

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

REIZANE PEREIRA LORDELO

AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*) NO SUL DA BAHIA

ILHÉUS - BAHIA

2021

REIZANE PEREIRA LORDELO

AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*) NO SUL DA BAHIA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. George Rêgo Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Simonini Teixeira

ILHÉUS – BAHIA

2021

L866 Lordelo, Reizane Pereira.
Avaliação de anticorpos Anti-toxoplasma gondii em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) no Sul da Bahia / Reizane Pereira Lordelo. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.
55 f. : il. ; anexo.

Orientador: George Rêgo Albuquerque.
Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Referências bibliográficas: f. 49-52.

1. Primatas. 2. Protozoários. 3. Toxoplasmose. 4. Mata Atlântica. 5. Sorologia. I. Título.

CDD 599.8

REIZANE PEREIRA LORDELO

AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*) NO SUL DA BAHIA

Ilhéus – Ba, 26/02/2021

George Rego Albuquerque – DSc
UESC/DCCA
(Orientador)

Danilo Simonini Teixeira – DSc UESC

Lilian Silva Catenacci – DSc UFPI

Anaiá da Paixão Sevá – Dsc. UESC/DCCA

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir”.

(Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter colocado em seus planos coisas tão grandiosas para minha vida. Gratidão por estar comigo em todos os momentos e por não me deixar desistir mesmo quando achei que seria impossível continuar.

A Nossa Senhora e Jesus Cristo por esse amor infinito que me guia e fortalece em meio as adversidades da vida.

Á minha mãe Benedita que com sua simplicidade e amor me tornou a mulher que sou. Gratidão por me impulsionar a realizar grandes feitos, muitos vistos como inatingíveis e por embarcar comigo nos meus sonhos. Te amo infinitamente!

Á minha irmã Reizimare, por todos os conselhos e incentivos durante esse período, que mesmo a distância fez com que essa caminhada se tornasse mais leve e divertida. Te amo!

A minha avó Roquelina (in memoriam) por todo amor e ternura que que transmitiu em vida, que me fez crescer e ser uma pessoa melhor a cada dia. Te amarei eternamente.

A Ketly, por me receber de braços abertos em Itabuna e que se tornou como irmã durante o mestrado, sendo crucial nesse período, levarei sua amizade por toda a minha vida.

A Philipe por sua amizade, companheirismo em todos os momentos e por seus inúmeros conselhos, gratidão por existir em minha vida.

A Luana, pelas aventuras que vivemos a campo, por todas as contribuições, incentivos e por compartilhar tantos conhecimentos, sou muito grata a Deus por ter te conhecido.

A Laís, que mesmo a distância esteve comigo todos os dias dessa jornada, me aconselhando, ouvindo meus desabafos e me fazendo sorrir.

Ao meu orientador professor Dr^o George Albuquerque, toda a minha gratidão pela confiança, ensinamentos e paciência, me sinto muito honrada e grata pela oportunidade de ser sua orientada.

Ao meu co-orientador professor Dr^o Danilo Simonini que compartilhou comigo tantos conhecimentos de campo e sobre a vida dos primatas. Sou pela oportunidade e por todo acolhimento!

A professora Dr^a Lilian Catenacci por todas as contribuições e orientações para conclusão desta pesquisa.

A Dr^a Hellen, por todo o acolhimento no laboratório, orientações, conselhos e acima de tudo por sua amizade. Gratidão!

A professora Dr^a Daniele, por me acolher de forma tão atenciosa, por todos os ensinamentos e orientações no laboratório, sempre disposta a ajudar quando precisei. Gratidão!

A Camila, por todas as aventuras que vivemos juntas nas idas a campo, por todos os ensinamentos e energias positivas que transmitiu em minha vida.

A Universidade Estadual de Santa Cruz, por ter se tornado minha segunda casa nesse período e por ser o canal levou a concretização deste projeto.

A Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa da Bahia – FAPESB por contribuir diretamente com a realização desta pesquisa.

Ao Projeto Bio Brasil comandado pelo Centro de Pesquisa e Conservação da Sociedade Zoológica de Antuérpia na Bélgica em parceria com o Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia (IESB) e ao Projeto Almada Mata Atlântica Brasil (AMAP – Brasil) por todas as contribuições logísticas para que esta pesquisa se realizasse.

A Igor e Vicente por todas as contribuições e orientações passadas por meio do Projeto Bio Brasil e Almada Mata Atlântica, respectivamente.

