

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**LEPTOSPIROSE E TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS:
DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ESTUDO SOROLÓGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marta Regina Grumann

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**LEPTOSPIROSE E TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS: DIAGNÓSTICO
MOLECULAR E ESTUDO SOROLÓGICO**

Marta Regina Grumann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação**

Orientadora: Prof. Adriana Costa da Motta

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**LEPTOSPIROSE E TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS: DIAGNÓSTICO
MOLECULAR E ESTUDO SOROLÓGICO**

Elaborada por
Marta Regina Grumann

Com requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Adriana Costa da Motta
(Orientadora)**

Luiz Carlos Kreutz

David Driemeier

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

CIP – Catalogação na Publicação

G8871 Grumann, Marta Regina

Leptospirose e toxoplasmose em primatas :
diagnóstico molecular e estudo sorológico / Marta
Regina Grumann. – 2015.

60 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Costa da Motta.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015

1. Toxoplasmose. 2. Leptospirose em animais.
3. Zoonoses. 4. Primata. I. Motta, Adriana Costa da,
orientador. II. Título.

CDU: 599.8

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, deixo aqui o meu muito obrigado a minha orientadora, Prof. Dra. Adriana Costa da Motta, que esteve sempre incentivando meu crescimento e evolução intelectual, incansavelmente, durante estes dois anos. Obrigada pela liberdade e confiança em mim depositadas, além da amizade e apoio incondicionais.

Um agradecimento especial, também, a todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, por instigarem a busca ao conhecimento e auxiliar na construção do mesmo. A troca de informações e as lições em sala de aula tornaram o período de aulas e estudos especial e apaixonante. Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz, obrigada pelo incentivo inicial.

Agradeço às secretárias Patrícia Rizzardi e Lucilaine Gajardo, pela disposição e auxílios prestados no decorrer do curso.

Agradeço aos meus colegas, com os quais construí uma amizade especial, e com quem dividi momentos de alegria e aflição, por me transmitirem boas vibrações e leveza, imprescindíveis para esta caminhada.

Agradeço aos funcionários e amigos do Laboratório de Patologia Animal, Tanise, Cláudia, Alex e Gabriela, com quem pude contar e que não mediram esforços para me ajudar, e também ao Zigomar, bolsista de Iniciação Científica, pela incansável dedicação a este estudo.

Agradeço ao Médico Veterinário do Zôo-UPF e colega José Roberto da Silva Filho e ao Prof. Dr. Márcio Costa, por todos os auxílios prestados.

Um agradecimento mais que especial a minha família e amigos, pelo carinho, amizade e, sobretudo, compreensão pelos momentos de ausência e afastamento, necessários para a realização deste trabalho.

À minha mãe, que muitas vezes amedronto com minhas decisões repentinas, saiba que serei eternamente grata por me apoiar e incentivar emocionalmente e incondicionalmente. Agradeço também ao meu pai, que neste momento se encontra em outro plano, mas que se faz presente em pensamento e amor. Tenho certeza que estás feliz com a minha realização e que sempre me guia, iluminando meu caminho. Vocês são o melhor de mim. Amo vocês!

Minha dedicação exclusiva ao projeto e a realização deste trabalho somente foi possível com a concessão de bolsas da UPF e FAPERGS, aos quais agradeço.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha orientadora, profissional dedicada. Minha mãe, exemplo de honestidade e dedicação à família. Meu pai (*in memoriam*), grande profissional, exemplo de generosidade, minha fonte de inspiração. Minha família, meu porto seguro, meu tudo.

EPÍGRAFE

“A ciência nunca resolve um problema sem criar, pelo menos, outros dez.”

George Bernard Shaw

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
3. CAPÍTULO 1 <i>Leptospira</i> spp. em primatas neotropicais: caracterização imuno-histoquímica e inquérito sorológico	22
Resumo.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e Métodos.....	25
3. Resultados.....	26
4. Discussão.....	27
Conclusão.....	32
Agradecimentos.....	33
Referências.....	34
4. CAPÍTULO 2 Aspectos imuno-histoquímicos e sorológicos da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em primatas neotropicais	42
Resumo.....	43
1. Introdução.....	44
2. Material e Métodos.....	45
3. Resultados.....	46
4. Discussão.....	46
Agradecimentos.....	48
Referências.....	49
5. CONCLUSÕES	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

FIGURA 1 IHQ <i>Leptospira</i> spp. A) Pulmão. Imunomarcção no interstício, 200X. B) Pulmão. Imunomarcção no interstício macrófagos, 400X. C) Fígado. Imunomarcção difusa entre sinusoides e hepatócitos, 400X. D. Rim. Imunomarcção no interstício e células tubulares. 400X.....	40
--	----

4. CAPÍTULO 2

FIGURA 1 IHQ <i>T. gondii</i> . A) Pulmão. Imunomarcção em células intersticiais. Cisto e taquizoítos. Cisto em macrófago, 400X. B) Fígado. Imunomarcção em hepatócitos e em células de Kupffer, em áreas de degeneração e necrose hepatocelular. Cistos e taquizoítos, 400X. C) Cérebro. Imunomarcção junto à encefalite necrotizante. Cistos e taquizoítos, 400X. D) Cérebro. Imunomarcção no neurópilo, taquizoítos. 400X.....	54
---	----

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

TABELA 1	Distribuição e frequência das imunomarcações, detectadas por IHQ, observadas em cada órgão analisado dos 52 primatas infectados por <i>Leptospira</i> spp., necropsiados no LPA da FAMV-UPF.....	38
TABELA 2	Frequência de primatas soropositivos, sorovares prevalentes e respectivas diluições do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), aplicado em amostras sorológicas de primatas dos gêneros <i>Sapajus</i> e <i>Alouatta</i> , cativos do Zôo da Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.....	39

4. CAPÍTULO 2

TABELA 1	Formas evolutivas, distribuição e frequência das imunomarcações, detectadas por IHQ, observadas em cada órgão analisado dos 26 primatas infectados por <i>Toxoplasma gondii</i> , necropsiados no LPA da FAMV-UPF.....	52
TABELA 2	Prevalência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> , realizado por <i>screening</i> , em primatas do gênero <i>Sapajus</i> e <i>Alouatta</i> , cativos no Zôo, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAMV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
HAI	Hemaglutinação Indireta
HE	Hematoxilina-eosina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IFD	Imunofluorescência direta
IgG	Imunoglobulina G
IHA	Indirect haemagglutination
IHC	Immunohistochemistry
IHQ	Imuno-histoquímica
LPA	Laboratório de Patologia Animal
MAT	Microscopic agglutination test
ml	Mililitros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
SAM	Soroaglutinação microscópica
UPF	Universidade de Passo Fundo
°C	Graus Celsius
µl	Microlitros

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

LEPTOSPIROSE E TOXOPLASMOSE EM PRIMATAS: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ESTUDO SOROLÓGICO

Autora: Marta Regina Grumann
Orientadora: Adriana Costa da Motta
Passo Fundo, setembro de 2015

O presente trabalho descreve um estudo sobre diagnóstico imuno-histoquímico e sorológico acerca da leptospirose e toxoplasmose em primatas não humanos. No *capítulo 1* o objetivo consistiu em detectar animais infectados por *Leptospira* spp., assim como observar a distribuição das marcações do agente nos fragmentos de cada tecido. Foi realizado teste de imuno-histoquímica (IHQ), nos tecidos de primatas recebidos no Laboratório de Patologia Animal (LPA), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF), para necropsia, entre os anos 2000 e 2014, assim como um estudo sorológico nos primatas cativos do Zôo - UPF. Dos 101 primatas testados para *Leptospira* spp., 51,48% apresentaram positividade, com marcações distribuídas entre pulmão (76,92%), fígado (44,23%) e rins (32,69%). Além disso, realizou-se uma pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp., efetuada através da soro-aglutinação microscópica (SAM), a qual demonstrou positividade em 90,47% em uma população de 21 primatas, com os sorovares *sejroe* e *panama* entre os mais frequentes, obtendo uma similaridade de 20,83% cada. No *capítulo 2*, da mesma forma, objetivou-se verificar a presença e padrão de distribuição do *T. gondii*, nos tecidos de primatas recebidos para necropsia, no LPA da FAMV-UPF, entre os anos 2000 e 2014, através da IHQ. Dos 98 primatas que foram testados para *T. gondii*, 26,53% foram positivos, e as imunomarcações apresentaram variadas distribuições entre pulmão (76,92%), fígado (58,33%), coração (50%), cérebro (42,30%) e rins (23,07%). Adicionalmente, um inquérito sorológico foi executado nos primatas do gênero *Sapajus* e *Alouatta*, cativos do Zôo-UPF. O teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, realizado através da hemaglutinação indireta (HAI), exibiu reatividade em 85,7% dos animais, dentre os quais todos pertenciam ao gênero *Sapajus*, enquanto os três pertencentes ao gênero *Alouatta* apresentaram-se soronegativos (14,3%). Em conclusão, a IHQ permitiu detectar a presença de *Leptospira* spp. e *Toxoplasma gondii*, demonstrando ser uma ferramenta de alta aplicabilidade

do diagnóstico *post mortem* das enfermidades causadas por estes patógenos. Além disso, os primatas neotropicais do Zôo-UPF demonstraram uma alta frequência de infecção pelos agentes em questão.

Palavras-chave: imuno-histoquímica, *Leptospira* spp., primatas, *Toxoplasma gondii*, zoonose

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**LEPTOSPIROSIS AND TOXOPLASMOSIS IN PRIMATES: MOLECULAR
DIAGNOSIS AND SOROLOGICAL STUDY**

Author: Marta Regina Grumann
Advisor: Adriana Costa da Motta
Passo Fundo, setembro de 2015

This work describes a study of immunohistochemical and serological diagnosis of *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* infection, in nonhuman primates. In *Chapter 1* the objective was detect animals infected with *Leptospira* spp., as well as observing the distribution of agent's immunostainings on tissues fragments. It was performed by immunohistochemistry (IHC) test, carried out on primates' tissues, received at the Laboratório de Patologia Animal (LPA), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) of the Universidade de Passo Fundo (UPF), for necropsy, between years 2000 and 2014. A serological study, in the captive primates of the Zoo – UPF, was also conducted. Among the 101 primates tested by IHC for *Leptospira* spp., 51.48% were positive, with stainings distributed among lung (76.92%), liver (44.23%) and kidneys (32.69%). The detection of anti-*Leptospira* spp. antibodies, performed by microscopic agglutination test (MAT), has showed positivity in 90.47% in a population of 21 primates, with *sejroe* and *panama* serovars between the most frequent, obtaining a similarity of 20.83% each one. In the *Chapter 2*, similarly, the objective was to verify the presence and distribution pattern of *T. gondii*, in the tissues of primates received for necropsy, at the LPA of FAMV-UPF, at the same period. The test was performed by IHC. Among the 98 primates, tested for *T. gondii*, 26.53% showed positive immunostainings, with different distribution between lung (76.92%), liver (58.33%), heart (50%), brain (42,30%) and kidney (23.07%). A serological survey for *T. gondii* has been also performed in primates of the genus *Sapajus* and *Alouatta*, captives of the Zoo-UPF. The test was carried out by indirect hemagglutination (IHA), showing reactivity in 85.7% of animals, which all belonged to the genus *Sapajus*, while the three of *Alouatta* genera, presented themselves seronegative (14.3 %). In conclusion, the IHC allowed to detect the presence of *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* in the primates tissues, demonstrating be a test with high applicability in the post mortem leptospirosis and toxoplasmosis diagnosis. In addition, the neotropical primates of the Zoo-UPF, showed a high frequency of infection by these agents.

Key words: immunohistochemistry, *Leptospira* spp., primatas, *Toxoplasma gondii*, zoonosis

1. INTRODUÇÃO

Os animais selvagens, na natureza e em cativeiro, como os primatas e os carnívoros, participam como portadores ou reservatórios de zoonoses. Ambientes como os zoológicos são propícios à disseminação de doenças, dentre estas a leptospirose (1) e a toxoplasmose (2).

