

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Toxoplasma*
***gondii* EM PRIMATAS NÃO HUMANOS EM PARQUE**
ZOOLÓGICO

DANIELA BARBOSA DA SILVA

BOTUCATU-SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE *Toxoplasma*
***gondii* EM PRIMATAS NÃO HUMANOS EM PARQUE**
ZOOLÓGICO

DANIELA BARBOSA DA SILVA

Dissertação apresentada junto ao
programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Profa.Dra. Simone Baldini Lucheis

BOTUCATU-SP

2016

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRE 8/7500

Silva, Daniela Barbosa da.

Diagnóstico sorológico e molecular de *toxoplasma gondii*
em primatas não humanos em Parque Zoológico / Daniela Barbosa
da Silva. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Capes: 50502000

1. Toxoplasmose em animais. 2. Toxoplasmose - Diagnóstico.
3. Zoonoses. 4. Primatas. 5. Animais de zoológico. 6.
Diagnóstico molecular.

Palavras-chave: Toxoplasmose; diagnóstico; primatas de
cativeiro; zoonose.

Nome do autor: Daniela Barbosa da Silva

Título: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE
Toxoplasma gondii EM PRIMATAS NÃO HUMANOS EM PARQUE
ZOOLOGICO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

APTA – Centro-Oeste – Bauru

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani

Membro

Departamentode Apoio, Produção e Saúde Animal

FMVA – UNESP – Araçatuba

Data da defesa: 13/05/2016

DEDICATORIA

À Dona Tereza: Minha mãe, meu exemplo de ser humano, que me ensinou na prática da vida que instrução não tem nada a ver com sabedoria. Te Amo.

AGRADECIMIENTOS

À Deus: “Porque é o Senhor, é quem dá a sabedoria, e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência.” Provérbios 2:6

À Minha Família: Meus irmãos que mesmo sem saber, me ensinaram que cada queda serve para saber a se levantar mais rápido e forte.

Aos meus amigos de infância: Vanessa, Rubinho, Tereza, Diogo, Douglas, Rafael, Priscila, Rafael G., Giovanca, Fabiana, Natália, Camila e todos os outros que há 30 anos assumimos o compromisso de sempre cuidar uns dos outros.

À XIV Turma de Medicina Veterinária UENP: Família que escolhi para dividir minhas vitórias e fracassos.

Aos meus amigos da Patologia: Que sempre compreenderam minhas ausências. Em especial ao Marcos Franchi.

Ao LASAB: À todos que nele trabalham Maria Fernanda, Miriam, Lívia, Gabriela, Wesley, Fábio e Amanda que mais que amigos, somos companheiros.

Aos meus amigos Residentes: Mariana, Gisele, Sâmea, Noeli, Giulia e outros que há por vir... Em especial a Carolina (MI), por ter sido minha sanidade, quando necessitei de paz.

Aos Funcionários: Adriana Pavan (uma princesa, que me ensina a cada dia que um bom sorriso muda o cotidiano de todos), Seu Roberto e Adilson (Pardal) por sempre se mostrarem prestativos a tudo e a todo o momento, Wanderley sempre pronto a ajudar, enfim a todos que tive o prazer de conhecer no DHVSP.

Aos Professores: José Carlos Paes, Jane, Pantoja, Cassiano pelos conhecimentos adquiridos com todos.

Em especial ao professor Helio Langoni, que faz jus ao título de professor, pois ama incondicionalmente “ensinar”, raridade atualmente, que faz nos espelhar nessa gana de passar adiante o conhecimento. Obrigada pelo aprendizado, na residência e por me ensinar a erguer a cabeça durante as dificuldades.

A minha Banca: Professor Márcio Garcia Ribeiro, que me deu o privilégio de suas sugestões em meu trabalho, escolhido pela dedicação notável em ajudar a melhorarmos sempre.

Professora Kátia Denise Saraiva Bresciani, pelo privilégio em aceitar meu convite.

À Lucilene Camossi, em quem me espelhei desde meu estágio e vou continuar me espelhando até ...

À Minha Orientadora: Simone Baldini Lucheis, pela oportunidade em aprender cada vez mais, pela paciência, caronas e conversas, pelo auxílio indispensável.

Enfim, à todos que de alguma forma me ajudaram a chegar aqui.

**“ Há homens que lutam um dia e são bons,
há outros que lutam um ano e são melhores,
há os que lutam muitos anos e são muito bons,
mas há os que lutam a vida toda.
Estes são imprescindíveis”.**
(Bertold Brecht)

LISTA DE
ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CEASA	Centrais Estaduais de Abastecimento
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRMV	Conselho Regional de Medicina Veterinária
DNTP's	Dexorribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
g	aceleração de gravidade (9,8m/s ²)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KCl	Cloreto de potássio
MAD	Modified Agglutination Direct
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mili-Q	Água deionizada, ultrapura fornecida pela Milipore Corporation®
MMA	Ministério do Meio Ambiente
nDNA	DNA nuclear
OR	Odds ratio
pb	pares de bases

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAA	Secretaria da Agricultura e Abastecimento
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SMA	Secretaria do Meio Ambiente
SST	Solução Salina Tamponada
Taq-polimerase	polimerase termoestável
TBE	Tris Borato EDTA
TG	Tumores de Tireóide (Sarcoma epitelióide)
“V”	Exemplificação da placa utilizada com fundo em ponta

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus centígrados
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
M	molar
pm	peso molar
U	unidade
≤	menor ou igual que
>	maior que
μL	microlitro
%	porcentagem
2-ME	2-mercaptoetanol

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Categorias, ordens, nome científico, nome popular e número de amostras coletadas para pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i> em primatas não humanos pertencentes ao Zoológico Municipal de Bauru, SP. Botucatu, SP, 2016.....	21
---	----

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise univariada de fatores de risco para a soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, em primatas não humanos do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. Botucatu, SP, 2016 32
- Tabela 2.** Soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e análise univariada pelas técnicas de MAD e RIFI em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. Botucatu, SP, 2016..... 33

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de localização dos primatas africanos do Novo e Velho Mundo no Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP 20
- Figura 2.** Frutas fornecidas pelo Zoológico aos animais (A). Areia recolocada nos recintos dos primatas africanos do Velho Mundo, locados no Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. (B). 22
- Figura 3.** Técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAD), para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG, em amostras de soro de primatas não humanos. Reação positiva (A) e negativa (B)..... 27
- Figura 4.** Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG, em amostras de soro de primatas não humanos. Reação positiva (A) e negativa (B) 28

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Página

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Mecanismos de transmissão	4
2.2. Toxoplasmose em humanos	5
2.2.1. Imunocompetentes.....	6
2.2.2. Imunodeficientes	7
2.2.3. Toxoplasmose congênita	8
2.3. Toxoplasmose em animais.....	9
2.3.1. Animais domésticos	9
2.3.2. Animais silvestres	10
2.3.3. Primatas.....	12
2.3.4. Primatas do Velho Mundo e Neotropicais	12
2.4. Animais de zoológico.....	13
2.5. Avaliação Diagnóstica	15
3. JUSTIFICATIVA	17
4. OBJETIVOS	19
4.1. Geral.....	19
4.2. Específicos	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Animais e local de estudo	20
5.2. Autorização do Zoológico Municipal de Bauru, SP	22
5.3. Autorização para Realização da Pesquisa com animais silvestres - SISBIO.....	23

5.4. Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FMVZ – UNESP, Botucatu, SP.....	23
5.5. Coleta de sangue.....	23
5.6. Local de realização dos exames.....	23
5.7. Produção de antígeno.....	24
5.7.1. Preparação de antígeno inativado pela formalina (MAD).....	24
5.7.2. Inativação e sensibilização de lâminas para a Reação de Imunofluorescência Indireta – (RIFI)	25
5.8. Testes sorológicos	25
5.8.1. Aglutinação Direta Modificada	26
5.8.2. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	27
6. EXAMES MOLECULARES	28
6.1. Extração do DNA para pesquisa de <i>Toxoplasma gondii</i>	28
6.2. Reação em Cadeia da Polimerase para <i>Toxoplasma gondii</i>	29
6.3. Controles.....	29
6.4. Eletroforese em gel de agarose	29
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1. Provas sorológicas.....	31
8.1.1. Aglutinação Direta Modificada e Reação de Imunofluorescência Indireta	31
8.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para <i>Toxoplasma gondii</i>	34
9. DISCUSSÃO.....	35
10. CONCLUSÃO	40
11. REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

DA SILVA, D.B. **Diagnóstico sorológico e molecular de *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos em Parque Zoológico**. Botucatu, 2016. 110p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A participação dos animais selvagens como reservatórios ou portadores de zoonoses na natureza e em cativeiro é uma preocupação emergente devido ao potencial de transmissão de agentes zoonóticos. Dentre os animais de cativeiro estão aqueles alojados em zoológicos, em particular os primatas de diferentes espécies. Este estudo teve como objetivo pesquisar a infecção por *T. gondii* em primatas não humanos em Parque Zoológico Municipal. Anticorpos anti-*T. gondii* foram avaliados pelos métodos sorológicos de Aglutinação Direta Modificada (MAD) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), bem como a técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de sangue de 43 primatas africanos, pertencentes às categorias do Velho Mundo e Novo Mundo (Neotropicais). Dos animais estudados, 16/43 (37,2%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* à técnica de MAD e 10/43 (23,3%) à técnica de RIFI. À prova de PCR todas as amostras foram negativas. Nenhuma diferença significativa ($P < 0,001$) foi observada com relação às variáveis sexo, idade e às categorias Velho Mundo e Neotropicais. Os resultados demonstraram alta prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas de Parque Zoológico, necessitando-se, portanto de um monitoramento constante para a infecção, pela realização periódica de testes sorológicos, bem como os cuidados relacionados aos fatores de risco, como a procedência da areia utilizada nos recintos e dos alimentos oferecidos aos animais, bem como, a higienização adequada das frutas e verduras fornecidas aos animais. Assim, a toxoplasmose deve ser monitorada em ambientes de zoológicos, principalmente pela orientação de seus funcionários e tratadores, pela modificação de hábitos no manejo sanitário dos animais, como forma de prevenção da infecção para os funcionários bem como para o público visitante.

Palavras chaves: toxoplasmose, diagnóstico, zoonose, primatas de cativeiro

ABSTRACT

DA SILVA, D.B. **Serological and Molecular Diagnosis of *Toxoplasma gondii* in non-human primates at Zoo.** Botucatu, SP, 2016. 110p. Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The participation of wildlife as reservoirs or carriers of zoonoses in the wild and in captivity is an emerging concern because of the potential transmission of zoonotic agents. Among the captive animals housed in zoos, there are particularly primates of different species. This study aimed to investigate the *T. gondii* infection in non-human primates from Municipal Zoological Park. IgG anti-*T. gondii* antibodies were evaluated by the serological methods Modified Agglutination Test (MAT) and Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), and the molecular technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) in 43 blood samples of African primates, belonging to the categories of the Old World and New World (Neotropical). Among the 43 samples analyzed, 16 (37.2%) were reactive to IgG anti-*T. gondii* antibodies, according to the IFAT assay and 10 (23.3%) were reactive to the MAT assay. All samples were negative to PCR test. Risk factors analyses showed that no significant difference ($P < 0.001$) was observed related to gender, age and Old World and Neotropical categories. The results showed a high prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in primates from Municipal Zoo Park, aiming therefore a constant monitoring for infection by periodic serological tests, as well as care related to risk factors, such as the origin of the sand used in the enclosures and the food offered to the animals, as well the proper cleaning of fruits and vegetables supplied to them. Thus, toxoplasmosis should be monitored in zoos environments, especially for the guidance of its employees and attendants by modifying handling sanitary habits of animals as a way to prevent infection for employees as well as the visiting public.

Key-words: toxoplasmosis, diagnosis, zoonosis, captive primate

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é um dos patógenos mais bem sucedidos tanto em número de hospedeiros quanto em porcentagem de animais infectados pelo mundo (SU et al., 2010). Aproximadamente um terço da população mundial encontra-se infectada em fase crônica pela toxoplasmose (PENG et al., 2011). *T. gondii* é conhecido como um dos parasitos mais estudados entre os coccídeos. No entanto, sua importância médica e veterinária faz com que muitos aspectos da biologia e da epidemiologia continuem a serem pesquisados (DUBEY, 2010).

Pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidii e à Sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE, 1988). Dentro do gênero *Toxoplasma*, este protozoário é a única espécie representante. Os primeiros relatos de identificação deste parasito foram realizados em 1908 na Tunísia por Nicolle e Manceaux em roedores silvestres africanos. A espécie foi descrita posteriormente com base na morfologia (Toxo = arco; Plasma = vida) e no hospedeiro em que foi encontrado (*Ctenodactylus gundi*) (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2010).

A toxoplasmose é uma parasitose de alta prevalência com ocorrência mundial, que acomete os animais homeotérmicos, causada por um coccídeo intracelular obrigatório com distribuição cosmopolita (LANGONI et al., 2006; IZASA, 2007; DUBEY, 2010).

Apesar de vários estudos terem sido realizados desde o início do século XX, somente na década de 1960 o ciclo biológico de *T. gondii* foi elucidado. Isto ocorreu após a demonstração de estágios infecciosos do parasito nas fezes de felídeos que possibilitariam a transmissão a outros hospedeiros (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2010). Durante a evolução *T. gondii* desenvolveu ampla variedade de vias de transmissão, tendo como hospedeiros intermediários provavelmente todos os animais homeotérmicos e como hospedeiros definitivos os membros da família Felidae (TENTER et al., 2000).

T. gondii possui três linhagens predominantes, designadas I, II e III. As cepas tipo I ocorrem predominantemente em casos de toxoplasmose aguda,

enquanto que as cepas do tipo II são prevalentes em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) e na toxoplasmose congênita (FUENTES, 2001). As cepas tipo II tem sido identificadas como genótipo prevalente tanto em animais como em humanos (HONORÉ et al., 2000). A cepa tipo III é mais frequente em animais do que humanos (HOWE e SIBLEY, 1995).

Embora seja um parasito com pouca especificidade quanto a hospedeiros, os membros da família Felidae (domésticos e silvestres), são os únicos hospedeiros nos quais se completa o ciclo enteroepitelial (fase sexual) do parasito (DUBEY, 1994).

Em seus hospedeiros intermediários, o parasito passa por duas fases de desenvolvimento assexuado, a de taquizoíto (de multiplicação rápida em diferentes tipos celulares) e a de bradizoíto (de multiplicação lenta, responsável pela formação de cistos teciduais). Nos hospedeiros definitivos ocorre a formação de oocistos que são liberados ainda não esporulados nas fezes (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2004; HILL et al., 2004). A esporulação ocorre no ambiente entre um a cinco dias, dependendo das condições de temperatura e umidade. Oocistos esporulados contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (DUBEY, 2004; HILL et al., 2011).

Camundongos foram utilizados como modelo experimental e observou-se que, após a ingestão de oocistos, os esporozoítos são encistados passando pelos enterócitos e células caliciformes do epitélio intestinal. Desse local, os parasitos podem infectar todos os tipos celulares do hospedeiro, com exceção das hemácias. A multiplicação celular propicia a formação de taquizoítos, as quais multiplicam-se assexuadamente de forma intensa (HILL et al., 2004; DUBEY, 2010).

Infecções com *T. gondii* ocorrem em animais domésticos e silvestres em todo mundo. A toxoplasmose é uma doença zoonótica que abrange muitas espécies de animais, incluindo os primatas não humanos. As alterações dos seus habitats naturais e a maior frequência de pessoas que visitam zoológicos propiciam uma maior proximidade destes com os humanos. Desta forma, esta proximidade tende a afetar a ecologia das doenças, aumentando a possibilidade de transmissão de zoonoses para os humanos e entre este grupo de animais.