A Zaqueu, Denis e Jiomário por todos os ensinamentos, pela paciência nas idas a campo e por me mostrar tudo na prática sobre as capturas e a vida dos primatas.

AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*) NO SUL DA BAHIA

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário zoonótico, mundialmente distribuído e infecta as mais variadas espécies de vertebrados. Este coccídio vem demonstrando alta virulência em primatas não humanos neotropicais de cativeiro, principalmente para aqueles pertencentes a família Callitrichidae, sendo uma importante causa de óbitos nesses animais. São escassos os estudos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas neotropicais de vida livre. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar o levantamento da presença de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas de vida livre da espécie *Leontopithecus chrysomelas*, em áreas de Mata Atlântica do Sul do estado da Bahia – Brasil. Entre os anos de 2008 a 2019 foram capturados 147 *L. chrysomelas* com recapturas e recoletas de 20 animais, obtendo assim, um total de 171 amostras de soro. Para detecção de anticorpos foi realizada sorologia aplicando o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), com ponto de corte de 1:25 e diluições de 1:50, 1:100 e 1:200. A ocorrência total de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 2,72% (4/147) na diluição 1:25 com 2 animais positivos na diluição de 1:100. Este é o primeiro relato de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas da espécie *Leontopithecus chrysomelas* de vida livre.

Palavras-chave: primatas, sorologia, vida livre, protozoário, mata Atlântica.

EVALUATION OF ANTI-*Toxoplasma gondii* ANTIBODIES IN GOLDEN-FACED LION TAMARINS (*Leontopithecus chrysomelas*) IN SOUTHERN BAHIA

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a zoonotic protozoan, worldwide distributed and infects the most varied species of vertebrates. This coccidium has been showing high virulence in non-human neotropical primates in captivity, especially for those belonging to the Callitrichidae family, being an important cause of death in these animals. Studies on the prevalence of anti-*T. gondii* antibodies are scarce in free-living neotropical primates. In this sense, the objective of the present study was to survey the presence of anti-*T. gondii* antibodies in free-living primates of the species *Leontopithecus chrysomelas*, in areas of Atlantic Forest in the south of the state of Bahia - Brazil. Between 2008 and 2019, 147 *L. chrysomelas* were captured with recaptures and collections of 20 animals, thus obtaining a total of 171 serum samples. To detect antibodies, serology was performed using the Modified Agglutination Test (MAT), with a cut-off point of 1:25 and dilutions of 1:50, 1: 100 and 1: 200. The total occurrence of anti-*T. gondii* antibodies was 2.72% (4/147) at 1:25 dilution with 2 positive animals at 1: 100 dilution. This is the first report of anti-*T. gondii* antibodies in primates of the *Leontopithecus chrysomelas* free-living species.

Keywords: primates, serology, free life, protozoan, Atlantic forest.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Características morfológicas de *Leontopithecus chrysomelas*, (A) características da coloração dourada da face (B) características da base da cauda dourada (VICENTE, 2020). 12
- Figura 2:** Distribuição geográfica original endêmica de *Leontopithecus chrysomelas* (PINTO; RYLANDS, 1997). 12
- Figura 3:** (A) (B) e (C) *Leontopithecus chrysomelas* ingerindo frutas no dossel de árvores, (C) *Leontopithecus chrysomelas* no solo em busca de frutos (ZAQUEU, 2020). 12
- Figura 4:** Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (MOURA et al., 2009). 12

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Soroprevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em primatas neotropicais	24
---	----

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

%	Porcentagem
<	“Menor que”
>	“Maior que”
° C	Grau Celsius
BA	Bahia
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HAI	Hemaglutinação indireta
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
Kg	Quilograma
MAD	Aglutinação direta
MAT	Teste de Aglutinação Modificada
MLCD	Mico-leão-de-cara-dourada
PNH	Primatas Não Humanos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
REBIO	Reserva Biológica de Una
RDC	República Democrática do Congo
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
IUCN	União Internacional para Conservação da Natureza
α	Nível de significância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Leontopithecus chrysomelas</i>	14
2.2 Histórico de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	17
2.3 Biologia de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	18
2.4 Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	19
2.5 <i>Toxoplasma gondii</i> em Primatas Neotropicais Não Humanos.....	21
2.6 Diagnóstico de toxoplasmose.....	26
2.6.1 Diagnóstico sorológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4 ARTIGO	38
5 ANEXO 1	53