A leptospirose tem adquirido uma importância gradual em relação aos primatas não humanos, pois tendem a tornarem-se reservatórios, carregando e eliminando o patógeno através do tecido renal, representando um risco, também, para outras espécies que habitam zoológicos e criatórios, além dos humanos que trabalham nestes ambientes ou os visitam (3,4). O diagnóstico da enfermidade em primatas é difícil, pois os sinais clínicos e lesões são menos evidentes, além da detecção dos anticorpos, que é passível de ocorrer por curtos períodos (4). O diagnóstico sorológico, adquirido pela SAM, é considerado padrão-ouro para leptospirose (5). No entanto, o diagnóstico anatomopatológico, além de levar em consideração as lesões características, permite, também, utilizar métodos complementares como a Imunofluorescência direta (IFD) e a IHQ, as quais apresentam uma boa empregabilidade e especificidade (6,7,8).

Além da leptospirose, muitos são os relatos de ocorrência de toxoplasmose em primatas do Novo Mundo (9,10,11), os quais apresentam-se mais sensíveis que os primatas do Velho Mundo (2) e raramente sobrevivem quando infectados (12). O diagnóstico sorológico compreende a detecção de anticorpos através de métodos como, por exemplo, HAI (13), enquanto que na patologia, exames imuno-histoquímicos já demonstraram ser capazes de indicar a presença de *T. gondii* em numerosos órgãos, com variações na intensidade das marcações (14).

Nos últimos anos, na rotina do LPA, FAMV-UPF, têm sido observados casos de leptospirose em primatas neotropicais, além de achados histopatológicos compatíveis com toxoplasmose em diversos órgãos. No Norte do Rio Grande do Sul desconhecem-se estudos de diagnóstico imuno-histoquímico e sorológico sobre tais enfermidades nessas espécies. Portanto, uma investigação sobre esses agentes infecciosos foi realizada e descrita em dois capítulos. O primeiro capítulo relata a verificação de *Leptospira* spp., através de IHQ, em tecidos de primatas recebidos para exame anatomopatológico no LPA da FAMV-UPF, no período entre 2000 e 2014, além de um inquérito sorológico para essa enfermidade, nos primatas do gênero *Alouatta* e *Sapajus*, cativos do Zôo-UPF. Este capítulo, intitulado “**Leptospira spp. em primatas neotropicais: caracterização imuno-histoquímica e inquérito sorológico**” será traduzido para a língua inglesa e submetido para publicação no

periódico *Ciência Rural*, na forma de artigo científico. O segundo capítulo descreve um estudo imuno-histoquímico, para detectar *Toxoplasma gondii*, realizado a partir das mesmas secções de tecidos, e um inquérito sorológico, realizado igualmente nos primatas pertencentes ao Zôo - UPF. Tal trabalho consiste de um artigo científico, intitulado “**Aspectos imuno-histoquímicos e sorológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em primatas neotropicais**”, submetido para publicação no periódico *Semina: Ciências Agrárias - Uel*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose e a toxoplasmose são zoonoses de ampla distribuição geográfica (2), ambas cosmopolitas (2,15). Os animais selvagens na natureza e em cativeiro, como os primatas, participam como portadores ou reservatórios de zoonoses, que incluem a toxoplasmose e a leptospirose (1,16,17).

Em ambientes como zoológicos, a infecção e a disseminação de agentes podem ocorrer para os animais do próprio zoológico, funcionários e visitantes (18). Assim, os zoológicos são ambientes propícios à propagação de doenças, uma vez que há uma ampla variedade de espécies selvagens vivendo sob condições diferentes do seu habitat (19). Além disso, os zoológicos constituem importantes fontes de informação para investigações de doenças transmissíveis, uma vez que os animais encontram-se em situações controladas (18,20).

A espiroqueta patogênica do gênero *Leptospira* é eliminada no meio ambiente através da urina de animais infectados, e a doença pode variar desde um processo assintomático, não perceptível, ou levar o indivíduo ao óbito (15). A leptospirose é um importante problema de saúde pública, em regiões de clima tropical e subtropical, favorecida pelas condições ambientais (16). Desta forma, espécies domésticas e selvagens, com infecções subclínicas, tornam-se reservatórios e eliminam as leptospiras na urina, representando um risco iminente para a população (16,21). Além disso, estes hospedeiros podem carrear diversos sorovares de leptospiras, simultaneamente (16).

A transmissão da doença pode ocorrer por contato com ambientes aquáticos contaminados pela urina dos animais reservatórios, que são, principalmente, os roedores e carnívoros (16,22). A leptospirose é transmitida ao homem por contato direto com urina, sangue, tecidos ou órgãos de animais infectados, ou por contato indireto, através da água, solo úmido ou vegetação contaminada. O agente penetra através de lesões na pele ou de mucosas íntegras (orofaríngeana, nasal, ocular, e genital), ou também na pele sadia, desde que submersa em água contaminada por longo período (15).

As leptospiras podem não ter alta especificidade por determinados hospedeiros, no entanto, vários sorovares podem causar doença em diferentes espécies. Observa-se, também, uma considerável distinção de sinais clínicos, hematológicos e de lesões, nas doenças causadas por diferentes sorovares de *Leptospira* spp. A *Leptospira icterohemorrhagiae* e a *Leptospira canicola*, por exemplo, quando localizadas nos hepatócitos, podem resultar em

lesão hepática aguda, aumento da atividade das enzimas hepáticas e hiperbilirrubinemia (23,24).

Em um estudo anatomopatológico, retrospectivo, realizado em 53 casos de leptospirose em cães, na Região Central do Rio Grande do Sul, o diagnóstico de leptospirose foi confirmado por IHQ do tecido renal (8). Em humanos foram relatados casos de insuficiência respiratória aguda associada à leptospirose. O diagnóstico foi realizado *ante mortem* por hemocultura, apresentando positividade para *Leptospira interrogans* sorovar *copenhageni*. Microscopicamente, ao exame de IHQ, foram constatadas leptospirosas em células mononucleares dos septos interalveolares, marcadas com anticorpo monoclonal (23).

Para o diagnóstico de leptospirose, o procedimento laboratorial mais simples é a demonstração de títulos de anticorpos em elevação nas amostras pareadas de soro, colhidas na fase aguda e na fase convalescente da doença. É possível, também, verificar a demonstração de microorganismos por microscopia de campo escuro em líquidos orgânicos e emulsões teciduais, o que requer que os tecidos sejam frescos. Na patologia, o método convencional para o diagnóstico é o emprego da coloração de Warthin-Starry, no qual as espiroquetas são visualizadas na cor negra (24,25). O diagnóstico de leptospirose também pode ser obtido por IFD através de impressões de fígado e rins, coletados durante a necropsia (6,7). Para casos em que durante a necropsia não se suspeita de leptospirose, porém observam-se lesões sugestivas da enfermidade durante o exame histopatológico, o diagnóstico pode ser realizado através de IHQ (8,26).

Em primatas, a leptospirose é considerada rara, embora já tenham sido relatados alguns surtos (26,27,28). A incidência de leptospirose nesses animais, em vida livre ou em cativeiro, está relacionada com a presença de roedores infectados com a espiroqueta. O contato direto com a urina, líquido placentário e leite, constituem as principais formas de transmissão (4). No que se refere aos primatas em cativeiro, o livre acesso de roedores hospedeiros da espiroqueta aos recintos e, portanto, às fontes de alimentos e água, compõe o principal contribuinte para a proliferação do agente (29).

Com o avanço da biotecnologia em diagnóstico rápido e de precisão, a identificação de agentes infecciosos, como bactérias do gênero *Leptospira* spp., tem sido cada vez mais constante. O uso de técnicas moleculares como a PCR, ELISA, Soroaglutinação e IHQ na medicina humana, bem como na medicina veterinária, tem sido de grande valia. Muitas doenças infectocontagiosas, como a leptospirose, outrora negligenciada pelos profissionais quanto a sua ocorrência em animais cativos, tais como os primatas, podem ser facilmente

detectadas. Portanto, através dessas ferramentas diagnósticas, o potencial zoonótico do agente é comprometido, pois o conhecimento acerca da ocorrência da enfermidade ou mesmo da presença do agente no estabelecimento, fornece subsídios para a elaboração de medidas de controle, além de fornecer dados quanto ao seu impacto na saúde pública (26,30,31,32).

A toxoplasmose é considerada uma das doenças mais prevalentes e difundidas mundialmente, sobretudo em animais selvagens de cativeiro e de vida livre, bem como em animais domésticos e no homem. É causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário, coccídio intracelular obrigatório (2). Os felídeos, silvestres ou domésticos, são os hospedeiros definitivos. Nestes, ocorre a multiplicação enteroepitelial do parasita que levará à produção e eliminação de oocistos pelas fezes e à contaminação do ambiente (34). Dependendo das condições climáticas, de umidade e temperatura, em cinco dias, os oocistos tornam-se infectantes (2).

Em primatas não humanos, cativos ou de vida livre, a toxoplasmose é considerada uma doença parasitária fatal. Há vários surtos relatados em primatas neotropicais, mundialmente (9,11,34,35,36,37,38), assim como no Brasil (14,39,40,41). Primatas neotropicais demonstram uma maior suscetibilidade à toxoplasmose, apresentando-se mais vulneráveis que os primatas do Velho Mundo (18,42,43). No entanto, esta vulnerabilidade não está esclarecida (14,42,43). É possível que durante a evolução, devido ao hábito arborícola das espécies neotropicais, estes estiveram isolados das fezes de felídeos e, portanto, do contato com oocistos de *T. gondii* tornando-se, assim, mais sensíveis à enfermidade (43).

A transmissão da toxoplasmose pode ocorrer através da ingestão de oocistos esporulados devido à contaminação fecal de alimentos e água, ingestão de taquizoítos, bradizoítos e/ou cistos teciduais pelos carnívoros ou, ainda, por infecção transplacentária, em hospedeiros intermediários (23,33,44).

Quanto às formas clínicas, a toxoplasmose pode se apresentar na forma aguda ou crônica, dependendo da interação parasita-hospedeiro (23,33,43). O estado imunológico e a espécie infectada são considerados os fatores mais importantes no que se refere à evolução da doença no hospedeiro (14,33,43). Os órgãos mais afetados nos casos agudos da enfermidade são os pulmões, fígado, baço, linfonodos, intestino e cérebro. Nestes, as lesões são provenientes da replicação intracelular e ruptura de células hospedeiras pelos taquizoítos, resultando em necrose tecidual (23). A infecção torna-se crônica quando o hospedeiro adquire resistência, sendo possível observar a presença de cistos no cérebro, músculo esquelético e coração (23,45). Além destes, podem ser acometidos a muscular da mucosa, pâncreas, útero,

placenta e feto. A toxoplasmose é caracterizada por sinais nervosos, gastrointestinais, pneumonia e pancreatite, além de representar uma importante causa de aborto (23,46,47).

Um inquérito sorológico sobre a ocorrência de leptospirose e toxoplasmose em primatas e carnívoros selvagens neotropicais, mantidos em cativeiro, em um Zoológico do Nordeste do Brasil, descreveu pela primeira vez a ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp., sorovar *copenhageni*, em um macaco-prego-de-peito-amarelo (*C. xanthosterus*), primata ameaçado de extinção (19). Outras investigações sorológicas sobre estas zoonoses, em animais selvagens de cativeiro, têm sido realizadas em zoológicos brasileiros (17,32,47,48,49,50,51,52).

A infecção por *T. gondii*, no homem e nos animais, ocorre normalmente pela ingestão de carne crua ou mal cozida, ou pela ingestão de oocistos infectantes, eliminados nas fezes de felídeos, que contaminam o solo e a água. A incidência de toxoplasmose é descrita em muitas espécies de animais silvestres, o que indica que o agente circula ativamente em habitats distintos. (45).