Portanto, primatas podem ser considerados animais sentinelas para enfermidades de interesse em saúde pública, como a toxoplasmose (COOK e KARESH, 2008; GILLESPIE e CHAPMAN, 2008; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2013; MOLINA et al., 2014).

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. Mecanismos de transmissão

Todas as formas evolutivas de *T. gondii* são consideradas infectantes, tanto para hospedeiros definitivos, quanto para os intermediários. As formas mais frequentes de transmissão ocorrem por via horizontal ou vertical. Na forma horizontal a infecção ocorre pela via oral, geralmente pela ingestão de oocistos esporulados infectantes que podem estar presentes no ambiente ou pela ingestão de carne crua ou mal cozida que contenha cistos teciduais (bradizoítos). A via vertical ocorre pela transmissão transplacentária de taquizoítos (TENTER et al., 2000).

O risco de transmissão, associado à ingestão de carne, varia entre os diferentes países de acordo com os hábitos alimentares locais e com a prevalência da doença entre os animais criados para consumo. Estudos em populações podem indicar os fatores de risco para a infecção, direcionando para uma possível via de transmissão (COOK et al., 2000).

Milhões de animais no Brasil são destinados à alimentação e são abatidos para o consumo humano por ano. Dentre esses merecem destaque os suínos, uma das fontes mais prováveis de infecção pela ingestão de carne, já que o consumo da carne desta espécie vem aumentado consideravelmente pela população (DUBEY et al., 2012). Outra fonte importante de infecção por cistos teciduais é o consumo da carne de galinhas caipiras. Estes animais servem como indicadores de contaminação do solo por oocistos, e também como fonte de infecção para felídeos e humanos (DUBEY et al., 2003; DUBEY et al., 2004; DUBEY et al., 2010). Estas são frequentemente abatidas de maneira doméstica, sendo que as vísceras, muitas vezes, não são devidamente eliminadas e até consumidas (DUBEY et al., 2012).

A contaminação ambiental por oocistos merece atenção especial na transmissão da toxoplasmose, pois um único felídeo pode liberar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados (DUBEY 2010). Água e o solo contaminados podem servir como veículos de transmissão de oocistos para

frutas e vegetais de consumo, mesmo havendo poucos dados que confirmem esta via de transmissão (REMINGTON, 2011).

A transmissão e difusão do parasito associada à água possuem impacto epidemiológico, já que grande número de pessoas podem se infectar, resultando em surtos da doença (KARANIS et al., 2013). Oocistos podem permanecer viáveis por longos períodos na água, resistindo a diferentes temperaturas. Além disso, não são facilmente destruídos por tratamentos químicos e físicos, como a cloração e tratamento com ozônio (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

A transmissão vertical caracteriza-se pela capacidade dos taquizoítos atravessarem a placenta causando infecção congênita. A transmissão transplacentária tem sido responsabilizada pela ocorrência de debilidade, natimortos, mortalidade neonatal e abortamentos, tanto em humanos como em animais (TENTER et al., 2000). As infecções congênitas são resultantes da primeira infecção materna que ocorre durante a gestação, sendo a placenta responsável por este processo, já que se torna um tecido alvo para a multiplicação do parasito (ABBASI et al., 2003). A barreira placentária é mais eficiente no início da gestação e possibilita a passagem de parasitos em menos de 10% dos casos no primeiro trimestre, tornando-se mais permeável ao longo da gestação, possibilitando a transmissão em cerca de 30% dos casos no segundo trimestre e de 60 a 70% no terceiro (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

Relataram que, embora sejam mais raras, outras vias de transmissão são citadas na literatura, como a transfusão de sangue (MARTINS, 2003; e BIANCHI, 2005). Transplante de órgãos para receptores não infectados e acidentes de laboratório (DUBEY, 2010).

2.2. Toxoplasmose em humanos

25 a 30% da população mundial está infectada por *T. gondii*, embora as prevalências variem muito entre os países e mesmo entre diferentes comunidades de uma mesma região (TENTER et al., 2000; ZHU et al., 2008; DUBEY, 2010).

A sobrevivência dos oocistos pode ser afetada por fatores climáticos e, conseqüentemente, as possibilidades de infecção dos animais consumidos. Outros fatores condicionantes, tais como hábitos culturais, sociais, alimentares e econômicos, bem como a qualidade da água de bebida utilizada para irrigação e o saneamento básico do local devem ser consideradas no contexto epidemiológico da toxoplasmose (SILVEIRA, 2015). As altas prevalências são classicamente observadas em países tropicais com clima úmido e quente, enquanto frequências mais baixas são observadas em países áridos ou muito frios (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

A infecção e a disseminação de patógenos podem ocorrer entre os animais selvagens do próprio zoológico, animais sinantrópicos, funcionários e o público visitante, devendo-se ressaltar, em especial, o risco potencial de exposição em crianças e idosos (SILVA et al., 2007). Neste ambiente, os primatas podem vir a se comportar como hospedeiros e reservatórios de agentes etiológicos de diferentes zoonoses, incluindo a toxoplasmose (DUBEY e BEATTIE, 1988; SILVA et al., 2001; FORSYTH et al, 2012). Portanto, tendo em vista que tratadores e outros funcionários de zoológicos, estão continuamente expostos, bem como ocasionalmente o público visitante, deve-se prevenir e controlar possíveis zoonoses que possam estar sendo veiculadas no local, como a toxoplasmose.

2.2.1. Imunocompetentes

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção primária possui uma fase aguda de curta duração, caracterizada por febre, fraqueza muscular e enfartamento dos linfonodos (SIBLEY ET al., 2009; ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012). Na maioria dos casos, tais infecções permanecem clinicamente não aparentes. No entanto, alguns estudos relataram possível associação entre a soropositividade para toxoplasmose com doenças psiquiátricas atípicas em humanos (SIBLEY et al., 2009). Em geral, a infecção é controlada pelo sistema imune e raramente os pacientes necessitam de tratamento (SIBLEY et al., 2009; ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

Sabe-se que uma grande parte dos pacientes com lesões oculares (toxoplasmose ocular) é resultante de infecções pós-natais adquiridas. O tratamento da toxoplasmose ocular pode ser realizado com corticóides e antibióticos, embora não eliminem a infecção (SIBLEY et al., 2009; GRIGG et al., 2015).

2.2.2. Imunodeficientes

Em indivíduos imunodeficientes, os pacientes estão sujeitos a maior risco de reagudização, seja por reativação pela ruptura de cistos teciduais ou por reinfecções (KHAN et al., 2007; ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012). O encéfalo é o órgão mais comumente atingido nestes pacientes, seguido dos olhos, pulmões e coração. Nas lesões ativas, grande número de taquizoítos são encontrados destruindo o tecido do hospedeiro (DUBEY, 2010).

Em pacientes com Aids, a toxoplasmose pode causar encefalite, pneumonia, retinocoroidite, entre outros (DUBEY, 2010). A manifestação predominante é a encefalite, causando dores principalmente de cabeça, letargia, perda de memória e demência (HILL et al., 2004; KHAN et al., 2007). Após o surgimento da terapia antiretroviral, diminuiu a incidência de encefalite em pacientes com Aids infectados por *T. gondii* (JONES et al., 2010).

Em indivíduos transplantados, a toxoplasmose aguda ou disseminada pode ser resultado tanto da reativação de uma infecção latente, quanto de infecção por cistos presentes no órgão recebido. A toxoplasmose pulmonar ou disseminada ocorre com mais frequência nestes pacientes por desenvolverem rapidamente infecção progressiva, além de massiva disseminação de parasitos (DUBEY, 2010; ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

2.2.3. Toxoplasmose congênita

A toxoplasmose congênita tem sido responsabilizada pela ocorrência de natimortos, debilidade, mortalidade neonatal e abortamentos (SOUZA et al. 2015). Os recém-nascidos podem apresentar sinais clássicos, que são caracterizados por hidrocefalia, microcefalia, calcificações cerebrais e retinocoroidite (TENTER et al., 2000; ZHOU et al., 2011). No feto, a multiplicação do parasito induz focos de necrose e intensa inflamação, levando a grandes alterações, principalmente no cérebro e olhos (DUBEY, 2010).

Em 2007, em um estudo realizado na Europa, foi observada prevalência de toxoplasmose congênita de 3,3 a cada 10.000 nascidos vivos. Dos 272 casos que ocorreram naquele ano, 11 resultaram na interrupção da gravidez devido às lesões cerebrais ou morte fetal e 87% dos nascidos vivos foram assintomáticos (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

Nos EUA, das 25 crianças com a doença que não foram tratadas até o primeiro ano de vida, 72% desenvolveram lesões oculares novas durante um período médio de acompanhamento que variou de 5 a 7 anos (PHAN et al., 2008).

Na China, apesar da maioria dos nascidos vivos não apresentarem anormalidades ao nascimento sem tratamento, muitos indivíduos desenvolvem sinais neurológicos e retinocoroidite ao longo da vida (ZHOU et al., 2011).

No Brasil, em estudo realizado em Minas Gerais entre os anos de 2006 e 2007, observou-se um caso da doença para cada 770 nascidos vivos, sendo que 80% destes desenvolveram lesões oculares em pelo menos um dos olhos, mesmo sendo assintomáticos ao nascimento (VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009).

Na maioria dos casos, o feto é exposto durante o último trimestre de gestação quando os sinais são leves ou a criança é assintomática, já que, neste período, o risco de transmissão é bastante elevado. No entanto, apenas cerca de 10% das crianças nascem com sinais clínicos detectáveis (KAYE, 2011). Por outro lado, quando gestantes se infectam em idades gestacionais prematuras, o

risco de transmissão transplacentária se torna baixo, mas, caso ocorra, as consequências para o desenvolvimento fetal são mais graves, podendo levar a anomalias ou abortamento espontâneo do feto (PINARD et al., 2003; KAYE, 2011).

2.3. Toxoplasmose em animais

A detecção da infecção crônica por *T. gondii* em animais baseia-se principalmente em testes sorológicos. Entretanto, somente os inquéritos sorológicos não fornecem informações sobre a prevalência de parasitos viáveis, uma vez que *T. gondii* já foi isolado a partir de animais soronegativos (ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012).

2.3.1. Animais domésticos

Os gatos são os hospedeiros mais importantes na epidemiologia da toxoplasmose em humanos e outras espécies animais (DUBEY, 2004). Geralmente, os felídeos domésticos possuem menor prevalência em relação aos silvestres por possuírem estilos de vida diferentes, principalmente devido ao hábito de caçar ser mais frequente nos felídeos silvestres (DUBEY, 2010). A soroprevalência também varia de acordo com a idade dos felinos, a dieta, o método de teste sorológico e a localização geográfica (PENA et al., 2008). Sabe-se que a positividade aumenta com a idade, indicando a transmissão pós-natal do protozoário (DUBEY, 2010).

A maioria dos gatos que eliminaram oocistos não excretam repetidamente oocistos após um novo desafio, pois desenvolvem imunidade (PENA et al. 2011). Os bradizoítos são altamente infectantes para gatos, culminando na liberação de milhões de oocistos após a ingestão. Por outro lado, oocistos possuem infectividade baixa para estes animais (DUBEY 2010).

Pinto et al. (2009) analisaram o soro de 245 gatos domiciliados do Rio Grande do Sul, encontrando 37,9% de animais soropositivos por RIFI. Pena et al. (2008) determinaram a prevalência sorológica e parasitológica de *T. gondii* em 237 gatos de 15 municípios de São Paulo. Anticorpos anti-*T. gondii* foram

encontrados em 84 animais (35,4%) pela técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAD). Os autores ressaltaram que estes animais, em algum momento da vida, foram fonte de contaminação ambiental, sendo que o acesso do animal à rua e a idade foram fatores considerados de risco.

Em suínos, pesquisas sorológicas têm relatado uma distribuição mundial de *T. gondii*. A prevalência varia entre os suínos comercializados em supermercados criados em sistemas de confinamento e os porcos de criações “caipiras” ou não tecnificadas (DUBEY, 2010).

A prevalência de anticorpos para *T. gondii* entre ovinos é geralmente maior que em outros herbívoros domésticos. Esta diferença deve estar relacionada à susceptibilidade das diferentes espécies à infecção (DUBEY, 2010). Nestes animais, a infecção não só resulta em significantes perdas econômicas, mas também tem implicações para saúde pública por constituírem uma fonte de infecção para os humanos (TENTER et al., 2000).

Em galinhas, prevalências sorológicas utilizando a técnica de MAD mostraram resultados variando entre 2 e 100% ao redor do mundo (DUBEY, 2010). Há basicamente dois métodos de criação de galinhas, o chamado “free-range” (galinhas de fundo de quintal) e o de criação em gaiolas ou galpões (galinhas de granja). A principal diferença entre os dois grupos é que as galinhas criadas ao ar livre (“free-range”) podem ingerir alimentos presentes no solo, estando mais susceptíveis à adquirirem a infecção, pela ingestão de oocistos esporulados em comparação às galinhas de granja, que são alimentadas quase exclusivamente com ração seca processada comercialmente (ZHU et al., 2008).

2.3.2. Animais silvestres

Os processos que promovem a infecção em populações silvestres são altamente complexos e envolvem a interação de características físicas, biológicas e ecológicas. A título de exemplo, o clima quente e seco é desfavorável à sobrevivência do oocisto, o que está associado à baixa prevalência em regiões com estas características. Já em países de clima tropical úmido a prevalência é alta. Quanto à dieta e ao comportamento alimentar dos hospedeiros, a prevalência é menor em herbívoros do que em onívoros ou

carnívoros, devido à eficácia cumulativa do ciclo predador-presa de *T. gondii*, já que o carnivorismo permite que o ciclo se mantenha apenas entre hospedeiros intermediários (TENTER et al., 2000; ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012; FORNAZARI e LANGONI, 2014). É possível dizer que *T. gondii* é mais bem adaptado à transmissão por carnivorismo em felídeos e por oocistos nos demais hospedeiros (SIBLEY et al., 2009; DUBEY, 2010).

Como ocorre nos animais domésticos e nos humanos, alguns fatores podem aumentar o risco de animais selvagens se infectarem por *T. gondii*, principalmente em áreas sob influência humana e de animais domésticos (VITALIANO et al., 2004; FORNAZARI et al., 2011).

A soroprevalência em felídeos silvestres é geralmente alta, podendo atingir 100% em alguns casos (DUBEY, 2010). A dieta e os hábitos comportamentais de felídeos silvestres têm grande efeito sobre a transmissibilidade e a prevalência de *T. gondii* aos demais hospedeiros. Cañon-Franco et al. (2013) verificaram pela análise por PCR de tecidos de 40 felídeos silvestres do Rio Grande do Sul, positividade em 34,4% dos animais.

No Brasil, estudos mostram a presença da infecção em grande variedade de animais silvestres. Truppel et al. (2010) realizaram estudo em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), roedor utilizado para o consumo humano em muitas áreas da América do Sul. Com o uso da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em 26 capivaras do sul do Brasil, foi observada soropositividade em 61,5% animais. Cabral et al. (2013) observaram a presença do parasito em morcegos do estado de São Paulo pela inoculação de tecidos destes animais em camundongos. Estes autores destacaram a importância de insetos como transportadores mecânicos de oocistos, da contaminação pela água e solo, além da possibilidade de contaminação pela ingestão de sangue de um hospedeiro em fase aguda.