1 INTRODUÇÃO

No mundo existem cerca de 439 espécies de Primatas Não Humanos (PNH), sendo que, 65% estão distribuídas em quatro países; Brasil, Madagascar, Indonésia e República Democrática do Congo (RDC) (ESTRADA et al., 2018). O Brasil possui 102 espécies e 17 gêneros, representando assim, a maior biodiversidade de PNH da Terra. Destas, 35 espécies brasileiras encontram-se ameaçadas de extinção (ESTRADA et al., 2018; IUCN, 2020). Um exemplo disso, é o mico-leão-de-cara-dourada – MLCD, espécie *Leontopithecus chrysomelas* que se encontra na categoria “xxx” da lista brasileira de espécies ameaçadas (ICMBio, 2018) e na lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza – IUCN (IUCN, 2020).

Estes animais são descritos como endêmicos da Mata Atlântica no sul do estado da Bahia e extremo norte de Minas Gerais, tendo frequentemente seu habitat afetado por ações humanas através do desmatamento para produção cacaueteira, agrícola e extração de madeira (PINTO; RYLANDS, 1997; RYLANDS et al., 2002). Tais ações, acarretam em desequilíbrio ambiental e conseqüentemente redução do habitat e ameaça à espécie. Concomitantemente, existem doenças infecciosas parasitárias, entre elas a toxoplasmose que podem contribuir para elevar o risco de extinção desses animais (RYLANDS et al., 1993; BARRETT et al., 2013; MEYER et al., 2014; ESTRADA et al., 2018).

A toxoplasmose é uma doença causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório. É uma das enfermidades parasitárias mais difundidas em todo o mundo, com alta prevalência nos diversos grupos animais, incluindo os animais selvagens (CARNEIRO et al., 2014). Os PNH atuam como hospedeiros intermediários no ciclo de *T. gondii*. A infecção desses animais pode ocorrer por meio da ingestão de fezes de felinos, água e alimentos contaminados contendo oocistos esporulados e carne crua com cistos teciduais de bradizoítos (DUBEY, 2009; CASAGRANDE et al., 2013). A toxoplasmose é uma enfermidade potencialmente fatal em grande parte das espécies de primatas neotropicais,

configurando quadros de sintomatologia aguda grave evoluindo a óbito em um curto período de tempo (NIEHAUS et al., 2020).

Pesquisas de soroprevalência realizadas em PNH revelam frequências de anticorpos anti-*T.gondii* que variam de 0 a 79% a depender da espécie de primata envolvida (CADAVID et al., 1991; VALENTINE et al., 2004; LEITE et al., 2008; BOUER et al., 2010; PIRES et al., 2012; MOLINA et. al., 2016; MINERVINO et al., 2017; NIEHAUS et al., 2020). A maior frequência de toxoplasmose em PNH no Brasil são em animais de cativeiro, sendo escassos os estudos em primatas de vida livre (EPIPHANIO et al., 2003). Neste sentido, este estudo buscou realizar o levantamento da presença de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas da espécie *Leontopithecus chrysomelas* de vida livre naturais da Reserva Biológica de Una - REBIO- Una, de fragmentos florestais e áreas de agroflorestas de cacau (cabruças) no sul da Bahia – Brasil. Essas áreas se diferenciam por suas características de degradação e conservação ambiental. Áreas de fragmentos florestais está associada a expansão da produção agrícola e pecuária e que vem sendo evidenciada por suas marcantes áreas de desmatamento (VIANA, 1997). Já os sistemas agroflorestais, combinam espécies agrícolas com espécies arbóreas em uma mesma área (AMADOR; VIANA, 1998).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leontopithecus chrysomelas*

Leontopithecus está classificado na infra-ordem Platyrrhini, agrupando quatro espécies. *Leontopithecus rosalia*, *Leontopithecus chrysopygus*, *Leontopithecus caissara*, *Leontopithecus chrysomelas* (CANAVEZ et al., 1999; REIS et al., 2008). Todas as espécies citadas encontram-se na lista nacionais e internacionais de espécies ameaçadas de extinção (RYLANDS et al., 1993; PEREZ-SWEENEY et al., 2008). *Leontopithecus chrysomelas* é popularmente conhecido como mico-leão-de-cara-dourada pelas suas características morfológicas de juba ao redor da face e base da cauda dourados (Figura 1) (OLIVEIRA; DIETZ., 2011; RYLANDS et al., 2012).