3.CAPÍTULO 1

***Leptospira* spp. em primatas neotropicais: caracterização imuno-histoquímica e inquérito sorológico**

Marta Regina Grumann¹, Zigomar da Silva², Tanise Policarpo Machado ², José Roberto Silva Filho^{1,5}, Marcio Machado Costa³, Maria Isabel Botelho Vieira^{1,4}, Adriana Costa da Motta^{1,2}

(Artigo submetido ao periódico *Ciência Rural*)

¹Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²Laboratório de Patologia Animal (LPA), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

³Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Veterinário, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

⁴ Laboratório de Doenças Parasitárias, Hospital Veterinário, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.

⁵Zôo – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.

*Corresponding author: A.C da Motta. Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação. Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, Km 171, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99001-970, Brasil. Email: acmotta@upf.br

RESUMO

*A leptospirose é considerada a zoonose geograficamente mais difundida no mundo, levando em consideração as condições ambientais e higiênico-sanitárias. Animais selvagens, na natureza e em cativeiro, podem participar como portadores ou reservatórios da **Leptospira spp.** Levando em consideração o número expressivo de casos compatíveis com leptospirose em primatas neotropicais, necropsiados no Laboratório de Patologia Animal (LPA), da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF), o presente estudo teve como objetivo detectar a presença de **Leptospira spp.**, através da imuno-histoquímica (IHQ), e verificar o padrão de distribuição do agente em tecidos de primatas necropsiados. Entre os 101 primatas testados para **Leptospira spp.**, 51,48% apresentaram positividade, com marcações distribuídas entre pulmão (76,92%), fígado (44,23%) e rins (32,69%). Foi realizada, também, uma pesquisa de anticorpos anti-**Leptospira spp.** no Zôo-UPF, através da soroaglutinação microscópica (SAM,) a qual demonstrou positividade em 90,47% em uma população de 21 primatas, com os sorovares *sjroe* e *panama* entre os mais frequentes.*

Palavras-chave: diagnóstico, imuno-histoquímica, **Leptospira spp.**, primatas, zoonose

1. Introdução

A leptospirose é uma enfermidade de vasta distribuição que acomete, além dos animais silvestres, animais domésticos e o homem, assumindo um caráter zoonótico e epidêmico, com maior frequência em regiões de clima tropical e em desenvolvimento (BHARTI et al., 2003). A ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira spp.*, bem como um amplo número de sorovares, já foram identificados em populações de primatas neotropicais, *in situ* e *ex situ*, os quais podem atuar como portadores assintomáticos (CORRÊA et al., 2004; PIMENTEL et al., 2009). Para este e outros microrganismos, a ligação com a célula do hospedeiro é o primeiro passo na sua patogênese, seguido de invasão e escape das respostas imunológicas (VIEIRA et al., 2002). Os danos às células endoteliais de capilares estão ligados à causa básica das manifestações clínicas e lesões, envolvendo danos renais, hepáticos, miocárdicos e pulmonares (HILL & SANDERS, 1997).

O diagnóstico *post mortem* de leptospirose é um desafio para os patologistas, visto que o método convencional para o diagnóstico, a impregnação pela prata utilizando a técnica de Warthin-Starry (WS), é passível de resultados duvidosos (ADIN & COWGILL, 2000). No entanto, o diagnóstico de leptospirose pode ser obtido através da imunofluorescência direta (IFD), empregada em impressões de rins, coletadas durante a necropsia (PESCADOR et al., 2004). Para casos em que durante a necropsia não há suspeita da doença, porém, observam-se lesões sugestivas através do exame histopatológico, a imuno-histoquímica (IHQ) é indicada e apresenta uma boa especificidade (GIRIO et al., 2004). Essas técnicas moleculares podem ser consideradas uma importante ferramenta em diagnóstico e pesquisa, permitindo ao patologista uma avaliação mais consistente em tecidos de primatas não humanos (MANSFIELD et al., 2013).

As provas diagnósticas incluem a reação em cadeia de polimerase (PCR), diagnóstico sorológico, pela aplicação de métodos como ELISA e radioimunoensaio, ou também pela detecção de anticorpos, representado pela aglutinação microscópica (MAT), a qual é considerada padrão ouro no diagnóstico da leptospirose (GARCIA-VASQUEZ et al., 2010) e recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (LEVETT, 2001).

Devido a um número significativo de casos sugestivos de leptospirose observados em primatas neotropicais, necropsiados no Laboratório de Patologia Animal da Universidade de Passo Fundo (LPA-UPF), e pelo desconhecimento da ocorrência da enfermidade na população da qual provinham estes animais, o presente estudo teve como objetivo detectar a

presença e o padrão de distribuição da *Leptospira spp.* nos tecidos destes primatas, através da IHQ. Além disso, levando-se em consideração a ausência de informações sobre o papel destes mamíferos selvagens como reservatórios do patógeno, objetivou-se, também, realizar um inquérito sorológico nos primatas neotropicais cativos no Zôo – UPF.

2. Material e Métodos

Imuno-histoquímica e verificação anatomopatológica

Foram estudados, a partir do arquivo de blocos, todos os primatas encaminhados ao LPA-UPF para necropsia, entre os anos 2000 e 2014. As lâminas, coradas em hematoxilina e eosina (HE), de todos os casos, foram revisadas em microscópio óptico e os achados de necropsia foram averiguados.

A seleção dos casos foi baseada nos seguintes critérios: disponibilidade dos blocos de parafina e grau de autólise dos tecidos. Dos 113 primatas encaminhados para necropsia, 12 foram totalmente descartados por inviabilidade de material.

Para realização da IHQ foram selecionados blocos de fígado, rins e pulmão para pesquisa de *Leptospira spp.* (SILVA et al., 2002; CULLEN, 2007). Sequencialmente, os blocos de parafina foram submetidos ao método da streptavidina-biotina-peroxidase, acrescentando o cromógeno diaminobenzidina (DAB) para verificar as imunomarcações. Utilizou-se o anticorpo policlonal anti-*Leptospira* HRP conjugado ViroStat (código 401) na diluição de 1:100. Os cortes foram contracorados com hematoxilina e analisados em microscópio óptico. Controles positivos foram inseridos, simultaneamente, a partir de casos positivos, previamente testados (OLIVEIRA et al., 2009).

Inquérito sorológico

Esta pesquisa foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Passo Fundo, RS, sob o parecer nº 006/2013 e registro nº 015/2012.

Foram coletadas amostras de sangue de 21 primatas, 17 da espécie *Sapajus nigritus*, um *Sapajus apella* e três *Alouatta guariba*, cativos do Zôo da Universidade de Passo Fundo (UPF). Para a colheita das amostras, foi realizado o procedimento padrão de contenção física, utilizando-se puçá e luvas de couro. A venopunção foi realizada através da femoral, obtendo-

se 3 ml de sangue de cada animal. As amostras foram centrifugadas e os soros separados em alíquotas.

Para a análise de anticorpos anti-*Leptospira spp.*, as amostras foram acondicionadas e submetidas à técnica de Soro Aglutinação Microscópica (SAM) (COLE et al., 1973), com antígenos vivos, a qual permitiu testar os seguintes sorovares: *andamana*, *australis*, *autumnalis*, *bataviae*, *balun*, *canicola*, *castellonis*, *celledoni*, *cynopteri*, *copenhageni*, *djasiman*, *gripphotyphosa*, *hardjo*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *panama*, *patoc*, *pomona*, *pyrogenes*, *sejroe*, *shermani*, *tarassovi* e *wolffi*.

Análise estatística

A partir dos dados obtidos, através da IHQ e sorologia, uma estatística descritiva foi utilizada para verificar a frequência absoluta (total) e a frequência relativa (percentual) dos resultados.

3. Resultados

Imuno-histoquímica e verificação anatomopatológica

Dos 101 primatas que foram testados para *Leptospira spp.*, 52 apresentaram marcação, totalizando 51,48% positivos. Em relação ao gênero dos primatas estudados, o *Alouatta* foi o mais frequente, com um total de 31 positivos (59,62%), seguido de *Callithrix sp.*, com 10 positivos (19,23%), *Sapajus* com 7 positivos (13,46%), *Papio* com 1 positivo (1,92%) e, entre os que não possuíam identificação, 3 positivos (5,77%).

Entre os 52 que apresentaram positividade, 40 apresentaram imunomarcação no pulmão (76,92%), 23 no fígado (44,23%) e 17 nos rins (32,69%). Além disso, 18 casos apresentaram somente no pulmão (34,61%), 8 no fígado (15,38%) e 2 nos rins (23,84%) Os 24 restantes apresentaram marcação, simultaneamente, em dois ou mais órgãos (46,15%).

As marcações observadas estavam distribuídas de forma única ou de forma distinta no mesmo tecido conforme apresentadas na tabela 1.

Os achados de necropsia mais relevantes consistiram de mucosas pálidas, congestas, ictéricas ou hiperêmicas; subcutâneo com icterícia e/ou edema; líquido sero-hemorrágico nas cavidades, ascite ou hidrotórax. Constatou-se, ainda, edema, congestão e/ou hemorragia

pulmonar; fígado com acentuação do padrão lobular, icterícia e/ou áreas pálidas; rins congestos, pálidos, icterícos e/ou com evidenciação das estrias corticais. Quanto à histopatologia, os principais achados do fígado, rins e pulmão constituíram-se, respectivamente, de dissociação de hepatócitos, degeneração e necrose hepatocelular, colestase intrahepatocitária e/ou intracanalicular, além de hepatite periportal não supurativa; nefrose com cilindros hialinos e nefrite intersticial não supurativa; congestão, hemorragia, edema e pneumonia intersticial supurativa, não supurativa ou fibrinossupurativa.

Sorologia

O teste sorológico para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira spp.* demonstrou positividade em 19/21 (90,47%) dos primatas, apresentando-se, em sua maioria, sororreativos para mais de um sorovar e com titulações distintas. Os dois sorovares mais prováveis para esta população foram o *sjroe* e *panama*, com uma frequência de positividade pariforme de 20,83%; seguida de *andamana* com 18,75%; *autumnalis* com 12,50%; *wolffi* com 8,33%; *icterohaemorrhagiae* com 6,25%; *copenhageni* e *tarassovi* com 4,17%; *celledoni* e *castellonis* com 2,08%. As reações foram observadas nas seguintes diluições: 1/100, com uma frequência de 62,50%, seguida de 1/200 com 25% e, por fim, de 1/400 com 8,33% (tabela 2).

4. Discussão

Na avaliação da técnica de IHQ, em fragmentos de sistema nervoso central (SNC) de bovinos e equinos, infectados naturalmente pelo vírus da raiva, a IHQ demonstrou ser uma técnica de boa sensibilidade em tecidos extraídos de bovinos em relação aos de equinos, especialmente em cortes de cerebelo e tronco encefálico (ACHKAR et al., 2010). Embora a determinação da especificidade e sensibilidade não tenha sido exequível, o presente estudo permitiu constatar os benefícios da IHQ em estudos retrospectivos, em que as amostras encontravam-se armazenadas em blocos de parafina, por um curto ou longo período de tempo (OLIVEIRA et al., 2009; TOCHETTO et al., 2012).

Em contrapartida, estudos indicam que, embora a IHQ represente um excelente método para veterinários patologistas na observação de antígenos, apesar de apresentar alta especificidade, a técnica demonstra baixa sensibilidade (VAN MAANEN et al., 2004). Além disso, a técnica requer diversos procedimentos e passos, os quais podem ser passíveis de erros durante a sua execução, mesmo quando conduzida por laboratoristas experientes e com a

utilização de bons anticorpos (WARD & REHM, 1990; MIKAELIAN et al., 2004). Dentre estes erros está o “background”, que representa uma coloração inespecífica, causada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), na cor marrom, e pode, muitas vezes, ser interpretada erroneamente (WARD, 2004), como percebido em nosso estudo. Além do background, a deposição do cromógeno em estruturas que não deveriam conter o antígeno, também pode gerar falsas interpretações. As causas destas marcações inespecíficas parecem estar relacionadas a diversos fatores como: peroxidase endógena; biotina endógena (presente em maiores concentrações no fígado e rins); concentração inadequada do anticorpo e identificação errônea de pigmentos (melanina e hemossiderina) (WIECZOREK et al., 1997; BARRA, 2006; RAMOS-VARA et al., 2008).