Podem-se destacar também estudos envolvendo animais aquáticos. Uma variedade de animais como lontras, golfinhos, focas e morsas tem sido relatada na literatura recente, com prevalência entre 47 e 100% (DUBEY, 2010). Estes animais servem como sentinelas da contaminação aquática por oocistos, pelo escoamento de água doce no ecossistema marinho (DUBEY et al., 2003;

ROBERT-GANGNEUX e DARDÉ, 2012). Estudo realizado com botos amazônicos (*Inia geoffrensis*) mostrou a existência de anticorpos anti-*T. gondii* em 82 dos 95 botos estudados. A presença de onças na região em época de seca, na qual as águas estão baixas, bem como o clima tropical úmido são prováveis fatores associados à infecção dos botos (SANTOS et al., 2011).

2.3.3. Primatas

Primatas são animais que apresentam cinco dígitos nos pés e mãos, polegares opositores, unhas no lugar de garras, visão de profundidade e comportamentos complexos, muitos deles aprendidos e não apenas instintivos. Apresentam ainda uma organização social complexa; as crias são muito dependentes das mães e têm uma infância prolongada. São divididos em 2 grupos: primatas inferiores ou prossímios e primatas superiores ou antropóides (LEWIN, 2005).

Dentre os animais selvagens, a toxoplasmose é responsável por mortalidade de primatas não humanos em populações de vida livre e em cativeiro, já que estes animais comumente desenvolvem infecção aguda e fatal. São vários os surtos da doença relatados em colônias de primatas não humanos pelo mundo como na Holanda (BORST e VAN KNAPEN, 1984); Paris (CUNNINGHAM et al., 1992); Dinamarca (DIETZ et al., 1997) e no Japão (INOUE, 1997), em zoológicos e em criadouros do Brasil como em São Paulo (BOUER et al., 1999; EPIPHANIO et al., 2003; DUBEY et al., 2006); na Amazonas (ANDRADE et al., 2007) e Roraima (MALUENDA et al., 2009).

2.3.4. Primatas do Velho Mundo e Neotropicais

Os Antropóides, primatas superiores, símios, simiiformes ou, simplesmente, macacos, são os membros da subordem *Haplorrhini* (significa narina simples), que habitam todos os continentes exceto Oceania e Antártica. Estes animais praticamente desapareceram da América do Norte e da Europa. Os antropóides também podem ser divididos em pequenos antropóides e grandes antropóides (LEWIN, 2005; NEVES et al., 2008; DAWKINS, 2009) . Os

pequenos antropóides são os macacos do Velho e do Novo Mundo. Nesse grupo também são incluídos os gibões. Os grandes antropóides são os homínídeos (LEWIN, 2005; BILHARINHO, 2014).

2.4. Animais de zoológicos

A participação dos animais selvagens como reservatórios ou portadores de zoonoses na natureza e em cativeiro é de grande relevância no contexto de Saúde Pública (ACHA e SZYFRES, 2003). Dentre os animais selvagens, a toxoplasmose causa elevada mortalidade de primatas não humanos em cativeiro e em populações de vida livre, já que estes animais desenvolvem infecção aguda e fatal (CASAGRANDE et al., 2013).

As alterações devido à infecção são secundárias à necrose tecidual resultante da replicação e ruptura das células hospedeiras pelos taquizoítos (JONES et al., 2000). Quando o hospedeiro adquire resistência, a infecção torna-se crônica e, nestes casos, são visíveis cistos de bradizoítos, principalmente na musculatura esquelética e cardíaca, bem como no cérebro (JONES et al., 2000; DUBEY et al., 2004).

A via de transmissão da toxoplasmose para primatas mantidos em cativeiro pode ocorrer pelo contato direto com o oocisto presente nas fezes de felídeos, tanto do próprio zoológico (felídeos selvagens) como por animais sinantrópicos, tendo em vista o contato mais frequente dos primatas com o solo do que em vida livre, cujo hábito é preferencialmente arborícola. A transmissão pode ser atribuída ainda ao consumo de carne crua contendo bradizoítos ou alimentos contaminados por cistos ou oocistos esporulados (DUBEY et al., 2006; SILVA, 2006; BOUER et al., 2010). Neste contexto, é importante a construção de recintos de primatas afastados dos felídeos, além de treinamento adequado dos tratadores para evitar a contaminação cruzada (CASAGRANDE et al., 2013).

Deve-se estabelecer o controle de vetores mecânicos, bem como o uso exclusivo de utensílios em cada recinto, a desinfecção dos recintos, utensílios e equipamentos de proteção individual não descartáveis, vazios

sanitário e troca de substrato, em situações em que haja mudança de animais do recinto. Além disso, recomenda-se proceder adequadamente à limpeza diária dos recintos e o destino dos dejetos (SILVA, 2006).

A não adequação do habitat dos primatas possibilita aproximação maior com os humanos, podendo ampliar as possibilidades de transmissão de zoonoses. Portanto, os primatas podem ser considerados animais sentinelas para várias enfermidades de interesse em saúde pública, como a toxoplasmose (MOLINA et al., 2014).

As espécies pertencentes ao grupo dos primatas neotropicais geralmente apresentam toxoplasmose aguda e fatal, com sinais clínicos inespecíficos e tratamento não-responsivo. Segundo estudo conduzido em 33 primatas neotropicais acometidos por toxoplasmose, na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, os sinais clínicos mais observados foram apatia (40,6%), dispneia (18,7%), hipotermia (15,6%), secreção nasal sero-sanguinolenta ou espumosa (12,5%), anorexia (9,4%) e vômito (9,4%). Em 43,7% dos casos os animais vieram a óbito sem apresentar sinais clínicos (EPIPHANIO et al., 2003). Neste ponto, os zoológicos oferecem oportunidades para o estudo desses animais em situações controladas e são importantes fontes de informação para investigações epidemiológicas de doenças transmissíveis (SILVA et al., 2007; CAMPS et al., 2008).

Pesquisando a soroprevalência para toxoplasmose em animais selvagens, em zoológicos do estado de São Paulo, Mato Grosso e Distrito Federal foram encontrados 63,9% (102/169) de animais reagentes para anticorpos de *T. gondii* pela técnica de RIFI (ANDRÉ et al., 2010).

Em zoológicos do Norte e do Nordeste do Brasil, foi possível detectar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 33,15% (n= 61/184) das amostras de mamíferos selvagens de várias espécies pelo teste de MAD, incluindo os primatas (MINERVINO, et al., 2010).

A prevenção da toxoplasmose em animais de vida livre não é praticada. Já a prevenção dos humanos consiste em não ingerir carne crua ou mal cozida de aves e mamíferos selvagens, embora poucas sejam as espécies cuja criação e comércio são permitidos no Brasil. O controle da infecção nos

felinos, higiene dos recintos e o destino adequado das fezes também é de fundamental importância no controle da toxoplasmose humana transmitida por animais selvagens (FORNAZARI e LANGONI, 2014).

2.5. Avaliação diagnóstica

As provas sorológicas possibilitam a detecção da resposta do hospedeiro frente à infecção (THULLIEZ et al., 1986). O sorodiagnóstico é tradicionalmente o método mais utilizado para confirmação da infecção, sendo na maioria das vezes baseada na identificação de IgG específica (NEVES, 1995; UCHÔA et al, 1999; SILVA, 2007).

Dentre os testes sorológicos disponíveis para detecção de anticorpos para *T. gondii*, a técnica de MAD constitui-se em uma prova diagnóstica bastante utilizada em diferentes espécies animais, pois apresenta boa sensibilidade e especificidade, não exige equipamentos especiais nem conjugados espécie-específicos, o que a torna essa técnica muito útil, em especial na aplicação em animais silvestres (DUBEY et al., 2003).

A RIFI é o teste padrão para o diagnóstico sorológico de *T. gondii*, identificando imunoglobulinas IgG utilizando-se conjugado anti-macaco espécie específico. A presença de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas pode alertar para um ambiente contaminado com oocistos de felídeos selvagens, pelo contato com o parasito ao manusear o alimento contaminado, bem como ao alimentar-se de frutas ou de carne crua, ou ainda pela invasão de pássaros e/ou roedores nos recintos, os quais são muitas vezes presas destes animais (LEITE et al., 2008).

Existe grande interesse na investigação molecular de *T. gondii* provenientes de infecções de animais e humanos, com o intuito de verificar a relação entre as variantes encontradas, bem como rastrear epidemiologicamente o agente para a identificação de fontes de infecção ou vias de transmissão (OWEN e TREES, 1999).

A detecção molecular do DNA de *T. gondii* não substitui os métodos sorológicos tradicionais no diagnóstico da doença. Entretanto, a associação do diagnóstico sorológico com o molecular pode confirmar a infecção precocemente

no diagnóstico (KOMPALIC-CRISTO et al., 2004), podendo-se sugerir estratégias de controle nos recintos.

A toxoplasmose se apresenta como uma doença de curso clínico agudo e inespecífico com lesões características em vários órgãos, que pode causar alta mortalidade em colônias de primatas neotropicais e representar sério problema à conservação dessas espécies em cativeiro. Assim, medidas preventivas devem ser tomadas para evitar a infecção desses animais (CASAGRANDE et al., 2013).

JUSTIFICATIVAS

3. Justificativas

O Parque Zoológico Municipal de Bauru está localizado no interior do estado de São Paulo, na cidade de Bauru e situa-se nas coordenadas 22°20' de latitude sul e 49°01' de longitude oeste. Possui licença IBAMA 1/35/91/2157; SMA 8000/2011 e CRMV-SP 01601. Foi inaugurado no dia 24 de agosto de 1980 e contava com número restrito de espécies de animais. No entanto, nos últimos anos sofreu diversas expansões e atualmente possui uma área de 20 alqueires, que está inserida em um ambiente de cerrado de mais de 200 alqueires.

É considerado zoológico de grande destaque no país, principalmente devido à sua estrutura e preocupação ecológica. Possui aproximadamente 880 animais e 227 espécies, recebendo cerca de 150.000 visitantes por ano. Os animais que residem no Zoológico são provenientes de diferentes continentes, incluindo países da África, Ásia, Austrália, Europa, Américas do Norte e do Sul, embora a maioria seja proveniente da fauna brasileira.

A pesquisa de *T. gondii* em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru é desconhecida até o presente momento. A conciliação das técnicas sorológicas e a confirmação pelo PCR para *T. gondii* e posterior sequenciamento genético, são de grande utilidade para se pesquisar a presença de animais infectados no local, já que anteriormente ocorreram óbitos de animais por infecção aguda de toxoplasmose. Desta forma, com este estudo, pretendeu-se verificar a presença de *T. gondii* em primatas não humanos alojados no Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP, como uma forma de vigilância epidemiológica para a toxoplasmose.

Pretende-se, também, propor medidas de controle no ambiente, já que os primatas não humanos podem servir como sentinelas para infecção humana, por se infectarem de diferentes maneiras, seja pelo contato com fômites contaminados, pela ingestão de carnes cruas, frutas e de vegetais que possam estar contaminados com oocistos de *T. gondii*, bem como pela ingestão de insetos e pequenos roedores.

Em 2013 ocorreram casos de toxoplasmose no Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP, causando o óbito de algumas espécies animais, destacando-se os primatas não humanos africanos e pinguins, estes últimos possivelmente infectados pelo contato direto com a areia do recinto contaminada com oocistos esporulados. Este episódio gerou grande preocupação por parte dos setores responsáveis pela administração do local. Os vários modos de transmissão do agente sejam pelo solo e água contaminados por oocistos esporulados eliminados por felídeos, ou até mesmo pela oferta de verduras e frutas que, por ventura, pudessem conter oocistos esporulados, ou ainda pela ingestão de carne crua contendo bradizoítos, possibilitariam a infecção destes animais. Tal situação demonstra o risco de contaminação nas áreas onde tratadores, médicos veterinários e seus auxiliares encontram-se expostos diariamente, bem como riscos para os transeuntes, já que o Parque Zoológico Municipal de Bauru é um local de intensa visitação, principalmente de crianças, justificando-se a investigação desta zoonose em primatas, os quais são altamente susceptíveis.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Geral:

- Pesquisar a ocorrência de *T. gondii* em primatas não humanos, procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP.

4.2. Específicos:

- Determinar o perfil sorológico da toxoplasmose em primatas não humanos de diferentes espécies, que habitam o Parque Zoológico Municipal de Bauru-SP, pelos métodos de RIFI e MAD;

-Realizar o diagnóstico molecular pela PCR para *T. gondii* e posterior sequenciamento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e local de estudo

No presente estudo, foram utilizadas amostras de sangue de 43 primatas não humanos, pertencentes ao plantel do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP, de diferentes espécies. O Zoológico está situado nas coordenadas 22°20' de latitude sul e 49°01' de longitude oeste.

Os animais pertenciam a diferentes recintos em localidades variadas do parque, os quais permitiam o acesso de animais sinantrópicos, como gatos domésticos e roedores. A localização dos diferentes recintos dos primatas africanos pertencentes ao Zoológico de Bauru encontra-se detalhada na Figura 1.

Figura 1. Mapa de localização dos recintos dos primatas africanos do Novo e Velho Mundo no Parque Zoológico Municipal de Bauru-SP. Botucatu, 2016.



Fotos: Arquivo pessoal

Ilustração: Santos, W.J.

A amostragem foi de conveniência e bastante heterogênea, abrangendo mais da metade de todos os primatas locados no Zoológico. Foram consideradas apenas as amostras de sangue que continham volume adequado para realização da prova molecular de PCR e para realização dos testes sorológicos (Quadro 1).

Quadro 1. Categorias, espécies, nome científico, nome popular e número de amostras coletadas para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos, pertencentes ao Zoológico Municipal de Bauru-SP. Botucatu, 2016.

Categoria	Espécies	Nome científico	Nome Popular	n %
Neotropicais	<i>Alouatta</i>	<i>A. belzebul</i>	Guariba de mãos ruivas	2 (4,6)
		<i>A. caraya</i>	Bugio preto	5 (11,7)
		<i>A. fusca</i>	Bugio	3 (7)
		<i>A. seniculus</i>	Bugio	2 (4,6)
	<i>Ateles</i>	<i>A. chamek</i>	Macaco aranha da cara preta	2 (4,6)
		<i>A. marginatus</i>	Macaco aranha da testa branca	3 (7)
		<i>A. paniscus</i>	Macaco aranha da cara vermelha	2 (4,6)
	<i>Cebus</i>	<i>C. albifrons</i>	Cairara	2 (4,6)
	<i>Erythrocebus</i>	<i>E. pata</i>	Macaco pata	3 (7)
	<i>Lagothrix</i>	<i>L. lagotricha</i>	Macaco barrigudo	3 (7)
Velho Mundo	<i>Mandrillus</i>	<i>M. sphinx</i>	Mandril	6 (14)
	<i>Papio</i>	<i>P. hamadryas</i>	Babuíno Sagrado	9 (21)
		<i>P. papio</i>	Babuíno Comum	1 (2,3)
Total				43 (100)

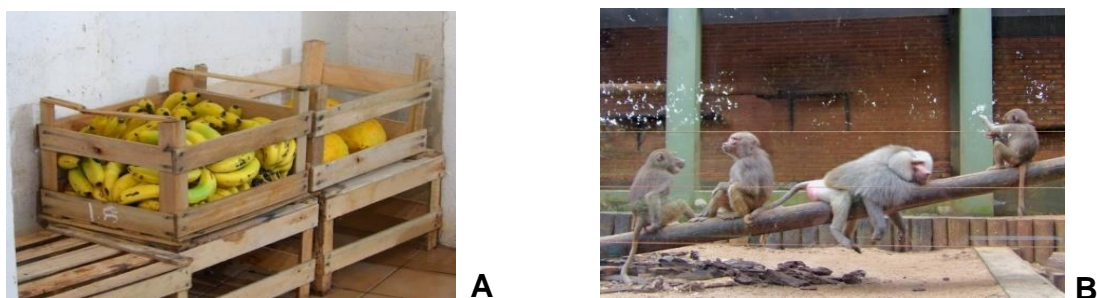
n= número de amostras coletadas

%=porcentagem

O fornecimento de frutas e verduras era de procedência das Centrais Estaduais de Abastecimento (CEASA) de Bauru; (Figura 2A). Já o fornecimento de carnes foi relatado ser realizado por compra por licitação do próprio zoológico, mas não nos foi informada a procedência do fornecedor.