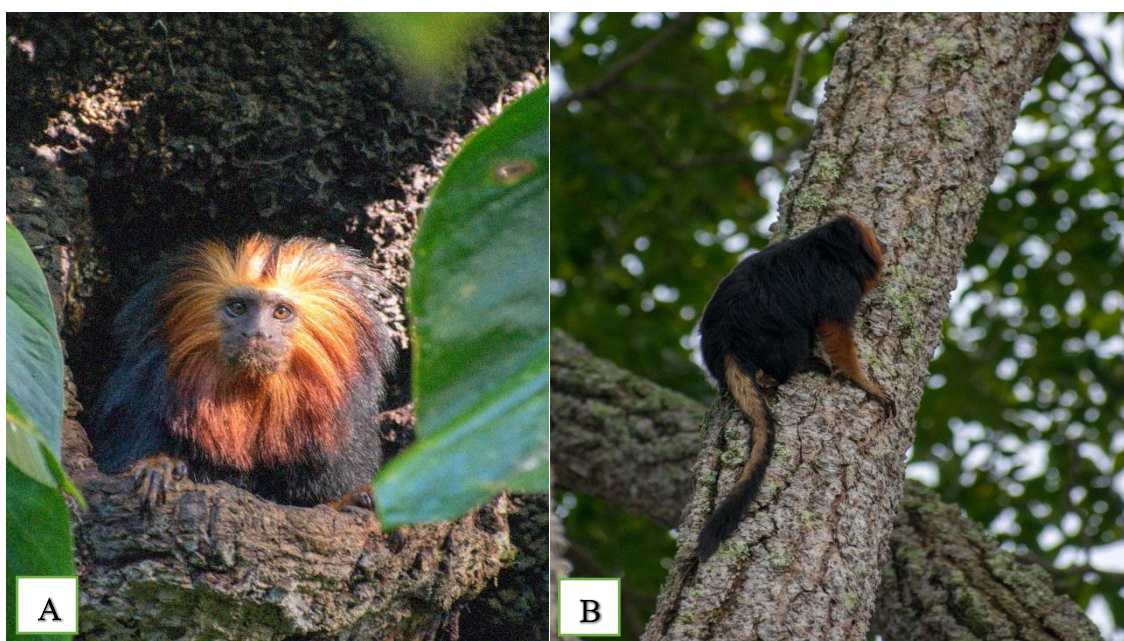


Figura 1: Características morfológicas de *Leontopithecus chrysomelas*, (A) características da coloração dourada da face (B) características da base da cauda dourada. Fonte: Vicente, 2020.

Tem distribuição endêmica na região sul da Bahia, ocupando uma área de aproximadamente 19.043 km² e no extremo norte de Minas Gerais em uma área de 418 km² (Figura 2), com tendência a diminuição de área de ocorrência e declínio populacional (RABOY et al. 2010). As populações de MLCD existentes nessas regiões

habitam em grande parte em regiões de floresta ombrófila, e uma porção menor sobrevivem em florestas semidecíduais (PINTO; RYLANDS, 1997).