Alterações provocadas pela autólise também podem dificultar a interpretação das reações, e as chances de reatividade em tecidos autolíticos diminuem em 0,33 vezes em comparação com lâminas obtidas de tecidos viáveis (OLIVEIRA et al., 2009). Por esta razão, em apenas um dos casos em que o fígado encontrava-se com um pequeno grau de autólise, foi possível visualizar as leptospiros.

Diferenças de intensidade nas imunomarcações teciduais foram observadas nos cortes histológicos testados para *Leptospira spp.* Além disso, em algumas amostras, os agentes encontravam-se aparentemente fragmentados ou em marcação difusa, sendo consideradas igualmente positivas àquelas em que o agente encontrava-se com morfologia preservada, sem distorções. Ambas as situações são passíveis de positividade (ELLIS et al., 1983; SCANZIANI, 1991; HAANWINCKEL et al., 2004), embora possam ser considerados positivos somente os casos em que as leptospiros são visualizadas morfologicamente inalteradas (STERNBERGER et al., 1970; ZAMORA et al., 1995). Apesar de considerarmos positivas as imunomarcações difusas e as formas fragmentadas, destacamos a relevância da avaliação do tecido como um todo, visto que se trata de uma técnica com probabilidade de falhas (WARD & REHM, 1990).

Em nosso estudo constatamos que, em muitos casos, a *Leptospira spp.* foi observada somente em um dos órgãos testados. No entanto, os demais também apresentavam lesões compatíveis com a leptospirose, embora nestes não houvesse imunomarcações. Tal fato foi também constatado por GÍRIO et al. (2004), com imunomarcação somente no fígado de um porco-monteiro, que apresentava, também, lesões renais sugestivas da enfermidade. A ausência da imunomarcação não determina a ausência do agente no tecido, pois muitas podem

ser as razões que impedem tais reações, como por exemplo, a distribuição ao acaso das leptospiras nos tecidos fixados, levando à ausência do agente em alguns campos observados (ELLIS et al., 1983; HAANWINCKEL et al., 2004). Embora o mecanismo final da degradação de antígenos seja ainda desconhecido, as oxidações químicas, térmicas ou fotônicas têm sido propostas para justificar a diminuição na imunorreatividade (BLIND et al., 2008). A influência da luz e temperatura, nesse contexto, já foi previamente comprovada, no entanto não é possível afirmar se o mecanismo resulta da oxidação ou outras modificações químicas do tecido (RAMOS-VARA et al., 2013). Ademais, a adição de antioxidantes na composição da parafina utilizada para a inclusão dos fragmentos de órgãos, não impede a degradação dos antígenos presentes nos mesmos (DIVITO et al., 2004).

Entre os 52 primatas que apresentaram positividade na IHQ, a maior parte (76,92%) apresentou algum tipo de marcação no tecido pulmonar, o que demonstra um alto índice de acometimento deste órgão, pela infecção por *Leptospira spp.* Tais marcações estavam presentes no interstício, capilares alveolares, macrófagos e parede do bronquíolo. Não obstante os nossos resultados demonstrem uma maior distribuição das marcações, estes ainda corroboram com a forma pulmonar grave da leptospirose em humanos, em que as reações imuno-histoquímicas revelaram marcações granulares sutis, demonstrando o agente engolfado por macrófagos, em septos e alvéolos (SILVA et al., 2002). Os métodos diagnósticos patológicos convencionais não possibilitam a detecção da *Leptospira spp.* no tecido pulmonar, destacando a importância da IHQ, tanto no diagnóstico como na evidência de antígenos do microrganismo nas áreas afetadas, permitindo uma melhor compreensão acerca da patogenia da doença (ELLIS et al., 1983).

As leptospiras, em sua maioria, foram observadas entre sinusoides, hepatócitos e, por vezes, nas células de Kupffer. Similarmente, em fígado de cobaias, a presença de leptospiras foi verificada não somente nas células de Kupffer, mas também aderidas à membrana plasmática dos hepatócitos (BRITO et al., 2006). Quando coradas com técnicas de impregnação de prata, essas espiroquetas apresentam-se esguias, espiraladas, bastante enroladas e com as extremidades em forma de gancho, localizando-se em sinusoides e no interior dos hepatócitos (JONES et al., 2000).

As marcações, observadas nos tecidos renais, formavam pequenos aglomerados de coloração marrom que, por vezes, encontravam-se dissociados e filiformes, localizados principalmente no lúmen tubular e, ocasionalmente, no interstício e glomérulos. Essas formas

de apresentação, marcação e disposição foram similares às observadas por SCANZIANI (1991), HAANWINCKEL et al. (2004) e também por AZIZI et al. (2014), através da técnica de WS, realizada em rins de bovinos abatidos.

Quanto aos aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães, os rins foram os órgãos de eleição para a execução da IHQ e confirmação diagnóstica da doença (TOCHETTO et al. 2012). Tendo em vista que o nosso estudo detectou o maior número de positivos no pulmão, com 76,92% dos casos, seguido do fígado com 44,23%, e o tecido renal, com somente 32,69%, defendemos que a técnica, quando aplicada a fragmentos desses três tecidos, diminui as chances de ocorrências de falsos negativos. Ademais, há uma peculiaridade em relação à patogenicidade para cada sorovar de *Leptospira spp*. Tal fator determina variações no curso clínico da moléstia, assim como nas lesões e tecidos acometidos pelo patógeno (BHARTI et al., 2003).

Em primatas a leptospirose é considerada rara, embora já tenham sido relatados alguns surtos (PEROLAT et al., 1992; REID et al., 1993). A incidência da doença nesses animais, em vida livre ou em cativeiro, está relacionada com a presença de roedores infectados com a espiroqueta. O contato direto com a urina, líquido placentário e/ou leite constituem as principais formas de transmissão (FAINE et al., 1999). No que se refere aos primatas em cativeiro, o livre acesso de roedores hospedeiros da espiroqueta aos recintos e, portanto, às fontes de alimentos e água, compõe o principal contribuinte para a proliferação do agente (BOLIM, 2003). As lesões mais comuns na leptospirose em diversas espécies, inclusive em fetos, consistem de icterícia, acentuação do padrão lobular hepático, evidenciação das estriações corticais renais e hemorragia intestinal. Microscopicamente, na coloração de HE, observa-se dissociação de hepatócitos, degeneração e necrose hepatocelular, além de colestase, nefrite intersticial não supurativa e nefrose (JONES et al., 2000; ZACHARY, 2013; TOCHETTO et al., 2012). Estudos anatomopatológicos sobre leptospirose em primatas são escassos. Em cães, a enfermidade ocorre, principalmente, de forma aguda a subaguda com lesões renais caracterizadas por degeneração e necrose do epitélio tubular, debris celulares e cilindros hialinos obstruindo os túbulos e nefrite intersticial não supurativa com graus variados de intensidade do infiltrado. No fígado, observa-se dissociação dos cordões dos hepatócitos e acúmulo de pigmento biliar no interior dos canaliculos, e necrose hepatocelular em alguns casos. No pulmão de cães com leptospirose relata-se lesão alveolar difusa com hemorragia e edema, além de capilarite, que consiste de agregados de neutrófilos no interior

de microvasos. (TOCHETTO et al., 2012). Em nosso estudo, os achados anatomopatológicos observados foram compatíveis com leptospirose e corroboram com a maioria dos achados supracitados.

As provas sorológicas para leptospirose incluem diversas técnicas diagnósticas, porém, o diagnóstico sorológico realizado por meio da SAM, representa o padrão ouro no diagnóstico da enfermidade (GARCIA-VÁZQUEZ et al., 2010). Considerando esse fato, somado à possibilidade de determinar os sorovares presentes, a SAM foi a prova sorológica de eleição. Embora exista a possibilidade de uma aglutinação cruzada, este teste abrange uma boa variedade de sorovares e a sensibilidade ainda é elevada (GARCIA-VÁZQUEZ et al., 2010). No presente estudo, a alta frequência de animais positivos, determinada pelo inquérito sorológico, foi consistente com os dados revelados pelo teste imuno-histoquímico. Assim, foi possível comprovar a alta prevalência do patógeno em populações de primatas neotropicais, na região estudada.

Inquéritos sorológicos já foram realizados em diversas populações de primatas, apresentando variações de frequência e de sorovares entre regiões. Dentre estes, destacaram-se: *ballum*, *icterohaemorrhagiae*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *panama*, *pomona*, *tarassovi* e *canicola* (BAULU et al., 1987); *castellonis*, *copenhageni* e *grippotyphosa* (CORRÊA et al. 2004); *cynopteri*, *andamana*, *hebdomadis*, *copenhageni*, *patoc*, *cuíca*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *grippotyphosa* e *autumnalis* (COSTA, 2009). A biodiversidade da *Leptospira* spp. em determinados ambientes é definida pelo clima, geografia e interações bióticas (VINETZ et al., 1996). Em regiões tropicais, com uma grande riqueza de espécies, animais silvestres e sinantrópicos, como ratos, morcegos e marsupiais, são portadores de alta prevalência do agente no tecido renal. (WILLIG, 2001; BRUNELL et al., 2000).

Em uma população de primatas do gênero *Sapajus*, pertencente a um criatório de animais selvagens da Colômbia, com 52 indivíduos, 37 (71%) apresentaram sinais clínicos e 14 (27%) foram a óbito. Somente dois animais positivos foram assintomáticos. Os sorovares identificados foram *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae* (SZONYI et al., 2011), demonstrando que a patogenicidade do agente está diretamente correlacionada com os índices de morbidade e mortalidade em uma população. Estes dois sorovares foram observados na sorologia dos primatas do presente estudo, ainda que de forma inexpressiva, representando uma ameaça à sanidade tanto dos sororreativos, como dos que compartilhavam o mesmo

recinto. Embora alguns sorovares considerados mais patogênicos tenham sido detectados em maior diluição, os animais encontravam-se assintomáticos no momento da colheita de material, situação semelhante à descrita por PIMENTEL et al., 2009 e FERREIRA et al., 2011. As razões pelas quais alguns pacientes apresentam manifestações clínicas graves e outros a sintomatologia é nula ou moderada, ainda são desconhecidas e podem estar ligadas não somente às características do agente, mas também a fatores relacionados ao hospedeiro como os genéticos, nutricionais e imunitários, por exposição prévia à *Leptospira spp.* (GARCIA-VÁZQUEZ et al., 2010).

Dados de correlação entre sorovar e doença são escassos, principalmente em estudos com primatas. O sorovar *andamana*, por exemplo, detectado em nosso inquérito sorológico, em diferentes titulações, pertence à espécie *L. biflexa*, é apatogênico e de vida livre. Entretanto, esse sorovar costuma reagir precocemente e apresenta reações cruzadas com sorovares patogênicos, sendo utilizado como marcador sorológico (AGUIAR et al., 2010). Outro isolado, o sorovar *autumnalis*, pertencente à espécie patogênica *L. nogushii*, também presente nesta população com positividade nas diluições 1/100 e 1/400, já foi previamente isolado em caprinos e ovinos (ARAÚJO NETO et al., 2008, HIGINO et al., 2010, ALVES et al., 2012) e em um paciente humano sintomático (SARAVANAN et al., 2000). Estes dados nos revelam os riscos da interação entre homens e animais, no que diz respeito à cadeia de transmissão da leptospirose.

Conclusão

A IHQ demonstrou eficácia no diagnóstico de leptospirose em primatas e deve ser utilizada de acordo com as características do caso a ser investigado. Além disso, permitiu concluir o diagnóstico nos casos em que não havia suspeita prévia da enfermidade, além de possibilitar observar, com precisão, a distribuição do agente nos tecidos testados, encontrados com maior frequência no pulmão.

O inquérito sorológico realizado nos permitiu confirmar a presença da *Leptospira spp.* na população de primatas neotropicais do Zôo – UPF, indicando, portanto, a possibilidade de produzir doença e levá-los a óbito. A frequência da enfermidade, revelada pela IHQ é condizente com esse resultado.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade de Passo Fundo (UPF), pelo apoio financeiro.