A procedência da areia colocada nos recintos também não nos foi informada. Quando necessário, era realizado o transporte da areia de um recinto desalojado para outro, não importando as espécies mantidas de animais (Figura 2B).

Figura 2. Frutas fornecidas no Zoológico aos animais (A). Areia recolocada nos recintos dos primatas africanos do Velho Mundo (B), do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. Botucatu, 2016.



Fonte: (Arquivo Pessoal)

A idade também era variável nos recintos, não sendo possível estabelecer a idade de todos os animais. Os animais foram categorizados como menores ou iguais a 1 ano de idade (≤ 1 ano), para filhotes e maiores de 1 ano de idade (> 1 ano), para animais considerados adultos e fêmeas com filhotes.

5.2. Autorização do Zoológico Municipal de Bauru-SP.

A autorização para o desenvolvimento de atividades científicas no Parque Zoológico Municipal de Bauru foi concedida pelo Diretor do Zoológico (Anexo A).

5.3. Autorização para Realização da Pesquisa com animais silvestres - SISBIO.

A autorização para a realização da pesquisa foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- (ICMBIO), Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Ministério do Meio Ambiente (MMA), com registro número 44885-1 e Código de Autenticação: 38253396 (Anexo B).

5.4. Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FMVZ – UNESP, Botucatu, SP

A realização do presente projeto de pesquisa foi aprovada pela CEUA (protocolo nº139/2014), já que o projeto não fere qualquer preceito ético e de uso de animais na realização deste estudo científico (Anexo C).

5.5. Coleta de sangue

Os procedimentos de coleta de sangue foram realizados por punção venosa periférica após assepsia com álcool 70%, realizados pela médica veterinária responsável do Parque. Os animais foram sedados com anestésico cloridato de Ketamina, na dose de 1mg/kg, previamente à intervenção odontológica preventiva nos primatas, que ocorria semanalmente.

Uma alíquota do sangue coletado foi destinada em tubos vacutainer contendo EDTA, para a realização da técnica de PCR para *T. gondii*. Outra alíquota da amostra foi armazenada em tubo seco, para obtenção do soro e realização das técnicas de MAD e Reação de RIFI.

5.6. Local de realização dos exames

As análises sorológicas foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios-Pólo Centro-Oeste-Bauru, SP e no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP, Botucatu. As análises

moleculares foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA - Bauru e no Instituto Adolfo Lutz - Regional de Bauru, SP.

5.7. Produção de Antígeno

Um total de 20 camundongos foram inoculados, via intraperitoneal, com 1mL das suspensões da cepa RH, de *T. gondii* previamente selecionadas. Decorrido três dias, os animais foram eutanasiados e coletou-se o exsudato peritoneal, inoculando-se 10 mL de solução fisiológica 0,9% estéril, por animal, aspirando-se em seguida. Após avaliação microscópica, os exsudatos peritoneais ricos em parasitos e livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos, foram misturados volume a volume, com líquido ascítico tumoral (células de sarcoma murino TG 180, derivadas de sarcoma ATCC-CCRFS-180 II), previamente diluído a 1/10 em solução fisiológica 0,9% estéril, para se obter volume final de 120 mL de suspensão. Com esta suspensão de taquizoítos e células tumorais, devidamente homogeneizadas, e mantida em gelo, 60 camundongos Swiss, com 30 dias de idade, foram inoculados com 2mL da suspensão, via intraperitoneal. Dois dias após a inoculação, realizou-se o lavado peritoneal, com 10 mL de solução fisiológica 0,9% estéril (DESMONTS e REMINGTON, 1980; SILVA, 2006). Cada lavado foi acondicionado em tubo de ensaio esterilizado, com tampa de borracha, e mantido em repouso por uma hora.

Todos os lavados foram avaliados microscopicamente quanto a presença de bactérias e células sanguíneas, inflamatórias e sarcomatosas. Os lavados que apresentaram elevado número de parasitos, livres de células e contaminação bacteriana, foram transferidos por inversão dos tubos em recipientes apropriados, homogeneizados e centrifugados em diferentes rotações, de acordo com Silva (2006).

5.7.1. Preparação de antígeno inativado pela formalina (MAD)

Foi adicionado (volume/volume) formalina a 12% (Formaldeído a 6%), diluída em Solução Salina Tamponada (SST) pH 7,2 à suspensão com parasitos, incubando-a “overnight” a temperatura ambiente. Após um dia, foi centrifugado a 600 x g durante 10 minutos e ressuspendido o sedimento em 50 mL de SST

0,01M pH 7,2. Esse processo foi repetido por mais três vezes, para remover os restos celulares e o formaldeído. Por fim, ressuspendeu-se o sedimento em solução tampão borato pH 8,7, que foi ajustado à suspensão final para 2×10^4 parasitos por μL , e acondicionando a 4°C , até o momento da utilização (DESMONTS e REMINGTON, 1980).

5.7.2. Inativação e sensibilização de lâminas para a Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI

Ao exsudato peritoneal rico em taquizoítos foi misturado com igual volume de solução formalina 2%, obtendo-se uma suspensão de exsudato-formol a 1%. Esta suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos, agitando-se por inversão delicada do tubo, a cada 10 minutos. A seguir foi centrifugado a $1600 \times g$ por 10 minutos, e o sobrenadante foi desprezado, ressuspendendo-se o sedimento em solução salina 0,85% até obter-se de 20 a 30 parasitos por campo microscópico. Em seguida foram dispostas 50 μL da suspensão entre a lâmina e lamínula 24x60mm, utilizando-se o aumento de 40 vezes para a realização da leitura, obtenção e contagem dos taquizoítos.

A fixação do antígeno na lâmina foi procedida transferindo-se 10 μL da solução antigênica, sobre os orifícios de lâmina especial de vidro para RIFI (Perfecta[®]), aspirando-se a seguir o excesso, restando somente uma fina película sobre cada orifício, após a secagem à temperatura ambiente. As lâminas assim preparadas foram mantidas em caixas de madeira e laminários a -20°C , até o momento de uso, por período não superior a dois meses.

5.8. Testes Sorológicos

As amostras de sangue alíquotadas em tubos secos foram centrifugadas a $1600 \times g$ por 10 minutos, para obtenção do soro sanguíneo e imediatamente acondicionadas em microtubos plásticos devidamente identificados com o número de protocolo e processadas de acordo com a técnica utilizada.

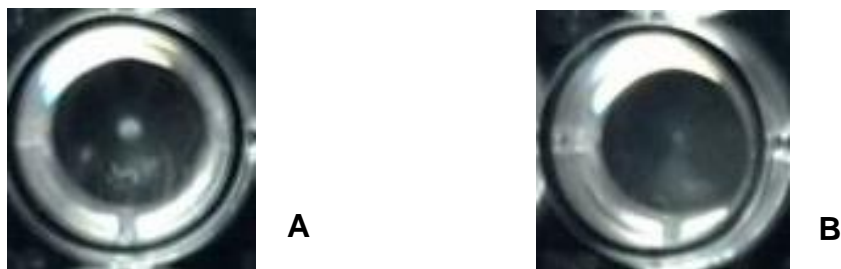
As provas sorológicas de escolha foram a MAD e a RIFI.

5.8.1. Aglutinação Direta Modificada

Na técnica de MAD foi utilizado o antígeno proposto por Desmonts e Remington (1980).

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato, adicionando-se 120 μ L de SST 0,01M pH 7,2, na primeira cavidade e 50 μ L em todas as demais utilizadas. Na primeira cavidade, foi adicionado 5 μ L de soro (diluição 1:25) e, após homogeneização com auxílio de micropipeta, foi transferido 50 μ L para a cavidade seguinte, correspondendo a diluição 1:50. O mesmo procedimento foi realizado até a diluição de 1:400 (PIMENTEL et al. 2009; PENA et al., 2011; ALVARADO-ESQUIAVEL et al. 2013; FERREIRA et al. 2015). A seguir, 25 μ L de cada diluição do soro foi transferida para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”. Adicionou-se 25 μ L de 2-mercaptoetanol (0,2M), diluído em SST 0,01M pH 7,2, para quebrar as pontes das imunoglobulinas (Ig) IgM visando a detecção posterior somente de IgG. Em seguida, adicionou-se 50 μ L da preparação de antígeno, já ajustada à concentração ideal para sua utilização, diluída em tampão borato pH 8,7, a cada um dos poços utilizados. Após homogeneização as microplacas foram seladas com papel laminado e incubadas em estufa a 37°C por 12 horas (SILVA, 2006). A amostra foi considerada soronegativa quando se observou um depósito da suspensão de parasitos no fundo do poço em forma de “botão ou anel no fundo” (Figura 3A). Ao contrário, foi considerada soropositiva, na presença de uma película cobrindo pelo menos metade do fundo da cavidade (Figura 3B) (DA SILVA et al., 2011).

Figura 3. Técnica de Aglutinação Direta Modificada (MAD), para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG, em amostras de soro de primatas não humanos. Reação positiva (A) e negativa (B)



Fonte: Arquivo Pessoal

5.8.2.Reação de Imunofluorescência Indireta

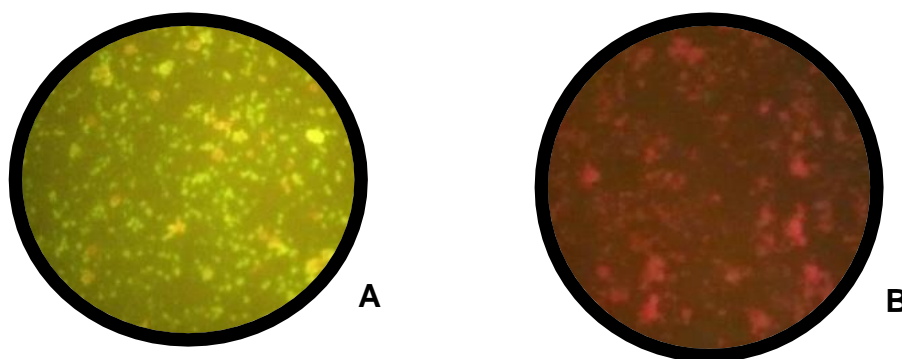
A RIFI foi realizada segundo Camargo (1966), utilizando-se conjugado comercial anti-IgG de macaco (Sigma[®] Co. St. Louis, USA), diluído nas devidas proporções para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Os soros foram diluídos em SST 0,01M pH 7,2, a partir da diluição 1:25, duplicando até a obtenção do título final, estabelecendo-se como triagem de animais positivos um ponto de corte a partir da diluição 1:25 em solução salina tamponada pH 7,2, e incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes na solução tampão (10 minutos cada lavagem) Após a secagem das lâminas, foi adicionado o conjugado anti-IgG de macaco. O conjugado foi previamente adicionado em solução tampão pH 7,2 contendo 0,02% de azul de Evans. Novamente as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e lavada duas vezes por 10 minutos cada lavagem.

As leituras das lâminas foram realizadas em objetiva de 40x, em microscópio de fluorescência, considerando-se positiva a diluição em que os taquizoítos apresentassem sem nítida fluorescência verde na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo azul de Evans. O título final foi considerado como a maior diluição do soro em que ainda houvesse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% dos taquizoítos (Figura 4A). A ausência

de fluorescência ou apenas na extremidade dos parasitos, conhecida como fluorescência polar, foi considerada como reação negativa (Figura 4B). As amostras positivas a essa diluição foram novamente testadas nas diluições 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, obtendo-se assim o título de anticorpos final da amostra.

O ponto de corte, assim como as demais diluições, foram alteradas para preservar o conteúdo escasso de soro a ser analisado, utilizando-se assim 5 μ L ao invés de 10 μ L.

Figura 4. Técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* IgG, em amostras de soro de primatas não humanos. Reação positiva (A) e negativa (B)



Fonte: Arquivo pessoal

6. EXAMES MOLECULARES

6.1. Extração do DNA para pesquisa de *T. gondii*

A purificação do DNA das amostras de sangue foi realizada com Kit comercial Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen Scientific®, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. O DNA extraído das amostras foi mantido a -20°C até o momento do uso.

6.2. Reação em Cadeia da Polimerase para *T. gondii*

As condições de amplificação da PCR em termociclador foram as seguintes: cada tubo de reação de 0,2mL recebeu tampão de PCR (50mMKCl,

20mM de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1U de *Taq*-polimerase (Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen®, USA), 10 µM de cada primer, 1µL da amostra testada e 8,3µL de água ultra pura (MIX-PCR), finalizando em 11µL do MIX-PCR e 1µL do produto de extração do DNA.

No termociclador (Eppendorf Mastercycle PRO®) as condições de amplificação foram de acordo com protocolo de Homan et al. (2000), compreendendo um ciclo para desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos; desnaturação, anexação dos iniciadores e alongamento em 34 ciclos por um minuto cada a 94°C, 60°C e 72°C, respectivamente; seguido de um ciclo de 72°C por 10 minutos. Foram utilizados os iniciadores TOX 4 e TOX 5, descritos a seguir:

TOX4:5' (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) 3'

TOX5:5' (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) 3'

Nesta reação, os produtos resultantes apresentaram 529 pares de base (pb) de comprimento (HOMAN, et al., 2000).

6.3. Controles

Para o controle positivo da reação, utilizou-se a cepa RH de *T. gondii*, cedida pelo Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ-UNESP-Botucatu, enquanto a água mili-Q estéril foi o controle negativo.

6.4. Eletroforese em gel de agarose

A identificação dos produtos amplificados foi realizada pela eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Syber safe® (Thermo Fisher Scientific®), e submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal HE99 (Amershan Biosciences®) contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09m de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A voltagem utilizada foi de 90V por aproximadamente 50 minutos. Utilizou-se a fonte Electrophoresis Power Supply Model EPS 301 (GE-Healthcare®). Para o padrão de peso molecular foi utilizado o DNA Ladder, com

100pb (Thermo Fischer Scientific®). O tamanho dos fragmentos amplificados foram verificados a partir da comparação visual com os padrões de peso molecular e com as cepas padrão que serviram como controles positivos utilizando-se o foto documentador digital Major Science®.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram construídas tabelas de contingência e calculados o coeficiente Qui-quadrado para se verificar a concordância entre os testes diagnósticos utilizados. Com os dados obtidos, também foram calculados valores de sensibilidade e especificidade relativa, comparando-se a técnica sorológica de MAD e RIFI e com a técnica de PCR para *T. gondii*. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5, para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, 2016).

RESULTADOS

8. RESULTADOS

8.1. Provas Sorológicas

8.1.1. Método de Aglutinação Direta Modificada (MAD) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A prevalência de primatas positivos à MAD foi de 37,2% ($n = 16/43$). Dentre os animais positivos, o título de maior frequência foi 200 (31,2%), seguido dos títulos 100 e 400 (18,7%), 25 e 50 (6,2%).