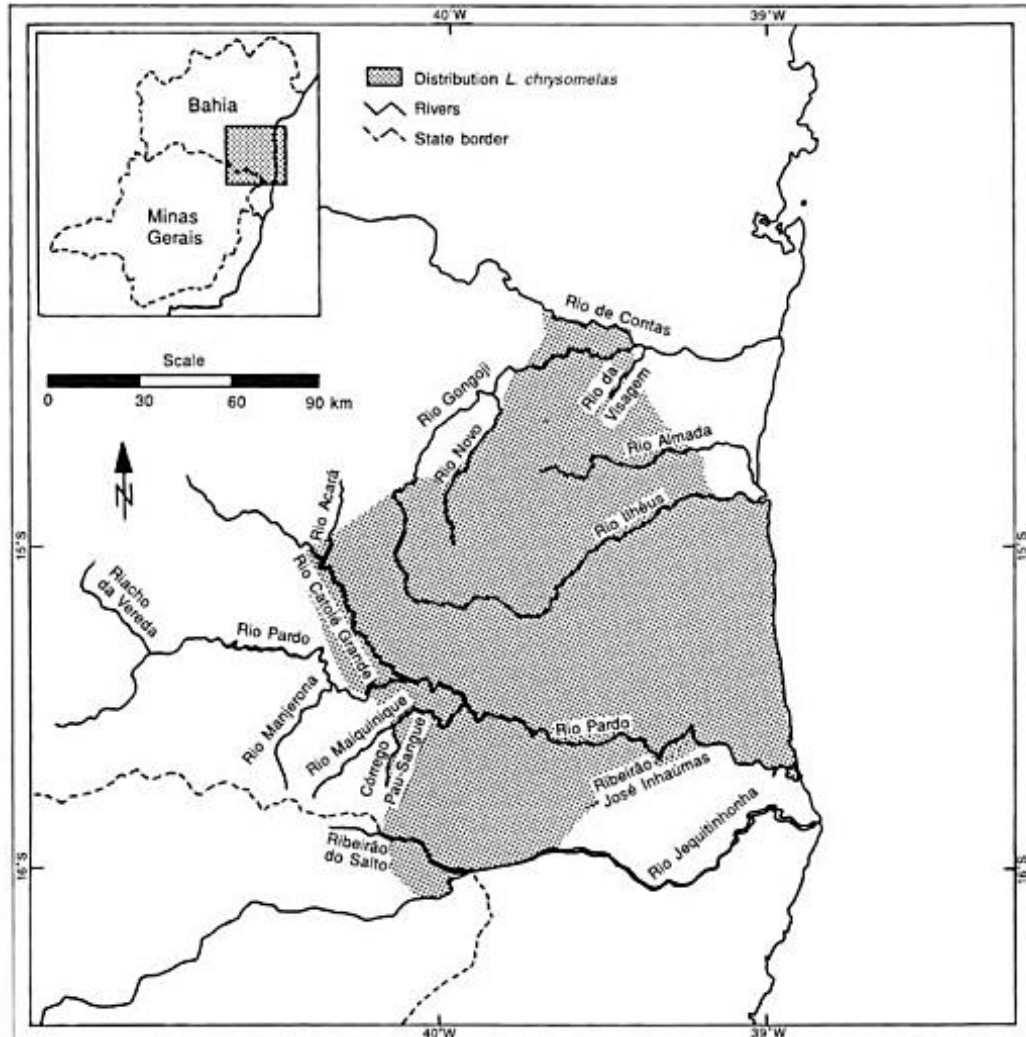


Figura 2: Distribuição geográfica original endêmica de *Leontopithecus chrysomelas*. Fonte: Pinto; Rylands, 1997.

A região de mata atlântica do Sul da Bahia vem passando por diversas modificações ao longo dos anos por conta de fragmentação florestal associadas a extração de madeira, pecuária e agricultura. Essas atividades foram impulsionadas pela crise do cacau na região que vem levando a substituição da produção cacauzeira. O princípio de produção de cacau por meio da associação do plantio em sistema agroflorestal propicia a manutenção de parte do habitat do MLCD, visto que, estes

animais apresentam hábito predominantemente arborícola descendo poucas vezes ao solo (OLIVEIRA; DIETZ., 2011).

A alimentação de *L. chrysomelas* é baseada na ingestão de néctar, flores, frutos obtidos nas copas das árvores e algumas vezes no solo (Figura 3). Além disso, ingerem insetos a exemplo de gafanhotos e pequenos vertebrados como lagartos e em casos de escassez de alimentos podem consumir fungos e exsudatos de árvores (RABOY; DIETZ, 2004; CATENACCI et al, 2016).



Figura 3: (A), (B) e (C) *Leontopithecus chrysomelas* ingerindo frutas no dossel de árvores, (C) *Leontopithecus chrysomelas* no solo em busca de alimentos. Fonte: Zaqueu, 2020.

Esses animais possuem dedos alongados que permitem a locomoção entre as árvores, facilitando também o processo de predação em locais de difícil acesso, a exemplo de troncos e pequenos espaços (RYLANDS et al, 1996). Quando em idade adulta, pesam aproximadamente 500 a 700g, se estruturam em grupos familiares que variam de tamanho e composição, normalmente sendo observados grupos de 5

indivíduos, porém pode chegar até 12 a 14 membros, composto por um casal dominante reprodutor e indivíduos jovens e subadultos, onde todos contribuem nos cuidados parenterais, na maioria das observações (OLIVEIRA et al., 2010).

2.2 Histórico de *Toxoplasma gondii*

O gênero *Toxoplasma* foi identificado pela primeira vez por Nicolle e Manceaux, em 1908, na Tunísia, onde observaram este protozoário em tecidos de um roedor *Ctenodactylus gundii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). Os pesquisadores pensaram se tratar de *Leishmania*, e logo observaram que se tratava de um outro protozoário, identificando-o como *Toxoplasma gondii*, baseado na sua morfologia formada do grego toxon = arco e plasma = corpo e na espécie do hospedeiro em que foi isolado (FERGUSON; DAVID 2009).