Referências

- ACHKAR, S.M. et al. Sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e eqüinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.211-218, 2010.
- ADIN, C.A.; COWGILL, L.D. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 casos (1990-1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.216, p.371-375, 2000.
- AGUIAR, D.M. et al. Aconticorpos anti-*Leptospira spp.* em ovinos do Município de Monte Negro. Estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.529-532, 2010.
- ALVES, C.J. et al. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslanados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.523-528, 2012.
- ARAÚJO NETO, J.O. et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Leptospira spp.* em rebanhos caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Rio Grande do Norte, Brasil. **Anais Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário**, p. 201-202, 2008.
- AZIZI, S. et al. Comparision of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect *Leptospira spp.* in kidneys of slaughtered cattle. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.81, art. 821, 6p, 2014.
- BARRA, M.B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, v.50, p.173-184, 2006.
- BAULU, J. et al. Leptospire in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaesus*) on Barbados. **Journal of Wildlife Disease**, v.23, p.60-66, 1987.
- BHARTI, A.R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.757-771, 2003.
- BLIND, C. et al. Antigenicity testing by immunohistochemistry after tissue oxidation. **Journal of Clinical Pathology**, v.61, p.79-83, 2008.
- BOLIN, C.A. **Leptospirosis**. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.R. (eds.) **Zoo and Wildlife Medicine**. 5th ed. Elsevier Science, Philadelphia, Pennsylvania. p. 699–702, 2003.

- BRITO, T. et al. Immunohistochemical and *in situ* hybridization of the liver and kidney in human leptospirosis. **Virchows Archives**, v.448, p.576-583, 2006.
- BRUNELL, J.E. et al. Detection of pathogenic *Leptospira spp.* infections among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.63, p.255-258, 2000.
- COLE JUNIOR, J.R. et al. Improved microtechnique for agglutination test. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.970-980, 1973.
- CORRÊA, S.H.R. et al. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p.189-193, 2004.
- COSTA, S.M. **Estudos de frequência de anticorpos contra *Leptospira interrogans* e *Trypanosoma cruzi* em soros sanguíneos de primatas neotropicais de cativeiro.** Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Pará. p.91, 2009.
- CULLEN, J.M. **Liver, Biliary System and Exocrine Pancreas** (2007) In: Pathology Basis of Veterinary Disease, McGavin M.D.; Zachary J.F., St. Louis, USA: Elsevier, 2007, 1478p.
- DIVITO, K.A. et al. (2004) Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. **Laboratory Investigation**, V.84, p.1071-1078, 2004.
- ELLIS, T.M. et al. Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. **Australian Veterinary Journal**, v.60, p.364-367, 1983.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: MediSci, 1999, 272p.
- FERREIRA, D.R.A. et al. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por *Leptospira spp.* em *Cebus spp.* mantidos em cativeiro no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.1019-1023, 2011.
- GARCIA-VÁZQUEZ, E. et al. Leptospirosis. **Medicine**, v.10, p.3896-3902, 2010.
- GIRIO, R.J.S. et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. **Ciência Rural**, v.34, p.165-169, 2004.

- HAANWINCKEL, M.C.S. et al. Avaliação da prova de Imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.293-301, 2004.
- HIGINO, S.S.S. et al. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p.525-527, 2010.
- HILL, M.K.; SANDERS, C.V. Leptospiral pneumonia. **Seminars in Respiratory Infections**, 12, 44-49, 1997.
- JONES, T.C. et al. **Patologia Veterinária. Manole: São Paulo**, 2000. 1415p
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.296-326, 2001.
- MANSFIELD, K.G. et al. Molecular Localization Techniques in the Diagnosis and Characterization of Nonhuman Primate Infectious Diseases. **Veterinary Pathology**, v.51, p.110-126, 2013.
- MIKAELIAN, I. et al. Antibodies that label paraffin-embedded mouse tissues: a collaborative endeavor. **Journal of Toxicologic Pathology**, v.32, p.181-191, 2004.
- OLIVEIRA, E.C. et al. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.131-136, 2009.
- PEROLAT, P. et al. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, p.538-545, 1992.
- PESCADOR, C.A. et al. Aborto equino por *Leptospira* spp. **Ciência Rural**, v.34, p.271-274, 2004.
- PIMENTEL, J.S. et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.1009-1014, 2009.
- RAMOS-VARA, J.A. et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.393-413, 2008.
- REID, H. A. et al. Leptospirosis in a White lipped tamarin (*Saguinus labiatus*). **Laboratory Animal Science**, v.43, p.258-259, 1993.

SARAVANAN, R. et al. *Leptospira autumnalis* isolated from a human case from Avadi, India, and the serovar's predominance in local rat and bandicoot populations. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.94, p.503-506, 2000.

SCANZIANI, E. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. **Research in Veterinary Science**, 50, 229-232, 1991.

SILVA, J.J.P. et al. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.395-399, 2002.

STERNBERGER, L.A. et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.18, p.315-333, 1970.

SZONYI, B. et al. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. **The Veterinary Journal**, v.188, p.237-239, 2011.

TOCHETTO, C. et al. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.430-443, 2012.

VAN MAANEN, C. et al. A interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine fetal tissues. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.351-364, 2004.

VIEIRA, O.V. et al. Phagosome maturation: aging gracefully. **Biochemical Journal**, v.366, p.689-704, 2002.

VINETZ, J.M. et al. Sporadic urban leptospirosis. **Annals of Internal Medicine**, v.125, p.794-798, 1996.

WARD, J.M. Controls for immunochemistry: is brown good enough? **Toxicologic Pathology**, v.32, p.273-274, 2004.

WARD, J.M.; REHM, S. Applications of immunohistochemistry in rodent tumor pathology. **Experimental Pathology**, v.40, p.301-312, 1990.

WIECZOREK, R. et al. Nonspecific nuclear immunoreactivity after antigen retrieval using acidic and basic solutions. **Journal of Histotechnology**, v.20, p.139-143, 1997.

WILLIG, M.R. Common trends with latitude. Levin SA (Ed.) **Encyclopedia of biodiversity**. San Diego, CA: Academic press, p.701-714, 2001.

ZACHARY, J.F. Mecanismos das infecções bacterianas. In: ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. (Eds.) Bases da Patologia em Veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 4, p. 147-187

ZAMORA, J. et al. Leptospirosis de roedores silvestres em el área rural de Valdivia. Pesquisa de *Leptospira interrogans* mediante inmunofluorescencia e inmunoperoxidase. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.24, p.115-118, 1995.

Tabela 1 – Distribuição e frequência das imunomarcações, detectadas por IHQ, observadas em cada órgão analisado dos 52 primatas infectados por *Leptospira* spp, necropsiados no LPA da FAMV-UPF.

Órgão	Distribuição	Frequência absoluta	Frequência relativa
Pulmão	Interstício(Fig. 1A)	29/40	72,50%
	Capilares	12/40	30%
	Macrófagos alveolares(Fig. 1B)	12/40	30%
	Parede do bronquíolo	1/40	2,50%
Fígado	Entre sinusoides e hepatócitos (aderidas à membrana plasmática do hepatócito)	10/23	43,47%
	Vasos sanguíneos (capilares sinusoides e vasos sanguíneos do espaço porta)(Fig. 1C)	4/23	17,39%
	Espaço porta	3/23	13,04%
	Junto à inflamação periportal	2/23	8,69%
	Células de Kupffer	2/23	8,69%
	Focos de inflamação	1/23	4,34%
Não identificado devido à autólise	1/23	4,34%	
Rins	Lúmen tubular	9/17	52,94%
	Interstício(Fig. 1D)	4/17	23,52%
	Glomérulos	3/17	17,64%
	Macrófagos intersticiais	1/17	5,88%

Tabela 2. Frequência de primatas soropositivos, sorovares prevalentes e respectivas diluições do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), aplicado em amostras sorológicas de primatas dos gêneros *Sapajus* e *Alouatta*, cativos do Zôo da Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

Sorovares	Diluições			
	100	200	400	
<i>sejroe</i>	8	2	-	10 (20,83%)
<i>panama</i>	8	1	1	10 (20,83%)
<i>autumnalis</i>	4	-	2	6 (12,50%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	-	3	-	3 (6,25%)
<i>andamana</i>	5	2	2	9 (18,75%)
<i>celledoni</i>	1	-	-	1 (2,08%)
<i>wolffi</i>	4	-	-	4 (8,33%)
<i>copenhageni</i>	-	2	-	2 (4,17%)
<i>castellonis</i>	-	1	-	1 (2,08%)
<i>tarassovi</i>	1	1	-	2 (4,17%)
	30 (62,50%)	12 (25,00%)	4 (8,33%)	48 (100%)

Figura 1. IHQ *Leptospira* spp.

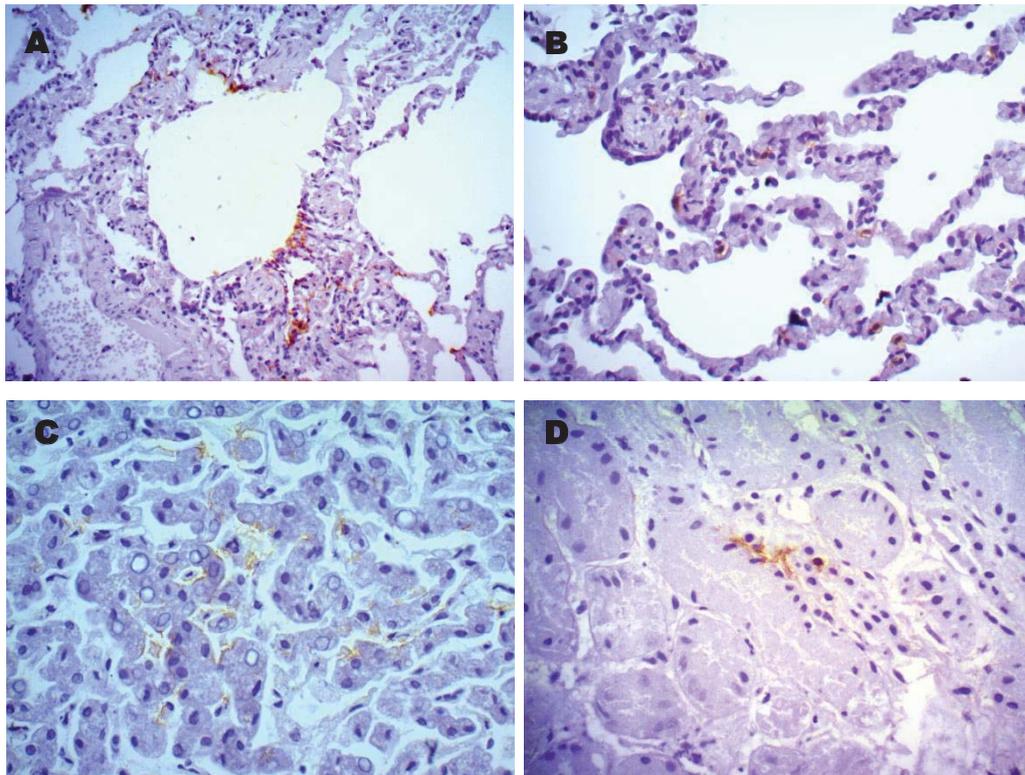


Fig 1. IHQ *Leptospira* spp. A) Pulmão. Imunomarcção no interstício, 200X. B) Pulmão. Imunomarcção no interstício e macrófagos, 400X. C) Fígado. Imunomarcção difusa entre sinusoides e hepatócitos, 400X. D) Rim. Imunomarcção no interstício e células tubulares. 400X.

4. CAPÍTULO 2

Aspectos imuno-histoquímicos e sorológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em primatas neotropicais

Marta Regina Grumann¹, Zigomar da Silva², José Roberto Silva Filho^{1,5},
Marcio Machado Costa³, Maria Isabel Botelho Vieira^{1,4}, Adriana Costa da Motta^{1,2}

(Artigo a ser submetido ao periódico *Semina: Ciências Agrárias - Uel*)

¹Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²Laboratório de Patologia Animal (LPA), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

³Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Veterinário, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

⁴ Laboratório de Doenças Parasitárias, Hospital Veterinário, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.