No teste sorológico de RIFI, observou-se 23,3% ($n = 10/43$) de animais reagentes, obtendo-se os títulos 25 em 40%, seguido de 200 em 30%, 100 em 20% e 50 em 10%. Nenhum animal apresentou título ≥ 400 .

A prevalência de animais sororreagentes variou entre 14,3 e 41,7% entre os animais menores de um ano e maiores de um ano de idade, respectivamente com intervalo de p de $> 0,17$ e $< 0,71$ nos dois testes realizados (Tabela 1).

Tabela 1. Análise univariada de fatores de risco para a soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. Botucatu, 2016.

Soroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>							
Fatores	n ^a	MAD ^b	f ^c	Valor p [*]	RIFI ^b	f ^c	Valor p [*]
Sexo							
Macho	18	9	50,0	0,14	5	20,0	0,55
Fêmea	25	7	28,0		5	27,8	
Idade							
≤1 ano	7	1	14,3	0,17	2	28,6	0,71
>1 ano	36	15	41,7		8	22,2	
Classes							
Velho	27	11	40,7	0,53	5	31,2	0,33
Mundo							
Neotropicais	16	5	31,7		5	18,5	

Legenda: ^a Total de animais estudados, ^b Reagentes para pesquisa de anticorpos pela MAD e RIFI quando título ≥ 25 ; ^c frequência dos reagentes, * teste Qui-quadrado, associação com a soroprevalência de *T. gondii* pela MAD e RIFI. MAD= Aglutinação Direta Modificada; RIFI=Reação de Imunofluorescência Indireta.

A prevalência foi diferente entre os sexos dos animais ($p = 0,14$) para o teste de MAD, sendo que os machos se apresentaram em 50% das amostras analisadas sororreagentes para anticorpos anti-*T. gondii*, enquanto à RIFI ($p = 0,55$) essa diferença foi menor: apenas de 20% nos machos contra 27,8% nas fêmeas estudadas.

Ao estudar os animais pertencentes ao Novo Mundo (Neotropicais), foi encontrada a frequência de 40,7% de animais sororreagentes, contra 31,2% de animais sororreagentes do Velho Mundo no teste de MAD e, 18,5% e 31,2%, respectivamente, para RIFI.

Os resultados da análise univariada para frequência de títulos encontrados nas amostras pesquisadas indicaram que, dentre os dois testes sorológicos utilizados, a MAD mostrou-se mais sensível por apresentar maior número de animais reagentes à triagem e uma titulação maior comparada à técnica da RIFI, que se mostrou mais específica, sendo que todos os animais que se apresentaram positivos à triagem, comprovaram positividade à titulação, mesmo com título baixo (≤ 25), apresentado pela maioria dos animais (Tabela 2).

Tabela 2. Soroprevalência de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* e análise univariada pelas técnicas de MAD e RIFI em 43 primatas não humanos provenientes do Parque Zoológico Municipal de Bauru-SP. Botucatu, 2016.

Titulação de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>						
Títulos						
Técnica	25	50	100	200	400	NR
MAD	6,2	6,2	18,7	31,2	18,7	18,7
RIFI	40,0	10,0	20,0	30,0	-	-

Legenda: - (zero por cento)

A associação entre as variáveis e a soropositividade não foram significantes quando ajustada ao número total de animais pesquisados. A maior prevalência foi encontrada na variável sexo, sendo a metade dos animais pesquisados sororreativos à MAD, ao contrário do que foi observado para RIFI, com a maior prevalência observada na categoria primatas do Velho Mundo, obtendo-se 31,2% dos animais sororreagentes.

Já em relação à variável sexo, observou-se que, apenas 20% dos machos foram sorreagentes, e quanto a idade nem o teste de MAD e o teste de RIFI foram associados à soropositividade dos animais.

8.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Toxoplasma gondii*

Todas as amostras de sangue se apresentaram negativas ao teste molecular de PCR convencional, não se realizando, portanto, o sequenciamento.

DISCUSSÃO

9. DISCUSSÃO

A toxoplasmose em primatas não humanos é de ocorrência mundial, de grande prevalência inclusive na fauna selvagem, nas formas de vida livre e em cativeiro (PIMENTEL et al., 2009). Apesar das evidências sorológicas da infecção por *T. gondii* em animais selvagens, ainda não está bem esclarecido o impacto destes primatas na cadeia epidemiológica e tampouco a respeito da susceptibilidade das variadas espécies ao parasito (VITALIANO, 2012). Mesmo em felídeos, que servem como hospedeiros definitivos na transmissão e na manutenção da toxoplasmose em seu habitat, há poucos estudos sobre o seu envolvimento dessa espécie na epidemiologia da enfermidade (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013)

A técnica de MAD é um teste sorológico bastante sensível e específico, baseada na reação direta antígeno-anticorpo, adicionado de 2-mercaptoetanol, que destrói as pontes de dissulfeto presentes na cadeia J de IgM e IgA secretora, limitando assim a ocorrência de reações inespecíficas (WILSON et al., 1990). A técnica de MAD utilizada por Thulliez et al. (1986), adaptada por Desmonts e Remington (1980) e, posteriormente, por Montoya (2002) e Montoya et al. (2007), possibilita a diferenciação do estágios agudos e crônicos de infecção. Outra vantagem deste teste é a não necessidade de conjugado espécie-específico (SILVA, 2007).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o teste considerado padrão ouro para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose, apresentando alto índice de sensibilidade e especificidade (CAMARGO, 1966).

No presente estudo foi observada soroprevalência de 37,2% em primatas pertencentes ao Zoológico Municipal de Bauru, SP, ao teste sorológico de MAD e 23,3% na RIFI, em 43 amostras de primatas amostrados dos quais, a maior parte dos animais positivos, com títulos de 200 U no teste de MAD e 25 à RIFI.

Todos os animais encontravam-se em estágio crônico da infecção, não se podendo determinar o período da infecção, pois priorizada a detecção de IgG. Os animais com títulos baixos podem apresentar infecção leve ou até

mesmo infecção em seu estágio inicial. A toxoplasmose apresenta resposta imune específica. Estabelece-se a formação de cistos e, com isso, a multiplicação é lenta, porém constante (FERREIRA-DA-SILVA, et al. 2008; SILVA, et al., 2009).

Todas as amostras de sangue avaliadas foram negativas à PCR, indicando que os animais estudados não se apresentavam em infecção aguda no momento da coleta.

Tendo em vista os resultados obtidos, sugere-se continuidade na pesquisa sorológica para *T. gondii* nos primatas do zoológico, se possível com coleta de amostras pareadas, para que se possa identificar os animais recentemente infectados e verificar se há aumento dos títulos à repetição do teste.

Análises sorológicas para toxoplasmose poderiam também ser realizadas em outras espécies, como os felídeos, que são os hospedeiros definitivos. A pesquisa de oocistos esporulados em água e alimentos, bem como na areia dos ambientes dos recintos não foi realizada. Entretanto é fundamental na cadeia epidemiológica de transmissão desta zoonose para os animais.

A informação sobre a procedência da carne consumida pelos animais e a areia utilizada no ambiente dos recintos de vivência dos primatas é indispensável, já que podem ter sido a fonte de oocistos esporulados de *T. gondii* na infecção dos animais.

Nos recintos havia presença de areia para a ambientação dos animais, não tendo-se a informação da sua origem. A procedência da areia dos recintos é de extrema importância, tendo em vista que já houve registros de óbitos no recinto dos pinguins, tendo-se encontrado oocistos de *T. gondii* nesta areia, e cistos teciduais em tecido cerebral de um exemplar de pinguim enviado a exame patológico, realizado no Laboratório de Patologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Araçatuba-SP (Comunicação pessoal-Veterinária do Zoológico).

Com relação à variável sexo e à soropositividade dos animais estudados, constatou-se que houve 41,9% (18/43) de animais sororreagentes, sendo 50,0%(9/18) machos na MAD e 27,8% (5/18) na RIFI. Maiores taxas de

infecção em animais machos também foram encontradas em 60,0% no estado de Sergipe (PIMENTEL et al., 2009), e menores taxas como 33,3% no estado de São Paulo (SILVA et al., 2013).

Os animais machos apresentaram OR de 2,8 vezes à MAD e OR de 1,5 vezes à RIFI, tendo, portanto, uma maior chance de apresentar machos soropositivos em relação às fêmeas. Dentre as categorias estudadas, o sexo dos animais também não foi um fator de risco neste estudo, ao contrário de resultados apresentados em pesquisa realizada em cinco estados do nordeste brasileiro por Ferreira et al. (2015), no qual a variável sexo dos animais machos foi significativa estatisticamente.

Os primatas de cativeiro podem ser importantes reservatórios de *T. gondii*, assumindo o papel de sentinelas para a informação de fontes de contaminação no recinto.

Quanto à variável idade observou-se OR de 4,3 vezes maior à MAD e OR 0,7 vezes maior à RIFI indicando maior risco de infecção em relação aos animais mais velhos (> de 1 ano de idade). No entanto, essa diferença não foi considerada significativa, de maneira similar ao obtido por Da Silva et al. (2013) em primatas de São Paulo.

Os primatas foram categorizados em duas diferentes classes denominadas de primatas de Velho Mundo e primatas do Novo Mundo ou Neotropicais, os quais são diferenciados pelo tamanho e hábitos. As espécies neotropicais são consideradas mais susceptíveis a toxoplasmose em relação aos primatas do Velho Mundo, segundo Anderson e Mc Clure, 1993; Innes, (1997) e Silva, (2007). Entretanto, Anderson e Mc Clure (1993), Innes (1997) e Epiphany et al., (2003) relataram que essa vulnerabilidade ainda não foi totalmente esclarecida. Evidências sugerem que, durante a evolução desses animais, os primatas neotropicais estiveram isolados dos felídeos, devido ao hábito arborícola, e devido ao pouco ou nenhum contato com oocistos de *T. gondii*, essas espécies tornaram-se mais susceptíveis à toxoplasmose (INNES 1997). Entretanto, os resultados obtidos neste estudo em relação às soropositividade das amostras estudadas demonstraram que as espécies de primatas do Velho Mundo e os Neotropicais, não diferiram estatisticamente, pois,

dos 27 primatas Neotropicais, onze (40,7%) foram sororreagentes à MAD ($p=0,53$) e dos 16 primatas do Velho Mundo cinco (31,2%) foram mostraram sororreagentes à RIFI ($p=0,33$).

Primatas neotropicais apresentam alta susceptibilidade em relação à infecção por *T. gondii*, já relatada em estudos similares (CASAGRANDE et al., 2013; DA SILVA et al., 2013; FERREIRA et al., 2015). No presente estudo, alguns fatores de risco foram observados e que podem ter contribuído para a infecção dos animais, com a areia nos recintos no qual se alojavam os primatas do Velho Mundo. Tais recintos haviam sido construídos recentemente, e a areia pode ter sido utilizada para ambientalizar estes recintos procedentes de outros locais, tais como os recintos dos felídeos ou ainda de locais externos ao Zoológico. Esta areia poderia estar contaminada com oocistos, possibilitando a infecção dos animais.

Outro fator de risco para os primatas seria a presença de animais sinantrópicos, como pequenos roedores e gatos domésticos, que podem ter acesso aos recintos (CAMPS et al., 2008), além de pássaros, os quais podem conter cistos teciduais de *T. gondii* em sua musculatura, e os primatas, ao ingerí-los, podem adquirir a infecção (GYIMESI et al., 2006).

A alimentação de todos os animais era composta de frutas e verduras, bem como ração, a qual era armazenada a granel, além do fornecimento de carne crua. O abastecimento de água era proveniente de água canalizada e tratada pelo sistema de abastecimento de água e esgoto da cidade de Bauru, SP. Não foi possível relacionar as variáveis estudadas estatisticamente com as vias de transmissão e fontes de infecção associar à presença de animais soropositivos para *T. gondii* no local de estudo. No entanto os primatas de hábito carnívoro podem ter se infectado pela ingestão de carnes cruas contendo cistos teciduais com bradizoítos, assim como por ingestão de água, verduras e frutas contaminadas com oocistos.

Informações precisas sobre a procedência dos alimentos, bem como da areia que é colocada nos ambientes dos animais, não estavam disponíveis no zoológico. No entanto, os fatores de risco relacionados à infecção dos animais, como a procedência, da água e alimentos, bem como da areia que

ambientalza os recintos devem ser levados em consideração, na cadeia epidemiológica da doença para primatas não humanos. Deve-se atentar para uma maior preocupação com a higienização de alimentos oferecidos aos animais e a possibilidade de se implantar uma forma de tratamento térmico ou químico para a areia utilizada nos recintos, a fim de se destruir prováveis oocistos esporulados nesta areia.

Portanto, sugere-se realizar o planejamento de projetos para a prevenção de futuros problemas com outros animais e funcionários do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP, bem como promover atividades de educação em saúde, sobre as principais doenças zoonóticas em ambiente do zoológico, direcionado aos trabalhadores que realizam o manejo da alimentação e dos animais, para que se possa prevenir o risco da toxoplasmose, bem como de outras doenças zoonóticas.

CONCLUSÕES

10. CONCLUSÕES

- Os primatas não humanos foram reagentes ao teste de Aglutinação Direta Modificada (MAD) e à prova de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), indicando infecção com *Toxoplasma gondii*, provavelmente a partir da ingestão de água e alimentos ou contato com a areia dos recintos;

- Todos os animais foram negativos à prova de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sugerindo que os animais estudados não apresentavam infecção aguda no momento da coleta de amostra de sangue;

- Os resultados revelam a necessidade do constante monitoramento sorológico para toxoplasmose nos primatas, bem como a análise de suas prováveis fontes de infecção, possivelmente relacionados à alimentação fornecida aos animais, bem como à presença de animais sinantrópicos, além da provável reutilização de areia de recintos de outras espécies animais, como os felídeos.

REFERÊNCIAS

11. REFERÊNCIAS *

ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, M. A.; KILANI, R. T.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, L. J. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.*, v. 188, p. 608-616, 2003.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis*. 3. ed. Washington: OPS, 2003. v. 1, p.175-185. 2003. (Publicacion Cientifica, n. 580).

ANDERSON, D. C.; Mc CLURE, H. M. Toxoplasmosis. In: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUNT, R. D. (Eds.). *Monographs on pathology of laboratory animals*. I. Nonhuman primates. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 63-69.

ANDRADE, M. C. R.; COELHO, J. M. C. O.; AMENDOEIRA, M. R. R.; VICENTE, R. T.; CARDOSO, C. V. P.; FERREIRA, P. C. B.; MARCHEVSKY, R. S. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and imunohistochemical analysis. *Ciênc. Rural*, v. 37, n. 6, p. 1724-1727, 2007.

ANDRE, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; DE BORTOLLI, C. P.; FALCADE, M.; SOUZA, L.; ALEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canis and felids. *J. Parasitol.*, v. 96, n. 5, p. 1007-1009, 2010.

ALVARADO-ESQUIAVEL, C.; DOMINGUEZ, D. V. M.; VILLENA, I.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in tree Zoos in Mexico City, Mexico. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 44, n. 3, p. 803-806, 2013.