Porém, a história descreve ainda que neste mesmo ano, Splendore, pesquisador Italiano que atuava no Brasil, observou o mesmo parasito em coelhos que apresentavam quadro de infecção aguda com evolução a óbito. A partir de tecidos obtidos por meio de necropsia desses animais, Splendore observou no exame microscópico um tipo de corpúsculo diferente de todos já vistos por ele (MORRISSETTE et al., 2009).

Com o objetivo de desvendar do que se tratava, resolveu enviar amostras para o protozoologista Prowazek que naquele período atuava no Instituto de Manguinhos, conhecido atualmente como Instituto Oswaldo Cruz (SOUZA; BELFORT, 2014). Prowazek também não conseguiu desvendar a natureza dos corpúsculos, sugerindo assim que se tratava de um organismo inusitado (SPLENDORE, 1910 apud SOUZA; BELFORT, 2014). Naquele mesmo período, Splendore resolveu publicar na Revista da Sociedade Científica de São Paulo os achados obtidos, sem realizar a identificação (FERGUSON; DAVID 2009).

Após algum tempo, Splendore tomou conhecimento da identificação realizada por Nicolle e Manceaux e verificou se tratar do mesmo parasito e, resolveu então

nomeá-lo *Toxoplasma cuniculi* pelo fato de ser obtido de coelhos (SPLENDORE, 1910 apud SOUZA; BELFORT, 2014).

Surgiram então, várias espécies de *Toxoplasma*, identificadas em diversas espécies animais, até mesmo em humanos. Porém, após algum tempo, pesquisadores concluíram que se tratava de uma única espécie, prevalecendo a designação inicial *Toxoplasma gondii* (SPLENDORE, 1909; NICOLLE; MANCEAUX, 1909; (MORRISSETTE et al., 2009; FERGUSON; DAVID 2009).

A partir da identificação feita por Nicolle e Manceaux diversos estudos vem sendo realizados, sendo possível identificar que *T. gondii* é capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários incluindo os PNHs, e que os hospedeiros definitivos são apenas os animais pertencentes a família Felidae (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2010; TENTER et a., 2000). Apenas no final da década de 1960 foi possível elucidar o ciclo completo deste protozoário (DUBEY, 2009).

2.3 Biologia de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii apresenta reprodução de forma sexuada e assexuada, sendo que a reprodução assexuada ocorre em diversas células do hospedeiro intermediário, já a sexuada, ou coccidiana, ocorre no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (FERGUSON; DAVID 2009).

Este protozoário possui ainda três formas infectantes distintas, sendo elas; taquizoítos, bradizoítos e esprozoítos. Os taquizoítos (*tachos* = rápido em grego) refere-se ao estágio de rápida multiplicação e consiste em estruturas com forma alongada, sendo sua região anterior afilada e a posterior arredondada. Medem cerca de 6 µm de comprimento e 2 µm de largura (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). São capazes de invadir as células dos hospedeiros vertebrados, se dividem exclusivamente por endodiogenia de forma assexuada, formam o vacúolo parasitóforo, levam ao rompimento da célula hospedeira, podendo ser encontrados na corrente sanguínea de forma livre ou no interior das células de forma proliferativa na fase aguda da infecção (SOUZA et al., 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Já os bradizóitos (*brady* = lento em grego) são morfologicamente semelhantes aos taquizóitos, porém se replicam lentamente, se originam da diferenciação dos taquizóitos, possuem aproximadamente 7 µm de comprimento x 1,5 µm de largura, ficam localizados no interior de cistos protegidos do sistema imune. São encontrados na fase crônica da infecção, se multiplicam lentamente por endodiogenia no interior de cistos teciduais, tais como; rins, fígado, musculo esquelético e cérebro (HILL et al., 2005). Os cistos podem permanecer latentes por anos, podendo causar um quadro agudo da infecção caso o hospedeiro apresente quadro de imunossupressão (SUBAUSTE et al., 2011).

Os esporozoítos são estruturas que podem ser encontradas no interior de oocistos esporulados. Os oocistos são formados no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos por meio de gametogonia ou reprodução sexuada. São eliminados pelas fezes na forma não esporulada, no ambiente esporulam e medem de 12 a 13 µm, possuem em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (TENTER et al., 2000).