⁵Zôo – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.

*Autor para correspondência: A.C da Motta. Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação. Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, Km 171, Bairro São José, Passo Fundo, RS 99001-970, Brasil. Email: acmotta@upf.br

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii*, um coccídeo intracelular que infecta a maioria dos vertebrados homeotérmicos. A doença apresenta ampla distribuição mundial sendo fatal em primatas neotropicais, os quais apresentam uma suscetibilidade peculiar, ainda não elucidada. Uma vez que é observado um crescente número de óbitos com fortes indícios da presença do agente nos tecidos, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo imuno-histoquímico, verificando o padrão de distribuição das imunomarcações nos primatas necropsiados no Laboratório de Patologia Animal da Universidade de Passo Fundo (LPA-UPF), entre os anos 2000 e 2014. Realizou-se, ainda, um inquérito sorológico para *T. gondii* em 21 primatas neotropicais, dos gêneros *Sapajus* e *Alouatta*, pertencentes ao Zoológico da UPF, Rio Grande do Sul, Brasil. A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada através do método da streptavidina-biotina-peroxidase, detectando 26,53% de positividade em 98 primatas. As imunomarcações apresentaram variadas distribuições entre, pulmão (76,92%), fígado (58,33%), coração (50%), cérebro (42,30%) e rins (23,07%). A sorologia foi realizada através da hemaglutinação indireta (HAI), exibindo reatividade em 85,7% dos animais, todos pertencentes ao gênero *Sapajus*, enquanto os três negativos (14,3%) eram do gênero *Alouatta*.

Palavras-chave: imuno-histoquímica, primatas, toxoplasmose, zoonose, zoológico

1. Introdução

A toxoplasmose é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii*, um coccídeo intracelular, que infecta a maioria dos vertebrados homeotérmicos. (WOLF, 2003; LINDSAY; DUBEY, 2007). O parasita pode ser adquirido pela ingestão de oocistos esporulados, originários de fezes de gatos, ingestão de carne crua ou mal cozida, infectada com cistos, ou ainda por via transplacentária, quando a infecção primária ocorre durante a prenhez (INNES, 1997; DUBEY; LINDSAY, 2004).

A enfermidade pode se apresentar na forma aguda ou crônica, dependendo da interação parasita-hospedeiro (INNES, 1997; DUBEY et al., 1998), e é comumente severa e aguda em primatas neotropicais, os quais apresentam uma suscetibilidade peculiar, ainda não elucidada (ANDERSON; McCLURE, 1993; INNES, 1997). A razão desta suscetibilidade tem sido hipoteticamente atribuída aos hábitos arborícolas destas espécies, que levam ao isolamento do contato com as fezes de felídeos (INNES, 1997). O curso clínico é rápido e os animais morrem subitamente (EPIPHANIO et al., 2003; GYIMESI et al., 2006; SALANT et al., 2009). As relações entre suscetibilidade do hospedeiro, genótipo e virulência do parasita, ainda estão sendo reveladas (PELÁEZ et al., 2011). No entanto, a severidade do quadro clínico, nas espécies neotropicais, parece ser independente da cepa envolvida (SALANT et al., 2009).

Os órgãos acometidos, nos casos agudos, incluem pulmões, fígado, baço, linfonodos, intestino e cérebro, resultando na replicação e ruptura de células do hospedeiro pelos taquizoítos e, subsequentemente, necrose tecidual (EPIPHANIO et al., 2003). Nos casos em que há uma boa resposta imunológica do hospedeiro frente ao parasita, a infecção torna-se crônica, possibilitando observar a presença de cistos formados por bradizoítos no cérebro, músculos esqueléticos e coração (DUBEY et al., 2004).

Devido à ausência de informações sobre a infecção por *T. gondii* em primatas neotropicais, no Norte do Estado do Rio Grande do Sul, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo imuno-histoquímico, verificando a distribuição do agente nos tecidos dos animais necropsiados no LPA, além de um inquérito sorológico, em uma população cativa,

2. Material e Métodos

Imuno-histoquímica

Foram estudados, a partir do arquivo de blocos, os tecidos de todos os primatas encaminhados ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade de Passo Fundo (LPA-UPF) para necropsia, entre os anos 2000 e 2014.

A seleção foi baseada nos seguintes critérios: disponibilidade dos blocos de parafina e grau de autólise dos tecidos. Ao todo, foram estudados tecidos de 98 animais.

Para realização da imuno-histoquímica (IHQ) foram selecionados blocos de fígado, rins, pulmão, coração e cérebro (CUNNINGHAM et al., 1992; EIPHANIO et al., 2003; ANDRADE et al., 2007). Sequencialmente, os blocos de parafina foram seccionados e submetidos ao método da streptavidina-biotina-peroxidase, acrescentando o diaminobenzeno (DAB) como cromógeno, para verificar as imunomarcações. Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-*T. gondii*, Zeta Corporation (código Z2197), na diluição de 1:100. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina e analisados em microscópio óptico. Controles positivos foram inseridos, simultaneamente, a partir de casos positivos, testados previamente (OLIVEIRA et al., 2009).

Sorologia

Esta pesquisa foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Passo Fundo, RS, sob o parecer nº 006/2013 e registro nº 015/2012.

Foram coletadas amostras de sangue de 21 primatas, 17 *Sapajus nigritus*, um *Sapajus apella* e três *Alouatta guariba*, cativos do Zôo da UPF. Para a coleta das amostras, foi realizado o procedimento padrão de contenção física, utilizando-se puçá e luvas de couro. A venopunção foi realizada através da veia femoral, obtendo-se 3 ml de sangue de cada animal. As amostras foram centrifugadas e os soros separados em alíquotas.

Para a determinação qualitativa (*screening*) de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, utilizou-se o teste de Hemaglutinação Indireta (HAI), através do Kit Imuno-HAI® Toxoplasmose, Laboratório Wama Diagnóstica. A técnica de HAI foi realizada segundo o manual de instruções.

Análise estatística

A estatística descritiva foi utilizada para verificar a frequência absoluta (total) e a frequência relativa (percentual) dos resultados obtidos pela IHQ. Os dados gerados pela análise sorológica foram analisados através de tabela de contingência seguida de teste qui-quadrado, para verificar a associação entre as variáveis.

3. Resultados

Imuno-histoquímica

Entre os 98 primatas, 26 apresentaram imunomarcção, totalizando 26,53% de positivos. O gênero *Alouatta* apresentou maior frequência, com um total de 45 indivíduos e 15 positivos (33,33%), seguido de *Callithrix* (5/19 [26,31%]) e *Sapajus* (4/22 [18,18%]). Entre os gêneros com menor número de indivíduos, estavam *Papio*, *Aotus* e outros que não possuíam identificação (2/12 [16,66%]).

Em relação aos órgãos estudados, 20 apresentaram imunomarcção no pulmão (76,92%), 14 no fígado (58,33%), 13 no coração (50%), 11 no cérebro (42,30%) e seis nos rins (23,07%). Em sete casos constatou-se marcação em apenas um destes órgãos (26,92%). Além disso, em 19 casos (73,07%) observou-se marcação em dois ou mais órgãos.

Quanto à localização, as imunomarcções foram observadas de forma isolada ou distinta nos órgãos estudados. Cabe ressaltar que, na maioria dos casos, havia imunomarcção, simultaneamente, em mais de um local no mesmo tecido (Tabela I).

Sorologia

O teste sorológico detectou positividade em 18 primatas (85,7%), enquanto três (14,3%) foram negativos. Houve uma diferença entre os gêneros estudados, pois os 18 animais positivos pertencem ao gênero *Sapajus*, enquanto os negativos pertencem ao gênero *Alouatta* (Tabela II).

4. Discussão

A IHQ constituiu-se de uma importante ferramenta na identificação do agente em tecidos e, por conseguinte, na confirmação diagnóstica no presente estudo. Tal benefício foi também relatado por Motta et al. (2008) e Silva et al. (2013b), que obtiveram resultados semelhantes, em tecidos de ovelhas. Embora sejam visualizadas estruturas compatíveis com

este protozoário, não é possível confirmar a presença do patógeno através da análise histopatológica convencional, hematoxilina-eosina (HE) (ROSA et al., 2001; SILVA; LANGONI, 2001). O diagnóstico presuntivo de toxoplasmose tem sido realizado através de histopatologia, porém o diagnóstico definitivo pode ser obtido por IHQ (ANDRADE et al., 2007; CASAGRANDE et al. 2013), destacando a relevância do teste imuno-histoquímico para a certificação diagnóstica.

No presente estudo, tanto os cistos como os taquizoítos estavam amplamente distribuídos nos diversos órgãos examinados, contudo, os cistos são mais prevalentes no tecido neurológico ou muscular (DUBEY, 2002).

Associadas às imunomarcações, por vezes, foram observados infiltrado inflamatório mononuclear e necrose. Lesões neurológicas, como encefalite necrotizante, detectada primeiramente no HE, apresentavam estruturas sugestivas do protozoário e já foram reportadas igualmente em humanos com HIV (KUMAR et al., 2010). Segundo Navia et al. (1986), os padrões de imagem, das lesões anatomopatológicas de toxoplasmose, incluem necrotizante, organizada ou abscedativa, e são dependentes da resposta imunológica do hospedeiro e do dano tecidual causado pela infecção. Semelhante aos achados de Casagrande et al. (2013), as estruturas observadas, no presente estudo, eram piriformes e ovaladas, encontrando-se livres, no interior de macrófagos e intralésionais. Além disso, as marcações, ao exame imuno-histoquímico, foram observadas no citoplasma de macrófagos ou livres, principalmente no pulmão e fígado.

Testes imuno-histoquímicos para *T. gondii*, realizados em primatas cativos, também permitiram observar o agente em amostras de fígado, rins, pulmão, coração e cérebro, com variações de intensidade na reação (CUNNINGHAM et al., 1992; EPIPHANIO et al., 2003; ANDRADE et al., 2007). Além dessas, marcações já foram previamente descritas também em linfonodos mesentéricos (ANDRADE et al., 2007), linfonodos, baço, glândula adrenal, artérias, intestinos grosso e delgado, pâncreas, tecido adiposo, medula óssea, útero, ovários, testículos, tireóide, neuro-hipófise, mesentério, língua, tonsilas e músculo esquelético (EPIPHANIO et al., 2003).

O *Toxoplasma gondii* é responsável por um acréscimo na mortalidade de primatas neotropicais, tanto de vida livre como de cativeiro, uma vez que estes desenvolvem infecção aguda e fatal com frequência. Episódios agudos de toxoplasmose em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) têm sido reportados em diversos zoológicos ao redor do mundo (SALLES et al., 1997; SALANT et al., 2008). Uma taxa de 100% de morbidade e 30% de mortalidade

foi relatada em uma colônia de 17 primatas. A causa da alta taxa de mortalidade ainda não foi esclarecida, porém a sensibilidade dos primatas do Novo Mundo foi mais uma vez reportada e comparada com a de humanos imunocomprometidos (CUNNINGHAM et al., 1992). O resultado do teste imuno-histoquímico, realizado no presente estudo, indicou que muito animais foram acometidos pela forma disseminada da doença. Este fato, aliado à alta frequência de soropositivos revelados pelo inquérito sorológico, corrobora com a teoria supracitada.

No Brasil, as investigações sorológicas em primatas neotropicais também apresentam resultados variáveis e, na maioria dos casos, assim como no presente estudo, a prevalência é alta. No Cetas/IBAMA, 16 de 21 primatas do gênero *Sapajus* sp., apresentaram reação sorológica (PIRES et al., 2012), no Paraná 13 de 43 (30,2%) (GARCIA et al., 2005); São Paulo 3 de 5 (60%) (SANCHIS et al., 1972); Mato Grosso do Sul 4 de 13 (30,8%) (LEITE et al., 2008). Porém, em uma estação ecológica de São Paulo, somente 3 de 36 (8,33%) macacos-prego (*Sapajus apella*) foram sororreativos (SILVA et al., 2013a). Ao contrário dos primatas do Zôo-UPF, estes eram de vida livre.

