   | + | - | + | - |
| <b>M1241/18</b> | <i>Sapajus apella</i> | Vida livre   | M | Poconé           | <i>L. infantum</i>    | -                   | - | - | - | - |

---

## ANEXOS

## Anexo A – Certificado do Comitê de Ética – UFMT



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.015878/2019-65 sobre “Pesquisa de agentes infecciosos em animais silvestres e artrópodes ectoparasitas (carrapatos e pulgas) do Estado de Mato Grosso”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Richard de Campos Pacheco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 29 de abril de 2019.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol 23108.015878/2019-65, entitled “Survey of infectious agents in wild animals and ectoparasite arthropods (ticks and fleas) from the State of Mato Grosso”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on April, 2019.

Numero de animais experimentados: 0

Number of experimented animals: 0

Cuiabá-MT, 29 de abril de 2019.

  
Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar  
Presidente

  
Prof. Dra. Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida  
Vice-Presidente



## Anexo B – Classificação dos Periódicos

### Artigo 1 – Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Qualis Periódicos

\* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIODICOS QUADRIENIO 2013-2016

Área de Avaliação:

☒ MEDICINA VETERINARIA

ISSN:

☐

Título:

☒ Revista brasileira de parasitologia veterinária

Classificação:

☐ -- SELECIONE --

Consultar Cancelar

Periódicos

| ISSN      | Título                                                     | Área de Avaliação    | Classificação |
|-----------|------------------------------------------------------------|----------------------|---------------|
| 0103-846X | REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA (IMPRESSO) | MEDICINA VETERINÁRIA | A2            |
| 1984-2961 | REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA (ONLINE)   | MEDICINA VETERINÁRIA | A2            |

### Artigo 2 – Journal of Medical Primatology

Qualis Periódicos

\* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIODICOS QUADRIENIO 2013-2016

Área de Avaliação:

☒ MEDICINA VETERINARIA

ISSN:

☐

Título:

☒ Journal of medical primatology

Classificação:

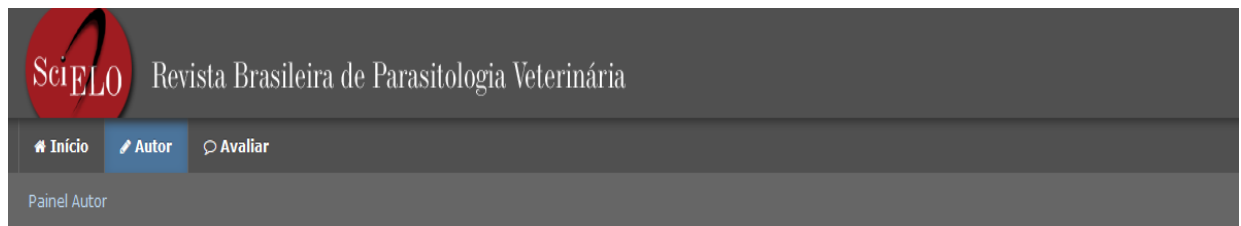
☐ -- SELECIONE --

Consultar Cancelar

Periódicos

| ISSN      | Título                         | Área de Avaliação    | Classificação |
|-----------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 0047-2565 | JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY | MEDICINA VETERINÁRIA | B1            |

## Anexo C - Confirmação de submissão do artigo 1 (Aceito para publicação)



**Painel Autor**

24 Manuscritos com decisões >

11 Manuscritos dos quais sou coautor >

[Iniciar nova Submissão](#) >

[Instruções herdadas](#) >

[5 e-mails mais recentes](#) >

### Manuscritos com decisões

Itens por página: 10 1 - 10 de 24

| AÇÃO                                                                                                                                 | STATUS                  | ID                | TÍTULO                                                                                                      | SUBMETIDO   | COM DECISÃO |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
|                                                                                                                                      | ADM: Machado, Rosangela | RBPV-2021-0013.R2 | Molecular detection of trypanosomatids in neotropical primates in the state of Mato Grosso, Midwest, Brazil | 01-abr-2021 | 05-abr-2021 |
|                                                                                                                                      | • Aceitar (05-abr-2021) |                   |                                                                                                             |             |             |
| <a href="#">visualizar carta de decisão</a><br><input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Entrar em contato com o periódico</a> |                         |                   |                                                                                                             |             |             |

## Anexo D - Confirmação de submissão do artigo 2

### My Submissions

All Journals

Journal of Medical Primatology  
Original Article

### Molecular detection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in neotropical primates

**Submission Status** Submitted

**Submitted On** 3 December 2021 by Stefhano Candido

**Submission Started** 3 December 2021 by Stefhano Candido

This submission has been sent to the editorial office and cannot be edited. Further instructions will be emailed to you from Manuscript Central.

[View Submission Overview](#)