2.4 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii tem como hospedeiros definitivos os gatos domésticos e outros membros da família Felidae, e como intermediários os animais homeotérmicos incluindo os seres humanos. Sendo assim, apenas nas células intestinais dos felinos ocorre a reprodução sexuada desse protozoário, com de formação de oocistos (BERNAL et al., 2011).

Os hospedeiros definitivos podem ser infectados por meio da ingestão de qualquer uma das três formas parasitárias, tendo destaque para a infecção por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais com bradizoítos (Figura 4) (DUBEY, 2010). Após a ingestão, o cisto sofre ação do suco gástrico (pepsina e ácido clorídrico) e demais enzimas digestivas fazendo com que ocorra liberação dos bradizoítos no trato intestinal (WEBSTER, 2010). Ao serem liberados, penetram na mucosa intestinal, invadindo as células epiteliais, se multiplicam de forma

assexuada formando os merozoítos, com posterior formação de esquizonte, em um processo denominado de merogonia que pode se repetir por até quatro vezes. O esquizonte consiste no conjunto de merozoítos formados dentro do vacúolo parasitóforo das células (DUBEY, 1970).

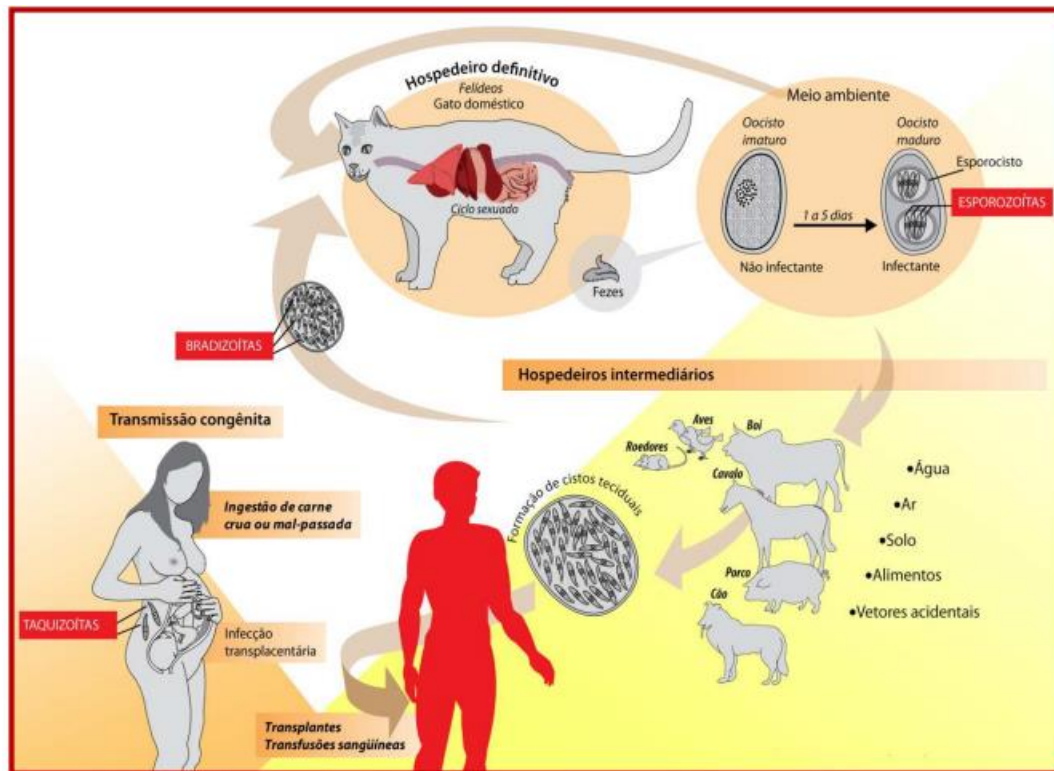


Figura 4: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Fonte: Moura et al., 2009.

Em seguida, ocorre o rompimento dessas células liberando os merozoítos, estes penetram novas células transformando-se em gametócitos que são as formas sexuais masculinas (microgametas) e femininas (macrogametas) responsáveis pela reprodução sexuada (SCHLÜTER et al., 2014). O microgameta fecunda o macrogameta, originando o zigoto, que forma, dentro do epitélio, uma parede externa dupla originando o oocisto (SULLIVAN; JEFFERS, 2012; SCHLÜTER et al., 2014).