Inquéritos sorológicos, realizados em diversas regiões brasileiras, a partir de espécies distintas, também demonstraram elevada soroprevalência. Em propriedades rurais do município de Eldorado, Mato Grosso do Sul, a sorologia demonstrou positividade em 22,86% (46/201) em aves, 47,61% (20/42) em cães e 57,14% (8/14) em gatos (MARQUES et al., 2009). Em assentamentos rurais no estado do Paraná, um teste de Imunofluorescência direta demonstrou uma prevalência de 82,2% de um total de 169 cães (SILVA-FILHO et al., 2012) e 25% de um total de 400 gatos no município de Araçatuba, SP (BRESCIANI et al., 2007).

Em conclusão, a IHQ demonstrou-se profícua na identificação do agente, em fragmentos de tecidos estocados em blocos de parafina, por um curto ou longo período de tempo, oportunizando observar o padrão de distribuição do protozoário nos tecidos de primatas. A frequência de infecção por *T. gondii*, revelada pelo inquérito sorológico, confirma a alta taxa de infecção, constatada através da IHQ.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade de Passo Fundo (UPF), pelo apoio financeiro.

Referências

- ANDERSON, D. C.; McCLURE, H. M. Toxoplasmosis. In: JONES T. C.; MOHR U.; HUNT R. D. (Eds). Monographs on Pathology of Laboratory Animals. Nonhuman primates: Springer-Verlag, New York, 1993. p.63-69.
- ANDRADE, M. C. R.; COELHO, J. M. C. O.; AMENDOEIRA, M. R. R.; VICENTE, R. T.; CARDOSO, C. V. P. C.; FERREIRA, C. B.; MARCHEVSKY, R. S. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Ciência Rural*, v.37, n. 6, p. 1724-1727, 2007.
- BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; NUNES, C. M.; SERRACNO, A. C. M.; MOURA, A. B.; STOBBE, N. S.; PERRI, S. H. V.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba (SP). *Ars Veterinária*, v. 23, n.1, p. 40-46, 2007.
- CASAGRANDE, R. A.; TIFFANY, C. E. S.; PESCADOR, C. A.; BORELLI, V.; SOUZA JUNIOR, J. C.; SOUZA, E. R.; TRAVERSO, S. D. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n. 1, p. 94-98, 2013.
- CUNNINGHAM, A. A.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M. Epidemic of Toxoplasmosis in a Captive Colony of Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). *Journal of Comparative Pathology*, v. 107, n. 2, p. 207-219, 1992.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Journal of Clinical Microbiology*, v.11, n. 2, p. 267-299, 1998.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Biology of *Toxoplasma gondii* in Cats and Other Animals. In: Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis and Microsporidia World Class Parasites. Springer, US, 2004. p. 1-19.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DE YOUNG, R. W.; DAHL, E.; EBERHARD, M. L.; NACE, E. K.; WON, K.; BISHOP, H.; PUNKOSDY, G.; SREEKUMAR C.; VIANNA M. C. B.; SHEN S. K.; KWOK O. C. H.; SUMNERS J. A.; DEMARAIS S.; HUMPHREYS J. G.; LEHMANN T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 1, p. 67-71, 2004.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATÃO-DIAS, J. L.; Pathology of Toxoplasmosis in Captive New World Primates. *Journal of Comparative Pathology*, v. 129, n. 2, p. 196-204, 2003.

GARCIA, J. L.; SVOBODA, W. K.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; AGUIAR, L. M.; TEIXEIRA, G. M.; LUDWIG G.; SILVA L. R, HILST, C.; NAVARRO, I.T. 2005. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus sp.*, *Alouatta caraya*) at Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 133, n. 4, p. 307-311, 2005.

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*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 37, n. 3, p. 276-280, 2006.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

KUMAR, G. G. S.; MAHADEVAN, A.; GURUPRASAD, A. S.; KOVOOR, J. M. E., SATISHCHANDRA, P.; NATH A.; KUMAR R. U.; SHANKAR S. K. Eccentric Target Sign in Cerebral Toxoplasmosis - neuropathological correlate to the imaging feature. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, v. 31, n. 6, p. 1469-1472, 2010.

LEITE, T. N. B.; MAJA, T. A.; OVANDO, T. M.; CANTADORI, D. T.; SCHIMIDT, I. R.; GUÉRCIO, A. C.; CAVALCANTI, A.; LOPES, F. M. R.; CUNHA, I. A. I.; NAVARRO, I. T. Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii* em macacos-prego (*Cebus apella*) de Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 307-310, 2008.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: WEISS, L.; KAMI K. A. (Eds). *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan Perspectives and Methods*. Academic Press: Great Britain, 2007. p. 133-152.

MARQUES, J. M.; ISBRECHT, F. B.; LUCAS, T. M.; GUERRA, I. M. P.; DALMOLIN, A.; SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SILVA, A. V. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais de uma comunidade rural do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 30, n. 4, p. 889-898, 2009.

- MOTTA, A. C. da; VIEIRA, M. I. B.; BONDAN, C.; EDELWEISS, M. I. A.; DAMETTO, M. A.; GOMES, A. Aborto em Ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anatomopatológica e imunoistoquímica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, p.204-208, 2008.
- NAVIA, B. A.; PETITO, C. K.; GOLD, J. W. M.; CHO, E.; JORDAN, B. D.; PRICE, R. W. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Annals of Neurology*, v. 16, n. 3, p. 224-238, 1986.
- OLIVEIRA, E. C.; PESCADOR, A. P.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Análise imuno-histoquímica de cães naturalmente infectados pelo parvovírus canino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 131-136, 2009.
- PELÁEZ, C. C.; TORRES, C. P. R.; GARRIDO, C. G. S.; CORREA, D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri scirieus*) in Mexico. *Veterinary Parasitology*, v. 180, n. 3-4, p. 368-371, 2011.
- PIRES, J. S.; RIBEIRO, C. T.; CARVALHO-FILHO, P. R.; PISSINATTI, A.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Infection by *Toxoplasma gondii* in Neotropical non-human primates. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, n. 32, n. 10, p. 1041-1044, 2012.
- ROSA, C.; KASAI, N.; SOUZA, S. L. P.; GUERRA, J. L.; REGO, A. A.; GENNARI, S. M. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 68, n. 1, p. 13-17, 2001.
- SALANT, H.; WEINGRAM, T.; SPIRA, D. T.; EIZENBERG, T. An outbreak of Toxoplasmosis amongst squirrel monkeys in a Israel monkey colony. *Veterinary Parasitology*, v. 159, n. 1, p. 24-29, 2009.
- SALLES, C. J.; LOPEZ, S.; BORRAS, D.; DOMINGO, M.; PRATS, N.; FERNANDEZ, J. Disseminated Toxoplasmosis in susceptible zoo species – a sporadic disease? In: Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians. Pittsburgh (PA): American Association of Zoo Veterinarians, p. 227–230, 1997.

SANCHIS, F. S.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C.; DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 14, n. 5, p. 314-320, 1972.

SILVA, A. V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice and the polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 3, p. 191-198, 2001.

SILVA-FILHO, M. L. F.; TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; DIAS, R. C. R.; LOPIS-MORI, M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; THOMAZ-SCCOL, V.; GARCIA, J. L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T. Infection by *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in humans and dogs from rural settlements in Northern Paraná State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 2, p. 3251-3264, 2012.

SILVA, R. C.; MACHADO, G. P.; CRUVINEL T. M. A.; CRUVINEL C. A.; LANGONI H. Frequency of *Toxoplasma gondii* antibodies in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigrinus*) from an ecological station in the State of São Paulo, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 251-253, 2013.

SILVA, A. F.; OLIVEIRA, F. C. R.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V; BRANDÃO, F. Z.; LEITE R. I. J. C. K.; FRAZÃO-TEIXEIRA E.; LILENBAUMA W.; FONSECA A. B. M.; FERREIRA A. M. R. Immunohistochemical identification of *Toxoplasma gondii* in tissues from Modified Agglutination Test positive sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 191, n. 3-4, p. 347-352, 2013.

WOLF, B. A. Toxoplasmosis. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Eds.). *Zoo and Wild Animal Medicine*: Saunders, USA, 2003. p. 745-749.

Tabela I. Formas evolutivas, distribuição e frequência das imunomarcações, detectadas por IHQ, observadas em cada órgão analisado dos 26 primatas infectados por *Toxoplasma gondii*, necropsiados no LPA da FAMV-UPF.

Órgão	Formas evolutivas do <i>T. gondii</i>	Distribuição	Frequência absoluta	Frequência relativa	
Pulmão	Taquizoítos	Interstício	19/20	95%	
		Macrófagos alveolares	7/20	35%	
	Cistos	Interstício	15/20	75%	
		Macrófagos alveolares (Fig 1A)	6/20	30%	
		Próximos à luz alveolar	1/20	5%	
Fígado	Taquizoítos	Hepatócitos	8/14	57,14%	
		Células de kupffer (Fig. 1B)	9/14	64,28%	
		Espaço porta	1/14	7,14%	
		Região centrolobular	1/14	7,14%	
	Cistos	Hepatócitos	14/14	100%	
		Células de kupffer	6/14	42,85%	
		Áreas de inflamação	1/14	7,14%	
		Região centro lobular	1/14	7,14%	
Coração	Taquizoítos	Fibras musculares	8/13	61,53%	
	Cistos	Fibras musculares	11/13	84,61%	
Cérebro	Taquizoítos	Neurópilo (Fig. 1C)	7/11	63,63%	
		Encefalite necrotizante (Fig. 1D)	1/11	9,09%	
	Cistos	Neurópilo	10/11	90,90%	
		Encefalite necrotizante (Fig. 1D)	1/11	9,09%	
Rins	Taquizoítos	Células tubulares	3/6	50%	
		Macrófagos	2/6	33,33%	
		Não foi possível determinar a localização devido à autólise	1/6	16,66%	
	Cistos	Células tubulares	5/6	83,33%	

Tabela II. Prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*, realizado por *screening*, em primatas do gênero *Sapajus* e *Alouatta*, cativos no Zôo, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.