BIANCHI, B. C. *Toxoplasmose: histórico e avanços*. 2005. 65 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdades Integradas da Fundação de Ensino Octavio Bastos, São João Da Boa Vista, São Paulo, 2005.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BILHARINHO, F. *Classificação dos primatas, médico e entusiasta da Paleoantropologia*. Disponível em: <<http://paleoantro2.dominiotemporario.com/doc/classificacaoprimatas.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

BORST, G. H. A.; VAN KNAPEN, F. Acute acquired toxoplasmosis in primates in a zoo. *J. Zoo Anim. Med.*, v. 15, n. 2, p. 60-62, 1984.

BOUER, A.; WERTHER, K.; CATAO-DIAS, J. L.; NUNES, A. L. Outbreak of toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. *Folia Primatol.*, v. 70, n. 5, p. 282-285.

1999.

BOUER, A.; WERTHER, K.; MACHADO, R. Z.; NAKAGHI, A. C.; EPIPHANIO, S.; CATAO-DIAS, J. L. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally and naturally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and indirect ELISA. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, p. 26-31, 2010.

CANON-FRANCO, W. A.; ARAUJO, F. A. P.; LOPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M. A.; KEID, L. B.; DALLA-ROSAF, C.; CABRAL, A. D.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. *Vet. Parasitol.*, v. 197, p. 462-469, 2013.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for serodiagnosis. Technical modification employing preserved culture form of *T. cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, p. 227-234, 1966.

CAMPS, S.; DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J. A. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in Zoo Animals in Selected Zoos in the Midwestern United States. *J. Parasitol.*, v. 94, n. 3, p. 648-653, 2008.

CASAGRANDE, R. A.; SILVA, T. C. E.; PESCADOR, C. A.; BORELLI, V.; SOUZA JR., J. C.; SOUZA, E. R.; TRAVERSO, S. D. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 1, p. 94-98, 2013.

COOK, A. J.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *Br. Med. J.*, v. 15, p. 142-147, 2000.

- COOK, R. A.; KARESH, W. B. Emerging diseases at the interface of people, domestic animals and wildlife. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). *Zoo and Wild Animal Medicine: current therapy*. 6. ed. Missouri: Saunders, 2008. p. 339-349.
- CUNNINGHAM, A. A.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiris ciureus*). *J. Comp. Pathol.*, v. 107, p. 207-219, 1992.
- DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Vet. Parasitol.*, v. 175, n. 1-2, p. 173-177, 2011.
- DA SILVA, R. C.; MACHADO, G. P.; CRUVINEL, T. M. A.; CRUNIVEL, C. A.; LANGONI, H. Frequency of *Toxoplasma gondii* antibodies in tufted capuchin monkeys (*Cebus paella nigrilus*) from an ecological station in the State of Sao Paulo, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 2, p. 251-253, 2013.
- DAWKINS, R. A. *Grande história da Evolução*. São Paulo: Companhia das Letras, 2009.
- DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.*, v. 11, p. 562-568, 1980.
- DIETZ, H. H.; HENRIKSEN, P.; BILLE-HANSEN, V.; HENRIKSEN, S. A. Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys. *Vet. Parasitol.*, v. 68, p. 299-304, 1997.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. 220 p.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 205, p. 1593-1598, 1994.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil; unexpected findings. *Int. J. Parasitol.*, v. 32, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 117, p. 229-234, 2003.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*, v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P.; LEVY, M. Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; DAHL, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *J. Parasitol.*, v. 90, p. 1015-1018, 2004.

DUBEY, J. P.; HODGIN, E. C.; HAMIR, A. N. Acute fatal toxoplasmosis in squirrels (*Sciurus carolensis*) with bradyzoites in visceral tissues. *J. Parasitol.*, v. 92, n. 3, p. 658-659, 2006.

DUBEY, J. P.; SU, C.; CORTES, J. A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J. E.; POLO, L. J.; ZAMRANO, L.; MORA, L. E.; LORA, F.; JUMENEZ, J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet. Parasitol.*, v. 141, p. 42-47, 2006.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. ed. Maryland: CRC Press, 2010. 313 p.

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, p. 1375-1424, 2012.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATAO-DIAS, J. L. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. *J. Comp. Pathol.*, v. 129, p. 196-204, 2003.

FERREIRA, D. R. A.; RIBEIRO, V. O.; LAROQUE, P. O.; WAGNER, P. G. C.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SILVA, J. C. R.; DUBEY, J. P.; REGO, E. W.; MOTA, R. A. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in captive Sapajus spp. *Am. J. Primatol.*, v. 77, p. 558-562, 2015.

FERREIRA-DA-SILVA, M. F.; BARBOSA, H. S.; GROSSA, U.; LUDER, C. G. K. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biosyst.*, v. 4, p. 824-834, 2008.

FORNAZARI, F.; TEIXEIRA, C. R.; SILVA, R. C.; LEIVA, M.; ALMEIDA, S. C.; LANGONI, H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). *Vet. Parasitol.*, v. 179, p. 238-241, 2011.

FORNAZARI, F.; LANGONI, H. Principais zoonoses em mamíferos selvagens. *Vet. Zootec.*, v. 21, n. 1, p. 10-24, 2014.

FORSYTH, M. B.; MORRIS, A. J.; SINCLAIR, D. A.; PRITCHARD, C. P. Investigation of zoonotic infections among Auckland Zoo Staff: 1991-2010. *Zoonoses Public Health*, v. 59, p. 561-567, 2012.

FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMIREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 1566-1570, 2001.

GILLESPIE, T. R.; CHAPMAN, C. A. Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. *Am. J. Primatol.*, v. 70, p. 222-230, 2008.

GYIMESI, Z. S.; LAPPIN, M. R.; DUBEY, J. P. Application of assays for the diagnosis of Toxoplasmosis in a colony of Woolly Monkeys (*Lagothrix lagotricha*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 37, n. 3, p. 276-280, 2006.

GRIGG, M. E.; DUBEY, J. P.; NUSSENBLATT, R. B. Ocular toxoplasmosis: lessons from Brazil. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 159, n. 6, p. 999-1001, 2015.

HESSLER, J. R.; WOODARD, J. C.; TUCEK, P. C. Lethal toxoplasmosis in a woolly monkey. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 159, n. 11, p. 1588-1594, 1971.

HILL, D. E.; SREEKUMAR, C.; GAMBLER, H. R.; DUBEY, J. P. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *J. Food Prot.*, v. 67, n. 10, p. 2230-2233, 2004.

HILL, D.; COSS, C.; DUBEY, J. P.; WROBLEWSKI, K.; SAUTTER, M.; HOSTEN, T.; MUNOZ-ZANZI, M. E.; WITHERS, S.; BOYER, K.; HERMES, G.; COYNE, J.; JAGDIS, F.; BURNETT, A.; McLEOD, P.; MORTON, H.; HONORE, S.; COUVELARD, A.; GARIN, Y. J. F.; BEDEL C.; HENIN, D.; DARDE, M. L.; DEROUIN, F. Genotypage de souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. *Pathol. Biol.*, v. 48, p. 541-547, 2000.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.*, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

ROBINSON, D.; McLEOD, R. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, v. 97, p. 328-337, 2011.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; De BRAELELEER, J.; VERSHUEREN, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 69-75, 2000.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

INOUE, M. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 59, n. 7, p. 593-595, 1997.

ISAZA, M. R. Toxoplasmosis: zoonosis parasitaria. *Rev. Ces Méd.*, v. 21, supl. 1, p. 41-48, 2007.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia veterinária*. Sao Paulo: Manole, 2000. 1415 p.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – recent developments. *Exp. Parasitol.*, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.

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. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, v. 20, p. 86-99, 2013.

KAYE, A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J. Pediatr. Health Care*, v. 25, p. 355-364, 2011.

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J. P.; DARDE, M. L. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 14872-14877, 2007.

KOMPALIC-CRISTO, A.; NOGUEIRA, S. A.; GUEDES, A. L.; FROTA, C.; GONZALEZ, L. F.; BRANDAO, A.; AMENDOEIRA, M. R.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 98, p. 92-95, 2004.

LANGONI, H.; MODOLO, J. R.; PEZERICICO, S. B.; SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; SILVA, A. V.; PADOVANI, C. R. Serological profile of anti- *Toxoplasma gondii* in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, Sao Paulo state, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 12, p. 142-148, 2006.

LEITE, T. N.; MAIA, T. A.; OVANDO, T. M.; CANTADORI, D. T.; SCHIMIDT, L. R.; GUERCIO, A. C.; CAVALCANTI, A.; LOPES, F. M.; DA CUNHA, I. A.; NAVARRO, I. T. Occurrence of infection *Leishmania* spp. and *Toxoplasma gondii* in monkeys (*Cebus apela*) from Campo Grande, MS. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, suppl. 1, p. 307-310, 2008.

LEVINE, N. D. *The protozoan phylum apicomplexa*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988.

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

MALUENDA, A. C. H.; CASAGRANDE, R. A.; NEMER, V. C.; KANAMURA, C. T.; TEIXEIRA, R. H. F.; MATUSHIMA, E. R. Infecção aguda fatal por *Toxoplasma gondii* em macaco barrigudo (*Lagothrix lagotricha*). *Clín. Vet.*, v. 81, p. 100-104, 2009.

MARTINS, C. S. Zoonoses felinas: mitos e verdades. In: SOUZA, H. J. M. *Coletâneas em medicina e cirurgia felina*. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinaria, 2003. cap. 36.

MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRETO-JUNIOR, R. A.; NVES, K. A. L.; PENA, H. F. J.; ORTOLANI, E. L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 41, n. 3, p. 572-574, 2010.

MOLINA, C. V.; CATAO-DIAS, J. L.; NETO, J. S. F.; VASCONCELLOS, S. A.; GENNARI, S. M.; DO VALLE, R. D.; DE SOUZA, G. O.; MORAIS, Z. M.; VITALIANO, S. N.; STREFEZZI, R. D. F.; BUENO, M. G. Sero-epidemiological survey for brucellosis, leptospirosis, and toxoplasmosis in free-ranging *Alouatta caraya* and *Callithrix penicillata* from Sao Paulo State, Brazil. *J. Med. Primatol.*, v. 43, p. 197-201, 2014.

MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection an toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, v. 185, suppl. 1, p. S73-S82, 2002.

MONTOYA, J. G.; BERRY, A.; ROSSO, F.; REMINGTON, J. S. The differential agglutination test as a diagnostic aid in cases of toxoplasmic lymphadenitis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, p. 1463-1468, 2007.

NEVES, D. P. *Parasitologia médica*. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 174-187.

NEVES, W. A.; PILO, L. B. *O povo de Luzia*. Sao Paulo: Globo, 2008.

OWEN, M. R.; TRESS, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J. Parasitol.*, v. 85, n. 2, p. 382-384, 1999.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; Su, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.*, v. 38, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F. J.; MARVULO, M. F. V.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C. R.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, A. C. P.; VILTALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from a red-handed

howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jagarundi (*Puma yagoua roundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 175, p. 377-381, 2011.

PENG, H. J.; CHEN, X. G.; LINDSAY, D. S. A review: competence, compromise, and concomitance: reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J. Parasitol.*, v. 97, p. 620-628, 2011.

PERTZ, C.; DUBELZIG, R. R.; LINDSAY, D. S. Fatal *Toxoplasma gondii* infection in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia rosalia*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 28, p. 491-493, 1997.

PHAN, L.; KASZA, K.; JALBRZIKOWSKI, J.; NOBLE, A. G.; LATKANY, P.; KUO, A. Longitudinal study of new eye lesions in children with toxoplasmosis who were not treated during the first year of life. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 146, p. 375- 384, 2008.

PINARDI, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J. Maternal serologic screening for Toxoplasmosis. *J. Midwifery Womens Health*, v. 48, p. 308-316, 2003.

PINTO, L. D.; ARAUJO, F. A. P.; STOBBS, N. S.; MARQUES, S. M. T. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clinicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. *Cienc. Rural*, v. 39, p. 2464-2469, 2009.

PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F. V.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SILVA, J. C. R.; EVENCIO NETO, J. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 12, p. 1009-1014, 2009.

REMYINGTON, J. S.; KLEIN, J. O.; WILSON, C. B. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol.*, v. 25, p. 264-296. 2012.

SANTOS, P. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; DA SILVA, V. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from central Amazon, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 183, p. 171-173, 2011. 50

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans. R. Soc.*, v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA NETO, J. S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 102, p. 217- 224, 2001.

SILVA, J. C. R. Toxoplasmose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATAO DIAS, J. L. *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca, 2006. p. 768-784.

SILVA, K. L. M. V.; DE LA RUE, M. L. Possibilidade da transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município e Rosário do Sul, RS, Brasil. *Ciênc. Rural*, v. 36, n. 3, p. 892-897, 2006.

SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; ADANIA, C. H.; FERREIRA NETO, J. S. Risk factors associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Brazil. *Prev. Vet. Med.*, v. 78, p. 286-295, 2007.

SILVEIRA, C.; MUCCIOLI, C.; HOLLAND, G. N.; JONES, J. L.; YU, F.; PAULO, A.; BEFORT JUNIOR, R. Ocular involvement following anepidemics of *Toxoplasma gondii* infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 159, n. 6, p. 1013-1021.e3, 2015.

SOUZA, C. Z.; MARCHIORO, A. A.; RAFAEL, K.; ARAUJO, S. M.; FALAVIGNA GUILHERME, A. L. Aborto, espontâneo e toxoplasmose ocular em um casal infectado com *Toxoplasma gondii*. *Sci. Med.*, v. 25, n. 3, p. 1-4, 2015.

SU, C.; SHWAB, E. K.; ZHOU, P.; ZHU, X. Q.; DUBEY, J. P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, v. 137, p. 1-11, 2010.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S.; SANTORO, F.; OVLAQUE, G.; SHARMA, S.; DESMONTS, G. Une nouvelle reaction d' agglutination pour le diagnostic du

51 state evolutif de la Toxoplasmose acquise. *Pathol. Biol.*, v. 34, p. 173-177, 1986.

TRUPPEL, J. H.; REIFUR, L.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; VILANI, R. G. O. C.; GENNARI, S. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Toxoplasma gondii* in Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. *Parasitol. Res.*, v. 107, p. 141-146, 2010.

UCHOA, C. M. A.; DUARTE, R.; LAURENTINO-SILVA, V.; ALEXANDRE, G. M. C.; FERREIRA, H. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, n. 6, p. 661-669, 1999.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; MACHADO AZEVEDO, D. O.; CAMPOS, W. R.; OREFICE, F.; QUEIROZ-ANDRADE, G. M.; CARELLOS, E. V.; ROMANELLI, R. M. C.; JANUARIO, J. N.; RESENDE, L. M.; MARTINS-FILHO A. O.; CARNEIRO, A. C. A. V.; VITOR, R. W. A.; CAIAFFA, W. T. Congenital toxoplasmosis in south eastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*, v. 116, p. 2199- 2205, 2009.

VITALIANO, S. N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from south eastern and mid western regions of Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 122, p. 253- 260, 2004.

VITALIANO, S. N. *Isolamento e caracterização biológica e genotípica de Toxoplasma gondii em animais selvagens do Brasil*. 2012. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WILSON, M.; WARE, D.; JURANEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 196, p. 277-281, 1990.

ZHOU, P.; CHEN, Z.; LI, H. L.; ZHENG, H.; HE, S.; LIN, R. Q.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii* infection in humans in China. *Parasit. Vectors*, v. 4, p. 165, 2011. 52

ZHU, J.; YIN, J.; XIAO, Y.; JIANG, N.; ANKARLEV, J.; LINGH, J.; CHEN, Q. A seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. *Vet. Parasitol.*, v. 158, p. 360-363, 2008.