	Gênero		Total
	<i>Sapajus</i> sp.	<i>Alouatta</i> sp.	
Positivo	8 (38,1%)	0 (0%)	8 (38,1%)
Discretamente positivo	10 (47,6%)	0 (0%)	10 (47,6%)
Negativo	0 (0%)	3 (14,3%)	3 (14,3%)
Total	18 (85,7%)	3 (14,3%)	21 (100%)

Figura 1. IHQ *T. gondii*

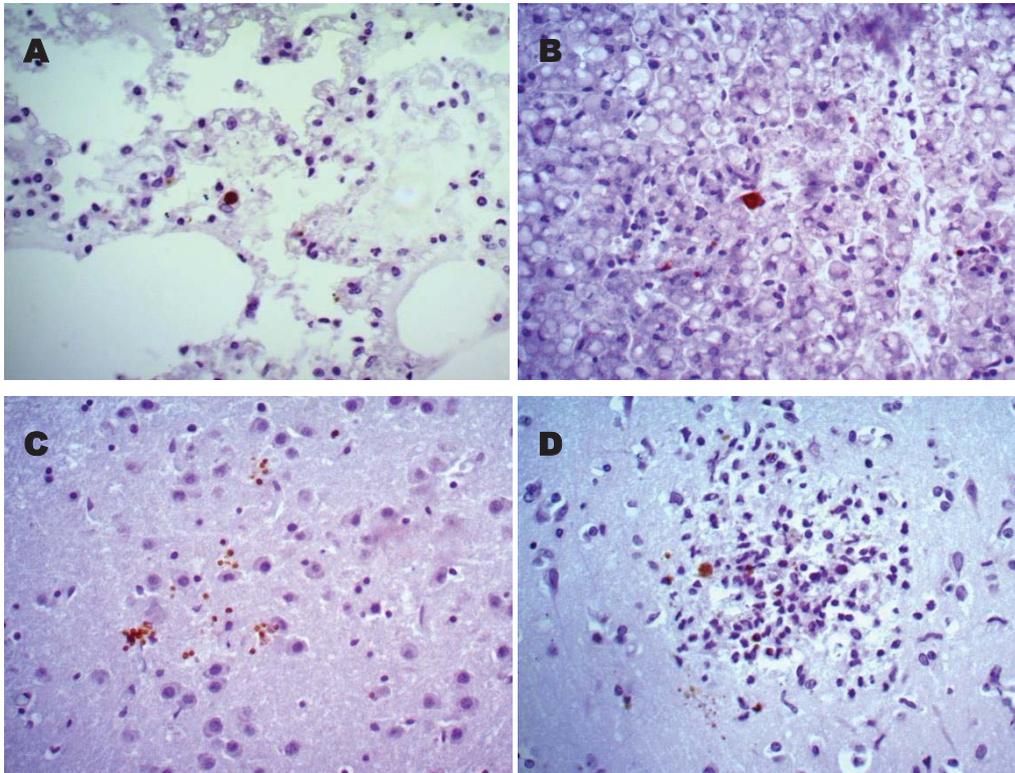


Fig. 1. IHQ *T. gondii*. A) Pulmão. Imunomarcção em células intersticiais. Cisto e taquizoítos. Cisto em macrófago, 400X. B) Fígado. Imunomarcção em hepatócitos e em células de Kupffer, em áreas de degeneração e necrose hepatocelular. Cistos e taquizoítos, 400X. C) Cérebro. Imunomarcção junto à encefalite necrotizante. Cistos e taquizoítos, 400X. D) Cérebro. Imunomarcção no neuropilo. Cistos e taquizoítos, 400X.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no estudo realizado, podemos concluir que:

1. No tocante ao diagnóstico *post mortem*, para leptospirose e toxoplasmose, a IHQ demonstrou ser uma ferramenta de alta aplicabilidade.
2. A IHQ permitiu determinar a presença dos agentes, através de fragmentos de tecidos emblocados em parafina, independente do tempo em que se encontravam estocados.
3. As imunomarcações, oriundas do teste imuno-histoquímico, oportunizaram determinar o padrão de distribuição de *Leptospira* spp. e *Toxoplasma gondii*, nos tecidos avaliados.
4. Os primatas neotropicais cativos no Zôo-UPF demonstraram uma alta frequência de infecção por *Leptospira* spp. e *Toxoplasma gondii*, demonstrando a existência de uma exposição contínua.
5. As informações fornecidas pelos testes imuno-histoquímicos corroboraram com os fornecidos pelos inquéritos sorológicos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo servirão para futuras pesquisas em patologia, além de consistir de uma importante ferramenta para as entidades de preservação de vida silvestre, em especial na compreensão acerca das doenças infecciosas que acometem primatas e incrementam a taxa de mortalidade das espécies neotropicais.

Animais silvestres cativos possuem diversos fatores que induzem o estresse e, conseqüentemente, ao comprometimento da resposta imunológica frente a diversas doenças, pois vivem em condições diferentes às dos seus habitats. Muitos desses animais são acolhidos por criatórios após serem resgatados de condições de maus tratos, contrabando ou acidentes. Assim, acabam sendo fadados a permanecerem na clausura por toda vida, sob alegação de não terem condições de buscar alimentos ou se protegerem dos riscos naturais, após a vida em cativeiro. Porém, um questionamento deve ser feito em relação a esta realidade: sendo o instinto uma predisposição inata para a realização de certas ações, como a busca de alimentos, acasalamento, proteção e fuga, e segundo Charles Darwin, possuírem uma base genética, animais silvestres e domésticos não deveriam ter condições de adaptar-se às circunstâncias que lhes são naturais?

Uma vez delimitados os riscos que o cativeiro representa para cada espécie, aliados à atribuição das entidades de conservação e proteção da vida silvestre, investimentos em pesquisa para diagnóstico, controle e prevenção de doenças, em especial a leptospirose e toxoplasmose em primatas, se fazem necessários, assim como métodos de reintrodução das espécies à liberdade da qual foram privados.

7. REFERÊNCIAS

1. Corrêa SHR. Leptospirose. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editors. Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. Roca: São Paulo, 2006. p.736-741.
2. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton. 1988, 220p.
3. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction goes early diagnosis of leptospirosis. Med Microbiol. 1995;43:110-114.
4. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and Leptospirosis. 2nd ed. Monash University Print Services, Melbourne, 1999. 272p.
5. Garcia-Vázquez E, Herrero JA, Hernández A, Gómez J. Leptospirosis. Medicine. 2010;10(57): 3896-3902.
6. Miller DA, Wilson MA, Kirkbride CA. Evaluation of multivalent leptospira fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. J Vet Diagn Invest. 1989;1: 146-149.
7. Pescador CA, Corbellini LG, Loretto AP, Wunder Junior E, Frantz FJ, Driemeier D. () Aborto equino por Leptospira spp. Ciênc Rural. 2004;34:271-274.
8. Tochetto C, Flores MM, Kommers GD, Barros CSL, Figuera RA. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). Pesq Vet Bras. 2012;32(5):430-443.
9. Hessler JR, Woodard JC, Tucek PC. Lethal toxoplasmosis in a woolly monkey. J Am Vet Med Assoc. 1971;159(11):1588-1594.
10. Anderson DC, McClure HM. Acute disseminated fatal toxoplasmosis in a squirrel monkey. J Am Vet Med Assoc. 1982;181:1363-1366.
11. Cunningham AA, Buxton D, Thompson KM. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). J Comp Pathol. 1992;107:207-219.
12. Dubey JP. Toxoplasmosis. J Am Vet Med Assoc. 1986;189:166-170.
13. Fialho CG, Araújo FAP. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. Ciênc Rural. 2003;33:893-897.
14. Epiphany S, Sinhorini IL, Catão-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. J Comp Pathol. 2003;129:196-204.
15. Farias AM (Colab.). Manual de Leptospirose. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 1999.

16. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales: Bacteriosis y Micosis. 3ª ed. Washington, 2003. p. 175-185.
17. Corrêa SHR, Vasconcellos SA, Teixeira AA, Dias RA, Guimarães MABV, Ferreira F, Ferreira Neto J.S. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. *Bra J Vet Res Anim Sci.* 2004;41:189-193.
18. Silva JCR, Marvulo MFV, Dias RA, et al. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Brazil. *Prev Vet Med.* 2007;78:286-295.
19. Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesq Vet Bras.* 2009;29(12):1009-1014.
20. Thrusfield M. *Epidemiologia Veterinária.* 2ª ed. Roca: São Paulo, 2004. p.185.
21. Lucheis SB. Leptospirose: a zoonose das enchentes. *Pesquisa & Tecnologia.* 2006 jan-jun;3(1).
22. Sarkar V, Nascimento SF, Barbosa R, et al. Population based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during in urban epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:605-610.
23. Silva JJ, Dalston MO, Carvalho JE, Setúbal S, Oliveira JM, Pereira MM. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Jul-Aug;35(4):395-399
24. Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia Veterinária.* Manole: São Paulo, 2000. 1415p.
25. Zachary JF. Mecanismos das infecções bacterianas. In: Zachary JF.; McGavin MD. (Eds.) *Bases da Patologia em Veterinária.* 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 4, p. 147-187
26. Girio RJS, Pereira FLG, Marchiori Filho M, et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. *Ciênc Rural.* 2004;34:165-169.
27. Perolat P, Poingt JP, Vie JC, Jouaneau C, Baranton G, Gysin G. Occurrence of severe leptospirosis in a breeding colony of squirrel monkeys. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46:538-545.
28. Reid HA, Herron AJ, Hines ME, Orchard EA, Altman NH. Leptospirosis in a White lipped tamarin (*Saguinus labiatus*). *Lab Anim Sci.* 1993;43:258-259.

29. Sá LRM, Teixeira R, Di Loreto C, Catão-Dias JL. Leptospirosis in neotropical primates. In: 3º Congresso da Associação de Veterinários de Animais Selvagens, 1999. São Pedro: São Paulo, 1999. p. 7.
30. Bolin CA. 2003. Leptospirosis. In: Fowler ME, Miller RR, editors. Zoo and Wildlife Medicine. 5th ed. Elsevier Science, Philadelphia, Pennsylvania. p. 699–702
31. Scarcelli E, Piatti RM, Fedullo DL, et al. *Leptospira* spp. detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) in clinical samples of captive Black capped capuchin monkey (*Cebus apella*). Braz J Microbiol. 2003;34:43-146.
32. Souza Jr JC. Perfil sanitário de bugios ruivos, *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates:Atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de Indaial, Santa Catarina - Brasil 2007 [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC; 2007.
33. Ferreira DRA, Laroque PO, Wagner PGC, et al. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. em *Cebus* spp. mantidos em cativeiro no Nordeste do Brasil. Pesq Vet Bras. 2011;31(11):1019-1023.
34. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. J Clin Microbiol. 1998;11(2): 267-299,
35. Borst GHA, Van Knapen F. Acute acquired toxoplasmosis in primates in a zoo. J Zoo Wildl Med. 1984;15(2):60-62.
36. Dietz HH, Henriksen P, Bille-Hansen V, Henriksen SA. Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys. Vet Parasitol. 1997;68: 299-304.
37. Inoue M. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. J Vet Med Sci. 1997;59(7):593-595.
38. Pertz C, Dubelzig RR, Linday DS. Fatal *Toxoplasma gondii* infection in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia rosalia*). J Zoo Wildl Med. 1997;28(4):491-493.
39. Dubey JP, Hodgins EC, Hamir AN. Acute fatal toxoplasmosis in squirrels (*Sciurus carolensis*) with bradyzoites in visceral tissues. J Parasit. 2006;92(3): 658-659.
40. Bouer A, Werther K, Catão-Dias JL, Nunes AL. Outbreak of toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. Folia Primatol. 1999;70(5):282-285.
41. Andrade MCR, Coelho JMCO, Amendoeira MRR, Vicente RT, Cardoso CVP, Ferreira PCB, Marchevsky RS. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. Ciênc Rural. 2007 nov-dez;37(6):1724-1727.
42. Maluenda ACH, Casagrande RA, Nemer VC, Kanamura CT, Teixeira RHF, Matushima ER. Infecção aguda fatal por *Toxoplasma gondii* em macaco barrigudo (*Lagothrix lagotricha*). Clínica Veterinária. 2009;81:100-104.

43. Anderson DC, McClure HM. Toxoplasmosis, p.63-69. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, editors. Monographs on Pathology of Laboratory Animals. I. Nonhuman primates. Springer-Verlag, New York, 1993. 234p.
44. Innes EA. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1997;20(2):131-138.
45. Dubey JP, Lappin MR, Thulliez P. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1995;207(2):179-185.
46. Dubey JP, Graham DH, De Young RW, et al. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J Parasit.* 2004;90:67-71.
47. Motta AC, Vieira MIB, Bondan C, Edelweiss MIA, Dametto MA, Gomes A. Aborto em Ovinos associado à toxoplasmose: caracterização sorológica, anatomopatológica e imunoistoquímica. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;17:204-208.
48. Sogorb F, Jamra LF, Guimarães EC, Deane MP. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1972;14:314-320.
49. Sogorb F, Jamra LF, Guimarães EC. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1977;19:191-194.
50. Epiphanyo S., Guimarães MABV, Fedullo DL, Corrêa SHR, Catão-Dias JL. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. *J Zoo Wildl Med.* 2000;31:231-235.
51. Silva JCR, Ogassawara S, Adania CH, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Brazil. *Vet Parasitol.* 2001;102:217-224.
52. Lilenbaum W, Monteiro RV, Ristow P, Fraguas S, Cardoso VS, Fedullo LPL. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Res Vet Sci.* 2002;73:319-321.
53. Rivetti Jr. AV, Caxito FA, Resende M, Lobato ZIP. Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008;60:1281-1283.