TRABALHO CIENTÍFICO

1 DA SILVA, D.B.¹; SANTOS, W.J.²; GUIRALDI, L.M.²; ALVES-MARTIM, M.F.²;
2 PAIXÃO, M.S.²; SANCHES, G.P.¹; JOAQUIM, S.F.¹; RICHINI-PEREIRA, V.B.^{2,4};
3 LANGONI, H.^{1,2}; LUCHEIS, S.B.^{1,2,3}.

4 1- Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e
5 Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

6 2- Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
7 Estadual Paulista (FMB-UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

8 3- Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, APTA/SAA, Bauru, SP, Brasil.

9 4- Instituto Adolf Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Bauru, SP, Brasil.

10

11 Endereço: Avenida Rodrigues Alves, 40-40, Bairro: Horto Florestal, Bauru, São Paulo, Brasil.

12 Cep. 17.030.000 Tel:(14)3203-3257/(14) 99746-3999 @:silucheis.@yahoo.com.br

13

14

15

16

17

18

19 **Serological and Molecular Diagnosis of *Toxoplasma gondii* in non-human**
20 **primates at Zoo.**

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39 **Resumo**

40 A participação de animais selvagens como reservatórios ou portadores de
41 zoonoses na natureza e em cativeiro é uma preocupação emergente devido ao
42 potencial de transmissão de agentes zoonóticos, tais como a toxoplasmose. O
43 estudo verifica fatores de risco associados com a prevalência de *Toxoplasma*
44 *gondii* na infecção de primatas procedentes de zoológico. Amostras de soro de
45 43 primatas, foram testados para anticorpos para *T. gondii* utilizando as técnicas
46 sorológicas de método de aglutinação direta (MAD) e reação de
47 imunofluorescência indireta (RIFI) (*cut-off* ≥ 25) e a técnica molecular de reação
48 em cadeia polimerase (PCR); anticorpos foram encontrados em 37,2% (18/43)
49 dos animais, 8/18 foram sororreagentes para ambas as técnicas, 8/18 somente
50 para MAD e 2/18 para RIFI. Nenhuma amostra se apresentou positiva na PCR.
51 Os fatores de risco estudados como sexo, idade e categoria (velho mundo e
52 neotropicais) não se apresentaram significativas à análise estatística ($<0,01$),
53 entre tanto, resultados indicam que fatores relacionados como alimentação e
54 areia presente nos recintos dos animais não foram analisados, mas se
55 mostraram em potencial, possível causa da alta prevalência de anticorpos dos
56 animais pesquisados do Parque Zoológico, necessitando, portanto de um
57 monitoramento constante para a infecção, pela realização periódica de testes
58 sorológicos, como cuidados relacionados aos fatores de risco, como a
59 procedência da areia utilizada nos recintos e a higienização adequada das frutas
60 e verduras fornecidas aos animais como forma de prevenção da infecção para
61 os funcionários bem como para o público visitante.

62

63

64 **SUMMARY**

65 The participation of wildlife as reservoirs or carriers of zoonoses in the wild and
66 in captivity is an emerging concern because of the potential transmission of
67 zoonotic agents, such as toxoplasmosis. The study verifies risk factors
68 associated with prevalence of *Toxoplasma gondii* in infection of primates from
69 Zoo. Serum samples of 43 primates, were tested for antibodies to *T. gondii* using
70 serological techniques of Modified agglutination Test (MAT) and Indirect
71 Immunofluorescent Antibody Test (IFAT), (cut off ≥ 25) and molecular technique
72 of polymerase chain reaction (PCR); antibodies were found in 37.2% (18/43),
73 8/18 were seropositives for both techniques, 8/18 only to MAT and 2/18 to IFAT.
74 No sample was positive by PCR. The risk factors studied gender, age and
75 category (old world and Neotropics) did not presented significant statistical
76 analysis (<0.01) between both, results indicate that related factors such as
77 presence of food and sand in animal enclosures were not analyzed, but showed
78 potential, possible cause of high prevalence of antibodies of animals surveyed
79 the Park Zoo, requiring, therefore a constant monitoring for infection , for
80 conducting periodic serologic tests, well as the concern about risk factors, such
81 as the origin of the sand used in enclosures and proper cleaning fruits and
82 vegetables provided to animals as a way of preventing infection for employees
83 well as for the visiting public. This is the first record of a high prevalence of anti-
84 *T. gondii* antibodies in primates from a Municipal Zoo Park in Bauru, Brazil; thus,
85 this study highlights the importance of the toxoplasmosis in the environments of
86 zoos; so, the monitoring is necessary, especially for the guidance of its
87 employees and attendants by modifying handling sanitary habits of animals as a
88 way to prevent infection for employees as well as the visiting public.

89

90 **INTRODUCTION**

91 *Toxoplasma gondii* is one of the most successful pathogens, both in
92 number of hosts and percentage of infected animals around the world (Su et al.,
93 2010). Close to one third of the world population is chronically infected by
94 toxoplasmosis (Peng et al., 2011).

95 The toxoplasmosis is a zoonotic disease that infects many species of
96 animals, including non-human primates. The changing of their natural habitat and
97 the frequency of people who visit the zoos provide greater proximity to humans.
98 Thus, this proximity tends to affect the ecology of the diseases, increasing the
99 possibility of transmission of zoonosis to humans and between this group of
100 animals. (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2013). Therefore, primates can be
101 considered as sentinel animals to diseases of interest in Public Health, like
102 toxoplasmosis (MOLINA et al., 2014).

103 The environmental contamination by oocysts deserves special
104 attention in the transmission of toxoplasmosis, because just one felid can shed
105 more than 100 million of non sporulated oocysts (DUBEY 2010). Contaminated
106 water and soil can serve as transmission carriers of oocysts in fruits and
107 vegetables, even with few data that confirm this way of transmission
108 (REMINGTON, 2011).

109 Concerning the diet and the feeding behavior of the hosts, the
110 prevalence is lower in herbivorous than in omnivorous and carnivorous, due to
111 the cumulative efficiency of the predator-prey cycle of *T. gondii* , as the
112 carnivorism allows the cycle to be maintained just between intermediate hosts

113 (TENTET et al., 2000). It is possible to say that *T. gondii* is more well adapted to
114 the transmission by carnivorism in felid and by oocysts in the other hosts (SIBLEY
115 et al., 2009; DUBEY, 2010).

116 The toxoplasmosis causes high mortality of nonhuman primates in
117 captivity and in free populations, as these animals develop an acute and fatal
118 toxoplasmosis (CASAGRANDE et al., 2013). The way of transmission of
119 toxoplasmosis in captivity primates can occur by direct contact with oocyst in
120 felids feces, both from the own zoo (wild felids) as by synanthropic animals, owing
121 to the more frequent contact of primates with the soil than if they were free, which
122 habit is preferably arboreal. The transmission can be related to the consumption
123 of raw meat containing bradyzoites or contaminated food by cysts or sporulated
124 oocysts (DUBEY et al., 2006; SILVA, 2006, BOUER et al., 2010). In this point,
125 the zoos give opportunities for the study of these animals in controlled situations
126 and are important sources of information to epidemiologic investigations of
127 transmittable diseases (SILVA et al., 2007); CAMPS et al., 2008).

128 Due to a toxoplasmosis infection of some African nonhuman primates
129 in one municipal Zoo from Southeast of Brazil, was demonstrated a risk situation
130 of contamination in areas where the treater, as well as risks for passers, as this
131 is a local of intense visitation, especially of children, creating big concern by the
132 responsible sections of the area administration. Therefore, the objective of this
133 study was to determine the prevalence of infection by *T. gondii* in nonhuman
134 primates in zoos.

135 **METHODS**

136 **Animals and study area**

137 Blood samples of 43 nonhuman primates were used, belonging to one
138 municipal Zoo from Southeast of Brazil, of different species.

139 The animals belonged to different enclosures in several areas of the
140 zoo, which allowed access of synanthropic animals, like domestic cats and
141 rodents.

142 **Sample collection**

143 The procedures of collection of blood were done before the preventive
144 odontology surgery, which used to occur every week, during the year of 2015.
145 The animals were sedated with Ketamin (10mg/kg). One blood aliquot was
146 collected by vein puncture, stored in one dry tube and one with EDTA for
147 serologic tests and PCR.

148 **Laboratory tests**

149 **Modified agglutination test (MAT)**

150 The MAT technique was used with an antigen proposed by
151 (DESMONTS and REMINGTON, 1980). The antigens used were *T. gondii*
152 tachyzoites produced by inoculation of lineage RH, reproduced in vivo, with
153 utilization of Swiss mice.

154 **Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT)**

155 The IFAT was made as proposed by Camargo (1966), utilizing a
156 commercial conjugate anti-IgG-monkey (Sigma[®] Co. St. Louis, USA),
157 establishing as screening of positive animals the cut-off of 1:25. The slides
158 readings were realized in 400X for magnifying, in fluorescence microscope,
159 considering positive the dilution in which the tachyzoites presented clear green
160 fluorescence in cellular membrane, in contrast with the red background of forms

161 colored by Evans blue. The final titer was considered by the highest dilution of
162 the serum in which there was still complete fluorescence in the borders of at least
163 50% of tachyzoites. The absence of fluorescence or just in the ends of the
164 parasite, known as polar fluorescence, was considered as negative reaction. The
165 positive samples to this first dilution were then tested in dilutions of 1:50, 1:100,
166 1:200 and 1:400, getting the final antibody titer of the sample.

167 **Molecular Exams**

168 The exam of Polymerase Chain Reaction (PCR) was realized as the
169 protocol of Homan et al. (2000), doing the extraction of *T. gondii* DNA with the
170 commercial kit Axy Prep DNA Blood Genomic Miniprep (Axygen Scientific® USA),
171 following the fabricant recommendations. The amplification of PCR: each tube of
172 0,2ml received PCR buffer (50mMKCL, 20mM of Tris-HCL), 1,5 mM of MgCl₂,
173 02, mM od DNTPs, 1U of Ta1-polymerase (Platinum® Taq DNA Polymerase,
174 Invitrogen®, USA), 10 µM of each primer, 1µL of each tested sample and 8,3 µL
175 of distilled water (MIX-PCR), ending in 11 µL of MIX-PCR and 1µL and 1µLof the
176 extraction product from DNA.

177 The primers used were TOX4 and TOX5, whit 539 pb described next:

178 **TOX4:5' (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) 3'**

179 **TOX5:5' (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) 3'**

180

181 The size of the amplified fragments were verified starting with visual
182 comparison of the molecular weight models and with the standard strains which
183 served as positive controls.

184 **Statistical Analysis**

185 Contingency tables were done and Chi-square was calculated to verify
186 the agreement between both diagnostic tests. With the obtained data, the relative
187 sensibility and specificity values were also calculated, comparing the serological
188 techniques of MAT and IFAT and with the PCR technique for *T.gondii*. The
189 program GraphPad Prism 5, for Windows (GraphPad Software, San Diego,
190 California, USA, 2016) was used.

191 **Ethics**

192 The study was approved by Sistema de Autorização e Informação em
193 Biodiversidade (SISBIO) Autenticação: 38258896, courtesy of Chico Mendes de
194 Conservação da Biodiversidade Institute (ICMBIO) and the Ethic Committee for
195 utilization of animals (CEUA) of FMVZ-UNESP, Botucatu-SP (protocol n°
196 139/2014)

197 **RESULTS**

198 Antibodies for *T. gondii* were found in primates by MAT, in total of
199 37,2% (n=16/43). Among the seropositive animals, the most frequent titer was
200 200 (31,2%), followed by titers of 100 and 400 (18,7%), 25 and 50 (6,2%).

201 In the IFAT, 23,3% (n=10) of the animals were reagent, presenting
202 titers of 25 in 40%, followed by 200 in 30%, 100 in 20% and 50 in 10%. Any
203 animal showed titer of 400.

204 The seropositive species were: *A. caraya*=2, *A. paniscus*=1, *E.*
205 *pata*=2, *M. sphinx*=2, *P. hamadryas*=1 em ambas técnicas sorológicas. *A.*
206 *seniculus*=1, *A. chamek*=2, *A. marginatus*=2, *L. lagotricha*=1, *M. sphinx*=1 e *P.*
207 *hamadryas*=1 for MAT and *M. sphinx*=1 e *P. hamadryas*=1 for IFAT.

208 The prevalence of seropositive animals ranged from 14,3 to 41,7%
 209 among the animals younger than one year and older than one year, with interval
 210 of p of $>0,17$ and $<0,71$ in two tests (Table 1)

211 **Table 1:** Univariate analysis of risk factors for the seroprevalence of antibodies
 212 anti-*Toxoplasma gondii*, in nonhuman primates housed in zoo.

Soroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>T.gondii</i>							
Factors	n ^a	MAT ^b	f ^c	<i>p</i> -Value*	IFAT ^b	f ^c	<i>p</i> -Value*
Sex							
Male	18	9	50,0	0,14	5	20,0	0,55
Female	25	7	28,0		5	27,8	
Age							
≤1 year	7	1	14,3	0,17	2	28,6	0,71
>1 year	36	15	41,7		8	22,2	
Classes							
Old World	27	11	40,7	0,53	5	31,2	0,33
Neotropicals	16	5	31,7		5	18,5	

213 ^a Total number of studied animals, ^b Reagents for antibodies by MAT and IFAT,
 214 when titer ≥ 25 ; ^c frequency of reagents; * Chi-square test, association with the
 215 seroprevalence of *T. gondii* by MAT and IFAT. MAT= Modified Agglutination Test;
 216 IFAT: Indirect Immunofluorescent Antibody Test
 217

218 The prevalence differed between sex ($p=0.14$) by MAT, in which males
 219 were 50% of the positive samples analyzed for *T. gondii*, while the IFAT ($p=0.55$)
 220 showed a smaller difference: only 20% in males against 27.8% in the studied
 221 females.

222 By studying the animals of the New World (Neotropical), a frequency
 223 of 40.7% of seropositive animals was found, compared to 31.2% of seropositive
 224 animals of the Old World, the MAT test and 18.5% and 31.2 % by IFAT,

225 respectively. The results of the univariate analysis for titers frequency found in
 226 the surveyed samples indicated that, among the two serological tests used, the
 227 MAT was more sensitive due to a higher number of positive animals sorting and
 228 a higher titer compared to the technique of IFAT, which was more specific, and
 229 all the animals that tested positive to screening, proved positive to the titration
 230 even with low titer (≤ 25), presented by most of the animals (Table 2).

231 **Table 2.** Seroprevalence of anti -IgG *T. gondii* antibodies and univariate analysis
 232 by MAD and IFAT techniques in 43 nonhuman primates housed in Zoo.
 233 Legend: - (zero per 100)

234 The association between the variables and seroconversion were not
 235 significant when adjusted to the total number of surveyed animals. The highest
 236 prevalence was found in the variable sex, which half of the animals studied were
 237 seropositive by MAD, contrary to what was observed in IFAT, with higher

Titration of antibodies anti- <i>T.gondii</i>						
Titers						
Technique	25		100	200	400	NR
MAT	6,2	6,2	18,7	31,2	18,7	18,7
IFAT	40,0	10,0	20,0	30,0	-	-

238 prevalence in Old World primates category, yielding 31.2% of seropositive
 239 animals.

240 In relation to sex, it was observed that only 20% of males were
 241 seropositive, and regarding the age ($p = 0.17$) by MAT and $p = 0.71$ to IFAT was
 242 not associated with seroconversion of animals.

243 In the conventional PCR, all blood samples presented to be negative,
 244 suggesting that the studied animals did not have an acute infection at the time of
 245 collection, since this response occurs mainly in acute phase.

246

247 **DISCUSSION**

248 This study showed a seroprevalence of 37.2% by MAT and 23.3% by
249 IFAT in 43 samples from primates, of which most positive animals showed titers
250 of 200 U in MAT and 25 in IFAT. All the animals were in chronic stage of infection.

251 All the animals were in the chronic stage of infection, and it was not
252 able to determine the period of infection, because the search was for IgG.
253 Animals with low titers may have mild infection or even infection in its early
254 stages. Toxoplasmosis presents specific immune response. It establishes the
255 formation of cysts, and with it, the multiplication is slow but steady (FERREIRA-
256 DA-SILVA, et al 2008; DA SILVA, et al, 2013).

257 Given the results, it is suggested to keep the serological survey for *T.*
258 *gondii* in zoo on primates, if possible with collection of paired samples so that you
259 can identify recently infected animals and check if the titers are increasing when
260 the test is repeated. Serological tests for toxoplasmosis could also be conducted
261 in other species, such as felines, which are the definitive hosts. The sporulated
262 oocysts search in water and food as well as the sand of the enclosures
263 environments was not performed. However it is important in the epidemiological
264 chain of transmission of this zoonosis to animals.

265 Information about the origin of the meat consumed by animals and the
266 sand used in the environment of the living grounds of primates is of extreme
267 importance, as may have been the source of oocysts of *T. gondii* the cause of
268 infection for animals.

269 With respect to gender and serum status of the animals studied, it was
270 found that there were 41.9% (18/43) seropositive animals, being 50.0% (9/18)

271 males by MAT and 27.8% (5 / 18) by IFAT. Higher rates of infection in male were
272 also found in 60.0% in the state of Sergipe (PIMENTEL et al., 2009), and lower
273 rates as 33.3% in São Paulo (DA SILVA et al., 2013).

274 Male presented OR of 2.8 times the MAT and OR 1.5 times the IFAT,
275 getting a greater chance of having seropositive males than females. Among the
276 categories studied, sex was also not a risk factor in this study, unlike results
277 reported in a survey conducted in five states in northeastern Brazil by Ferreira et
278 al. (2015), in which the variable sex of animals was statistically significant.

279 Captive primates can be important reservoirs of *T. gondii*, assuming
280 the role of sentinels for sources of contamination in the enclosure.
281 The variable age, showed OR of 4.3 times by MAT and OR 0.7 times by IFAT,
282 and therefore found increased risk of infection compared to older animals (> 1
283 year old).

284 However, this was not considered a significant difference, similarly to
285 that obtained by Da Silva et al. (2013) in primates of Sao Paulo.

286 Neotropical species are considered more susceptible to toxoplasmosis
287 in relation to the Old World primates, according to reports from Anderson and Mc
288 Clure, 1993; Innes, 1997; Silva, 2007. However, Anderson and Mc Clure (1993);
289 Innes (1997) and Epiphonio et al. (2003) reported that vulnerability has not been
290 fully clarified. In this study, the results obtained in relation to the serum status of
291 the samples, showed that the species of Old World primates and Neotropical, did
292 not represent a risk factor, because, of the 27 Neotropical primates, eleven
293 (40.7%) were seropositive by MAT ($p = 0.53$) and from 16 Old World primates,
294 five (31.2%) were seropositive by IFAT ($p = 0.33$).

295 Neotropical Primates have high susceptibility in relation to *T. gondii*
296 infection, as reported in other similar work (CASAGRANDE et al, 2013; DA SILVA
297 et al, 2013; Ferreira et al, 2015.). Some risk factors were observed and that may
298 have contributed to the infection of the animals, with the sand in the enclosures
299 in which the primates of the Old World are housed. These enclosures were newly
300 built, and the sand may have been used to copy and the sand may have been
301 used in these enclosures from other places, such as the enclosures of the felids
302 or from external sites of the zoo. This sand might be contaminated with oocysts,
303 allowing the infection of the animals.

304 Another risk factor for primates would be the presence of synanthropic
305 animals such as domestic cats and small rodents that may have access to
306 enclosures (Camps et al., 2008), and birds, which may contain tissue cysts of *T.*
307 *gondii* in their muscles, and, by ingesting them, primates can acquire the infection
308 (Gyimesi et al., 2006).

309 The feeding of all animals was made up of fruits and vegetables, as
310 well as feed, which was stored in bulk, besides the supply of raw meat. The water
311 supply came from tap water and treated by the water and sewage system of the
312 city. It was not possible to relate the variables statistically with the transmission
313 routes and sources of infection related to the presence of seropositive animals to
314 *T. gondii* in the study site. However, the primates with carnivorous habit may have
315 become infected by eating raw meat containing tissue cysts with bradyzoites, as
316 well by water, fruits and vegetables contaminated with oocysts.

317 Accurate information about the origin of food, as well as the sand that is
318 placed in animal environments, was unknown. However, both may be important
319 risk factors that should be considered to prevent future infections of animals,

320 knowing that penguins had died suddenly, in which were found oocysts of *T.*
321 *gondii* in the sand used at the enclosure of these animals, as well as brain tissue
322 cysts in a penguin in pathological examination, suggesting contamination of the
323 site and the infection of animals (Personal communication: Zoo's Veterinary). In
324 the context, is important the constructions of enclosures of primates far from
325 felids, beside the proper training of treaters to avoid crossed contamination
326 (CASAGRANDE et al., 2013).

327 Therefore, it is suggested to perform a project planning for the prevention
328 of future problems with other animals and employees of the Zoo and promote
329 health education activities on major zoonotic diseases in these environments,
330 directed to those involved in the management and feeding of animals so that it
331 can prevent the risk of toxoplasmosis, as well as other diseases.

332 **CONCLUSION**

333 The results show the need for constant serological monitoring for
334 toxoplasmosis in primates, as well as analysis of their likely sources of infection,
335 possibly related to the feed supplied to the animals and the presence of
336 synanthropic animals in enclosures, besides the probable sand reuse from other
337 animal species, such as felines.

338

339 **ACKNOWLEDGEMENTS**

340 Research Center for Zoonosis (NUPEZO) FMVZ, UNESP, Botucatu,
341 SP; Molecular Biology Laboratory (Adolfo Lutz Institute), Bauru, SP.

342

343 **REFERENCES**

344

- 345 Anderson, D. C.; Mc Clure, H. M. Toxoplasmosis. In: Jones, T. C.; Mohr, U.; Hunt,
346 R. D. (Eds.), 1993. *Monographs on pathology of laboratory animals*. I. Nonhuman
347 primates. New York: Springer-Verlag, p. 63-69.
- 348 Alvarado-Esquiave, C.; Dominguez, D. V. M.; Villena, I.; Dubey, J. P.
349 Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in tree Zoos
350 in Mexico City, Mexico. 2013, *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 44, n. 3, p. 803-806.
- 351 Bouer, A.; Werther, K.; Machado, R. Z.; Nakaghi, A. C.; Epiphonio, S.; Catao-
352 Dias, J. L. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally and
353 naturally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and
354 indirect ELISA. 2010. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, p. 26-31.
- 355 Camargo, M. E. Fluorescent antibody test for serodiagnosis. Technical
356 modification employing preserved culture form of *T. cruzi* in slide test. 1966. *Rev.*
357 *Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, p. 227-234.
- 358 Camps, S.; Dubey, J. P.; Saville, W. J A. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*
359 in Zoo Animals in Selected Zoos in the Midwestern United States. 2008. *J.*
360 *Parasitol.*, v. 94, n. 3, p. 648-653.
- 361 Casagrande, R. A.; Silva, T. C. E.; Pescador, C. A.; Borelli, V.; Souza JR., J. C.;
362 Souza, E. R.; Traverso, S. D. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo
363 retrospectivo de sete casos. 2013. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 1, p. 94-98.
- 364 Da Silva, R. C.; Machado, G. P.; Cruvinel, T. M. A.; Cruvinel, C. A; Langoni, H.
365 Frequency of *Toxoplasma gondii* antibodies in tufted capuchin monkeys (*Cebus*
366 *paella nigritus*) from an ecological station in the State of Sao Paulo, Brazil. 2013.
367 *Pesq. Vet. Bras.*, v. 33, n. 2, p. 251-253.

- 368 Desmonts, G.; Remington, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of
369 *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity.1980. *J.*
370 *Clin. Microbiol.*, v. 11, p. 562-568.
- 371 Dubey, J. P.; Hodgins, E. C.; Hamir, A. N. Acute fatal toxoplasmosis in squirrels
372 (*Sciurus carolinensis*) with bradyzoites in visceral tissues. 2006. *J. Parasitol.*, v. 92,
373 n. 3, p. 658-659.
- 374 Dubey, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. ed. Maryland: CRC
375 Press, 2010. 313 p.
- 376 Epiphanyo, S.; Sinhorini, I. L.; Catao-Dias, J. L. Pathology of toxoplasmosis in
377 captive New World primates.2003. *J. Comp. Pathol.*, v. 129, p. 196-204.
- 378 Ferreira, D. R. A.; Ribeiro, V. O.; Laroque, P. O.; Wagner, P. G. C.; Pinheiro
379 Junior, J. W.; Silva, J. C. R.; Dubey, J. P.; Rego, E. W.; Mota, R. A. Risk factors
380 associated with *Toxoplasma gondii* infection in captive Sapajus spp.2015. *Am. J.*
381 *Primatol.*, v. 77, p. 558-562.
- 382 Ferreira-Da-Silva, M. F.; Barbosa, H. S.; Grossa, U.; Luder, C. G. K. Stress-
383 related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. 2008. *Mol.*
384 *Biosyst.*, v. 4, p. 824-834.
- 385 Gyimesi, Z. S.; Lappin, M. R.; Dubey, J. P. Application of assays for the diagnosis
386 of Toxoplasmosis in a colony of Woolly Monkeys (*Lagothrix lagotricha*).2006. *J.*
387 *Zoo Wildl. Med.*, v. 37, n. 3, p. 276-280.
- 388 Homan, W. L.; Vercammen, M.; De Braeleleer, J.; Vershueren, H. Identification
389 of a 200- to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and
390 its use for diagnostic and quantitative PCR. 2000. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 69-
391 75.

- 392 Innes, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune
393 response. 1997. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 20, n. 2, p. 131- 138.
- 394 Molina, C. V.; Catao-Dias, J. L.; Neto, J. S. F.; Vasconcellos, S. A.; Gennari, S.
395 M.; Do Valle, R. D.; De Souza, G. O.; Morais, Z. M.; Peng, H. J.; Chen, X. G.;
396 Lindsay, D. S. A review: competence, compromise, and concomitance: reaction
397 of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. 2011. *J.*
398 *Parasitol.*, v. 97, p. 620-628.
- 399 Pimentel, J. S.; Gennari, S. M.; Dubey, J. P.; Marvulo, M. F. V.; Vasconcellos, S.
400 A.; Morais, Z. M.; Silva, J. C. R.; Evencio Neto, J. Inquérito sorológico para
401 toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico
402 de Aracaju, Sergipe. 2009. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n. 12, p. 1009-1014.
- 403 Remington, J. S.; Klein, J. O.; Wilson, C. B. *Infectious diseases of the fetus and*
404 *newborn infant*. 2011. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- 405 Sibley, L. D.; Khan, A.; Ajioka, J. W.; Rosenthal, B. M. Genetic diversity of
406 *Toxoplasma gondii* in animals and humans. 2009. *Philos Trans. R. Soc.*, v. 364,
407 p. 2749-2761.
- 408 Silva, J. C. R. Toxoplasmose. In: Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R.; Catao-Dias, J. L.
409 *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca, 2006. p. 768-784.
- 410 Silva, J. C. R.; Marvulo, M. F. V.; Dias, R. A.; Ferreira, F.; Amaku, M.; Adania, C.
411 H.; Ferreira Neto, J. S. Risk factors associated with seropositivity to *Toxoplasma*
412 *gondii* in captive Neotropical felids from Brazil. 2007. *Prev. Vet. Med.*, v. 78, p.
413 286-295.

414 Su, C.; Shwab, E. K.; Zhou, P.; Zhu, X. Q.; Dubey, J. P. Moving towards an
415 integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma*
416 *gondii*. 2010. *Parasitology*, v. 137, p. 1-11.

417 Tenter, A. M.; Heckeroth, A. R.; Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to
418 humans. 2000. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1217-1258.

419 Truppel, J. H.; Reifur, L.; Montiani-Ferreira, F.; Lange, R. R.; Vilani, R. G. O. C.;
420 Gennari, S. M.; Thomaz-Soccol, V. *Toxoplasma gondii* in Capybara
421 (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR.
422 2010. *Parasitol. Res.*, v. 107, p. 141-146.

423

424

425

ANEXOS

A



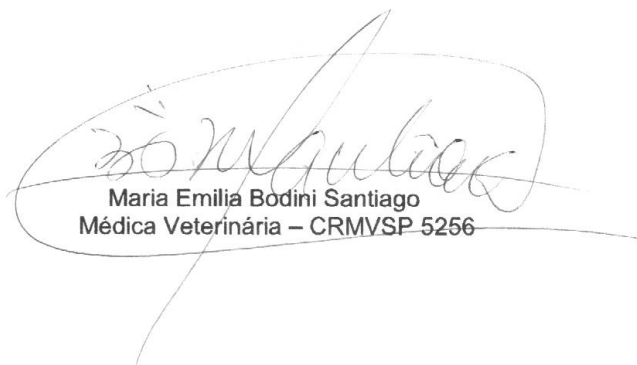
Parque Zoológico Municipal de Bauru

Registros: IBAMA 1/35/91/2157-6 CRMV-SP 01601 Filiado a S.Z.B.9

Declaração

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação sorológica e molecular para *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP", a ser desenvolvido por Daniela Barbosa da Silva, foi analisado e aprovado de acordo com as diretrizes para o desenvolvimento de trabalhos técnico-científicos nesta instituição, autorizando-se, portanto, o início das coletas nos animais-alvo a partir de agosto de 2014 com término previsto para novembro de 2014.

Bauru, 01 de setembro de 2014.



Maria Emilia Bodini Santiago
Médica Veterinária – CRMVSP 5256

B



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44885-1	Data da Emissão: 29/07/2014 20:04	Data para Revalidação*: 28/08/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Simone Baldini Lucheis	CPF: 126.014.428-32
Título do Projeto: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR PARA <i>Toxoplasma gondii</i> EM PRIMATAS NÃO HUMANOS PROCEDENTES DO PARQUE ZOOLOGICO MUNICIPAL DE BAURU-SP	
Nome da Instituição : Departamento de Descentralização do Desenvolvimento	CNPJ: 46.384.400/0128-21

C

A T E S T A D O

Atesto que o Projeto de Pesquisa "Avaliação sorológica e molecular para *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru - SP" **Protocolo CEUA 139/2014**, aprovado em 05/09/2014, a ser conduzido por **Daniela Barbosa da Silva**, orientadora Prof^a. Simone Baldini Lucheis, para fins de pesquisa científica; teve o título alterado para: "Diagnóstico sorológico e molecular de *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos em Parque Zoológico", e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	10/09/2014 a 01/08/2016
Finalidade	Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem	Macacos/ <i>Alouatta belzebul</i> e outros
Nº de animais	40
Peso/Idade	Variado/Jovens e adultos
Sexo	20 machos e 20 fêmeas
Origem	Parque Zoológico

Botucatu, 13 de abril de 2016



Prof.ª Ass. Dr.ª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
☐ (14) 3880-2176 – ☐ patrizia@fmvz.unesp.br – ☐ www.fmvz.unesp.br