Por meio das fezes do hospedeiro definitivo, os oocistos são liberados na forma não esporulados. Um único gato pode eliminar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados (não infectante) que em condições e umidade e temperatura adequados esporulam após 2 a 5 dias. Tornam-se então infectantes, podendo permanecer no

ambiente por mais de um ano, em condições de umidade e temperatura favoráveis (DUBEY et al., 1998; FERGUSON; DAVID 2009).

Os oocistos infectantes podem ser ingeridos pelos hospedeiros definitivos ou intermediários por meio de água contaminada, frutas, legumes e hortaliças cruas ou mal higienizadas. Ao chegar no estômago sofrem ação do suco gástrico, bem como, ao longo do duodeno e intestino delgado das demais enzimas digestivas, fazendo com que haja a liberação dos esporozoítos (DUBEY; JONES, 2008).

Ao serem liberados, os esporozoítos penetram nas células epiteliais deste segmento, logo após, ocorre a diferenciação dos esporozoítos em taquizoítos que se multiplicam rapidamente e se direcionam para diversas células do organismo (DUBEY et al., 1998). Nas células parasitadas, formam um vacúolo parasitóforo com consecutivas divisões, originando novos taquizoítos, que rompem as células, sendo liberados para infectar novas células (SILVA; LANGONI, 2009).

Esta série de eventos caracteriza a fase proliferativa ou aguda da infecção, podendo ocorrer a transmissão transplacentária em fêmeas gestantes. Com o surgimento da resposta imunológica, ocorre a formação de cistos teciduais onde os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos com multiplicação lenta no interior (TENTER et al., 2000). Os cistos podem se formar em diversos tecidos do organismo, sendo que os maiores problemas ocorrem quando esses cistos são formados em tecidos do sistema nervoso central, bem como no globo ocular, levando a alterações neurológicas e oftalmológicas importantes em humanos e animais (VILLARD et al., 2016).

2.5 *Toxoplasma gondii* em Primatas Neotropicais Não Humanos

Apesar da infecção por *T. gondii* ser assintomática na maioria de seus hospedeiros intermediários, os primatas do novo mundo apresentam maior susceptibilidade a infecção independentemente da cepa envolvida (PENA et al., 2008; CARME et al., 2009; PELÁEZ et al., 2011; MELO et al., 2020; NIEHAUS et al., 2020; PAULA et al., 2020).

O primeiro relato da ocorrência de *T. gondii* em primatas foi descrito por Theze em 1916, na Guiana Francesa. A partir desta descoberta, foi possível a realização de novas pesquisas que apontam a toxoplasmose como responsável por uma grande parte da mortalidade de macacos neotropicais, principalmente para os pertencentes a família Callitrichidae das mais variadas espécies criadas em cativeiro (DUBEY et al., 2006; GRUMANN et al., 2017; MOLINA et al., 2017; CANO-TERRIZA et al., 2019).

A alta susceptibilidade dos Callitrichidae em desenvolver infecção grave pode estar associada a evolução da espécie sem a presença dos felídeos por mais de 20 milhões de anos e seu padrão evolutivo extremamente arborícola, principalmente em áreas não degradadas (CATÃO-DIAS et al., 2013). Essa ausência de contato com oocistos infectantes pode ter influenciado diretamente no processo de desenvolvimento uma resposta imunológica eficiente para combater a infecção por este protozoário (INNES, 1997; EPIPHANIO et al., 2003; CATÃO-DIAS et al., 2013; MARQUES-SANTOS et al., 2017).

. Acredita-se que, pelo fato dos primatas neotropicais sobreviverem por muito tempo no dossel das árvores, não tendo contato constante com os felinos e com o solo, conseqüentemente esse evento pode diminuir o risco de contato com oocistos, impossibilitando que esses animais desenvolvam uma resposta imunológica eficiente para combater este protozoário (INNES, 1997; EPIPHANIO et al., 2003; MARQUES-SANTOS et al., 2017).

As alterações clínicas agudas são inespecíficas cursando comumente com quadros de hipertermia, tosse, prostração, dispneia, exsudato nasal com sangue, seguidos de vômito, anorexia, apatia, distensão abdominal e espirros (BOUER et al., 2010; CATÃO-DIAS et al., 2013). Sinais clínicos semelhantes foram observados em primatas neotropicais da espécie bugio-ruivo (*Alouatta guariba*) diagnosticados com *T. gondii* pelo Laboratório de Patologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, cursando com apatia, anorexia, distensão abdominal e febre e evolução a óbito (CASAGRANDE et al., 2013). Quadros parecidos foram descritos por Nishimura et al., (2019) em um surto relatado em uma colônia de macaco esquilo (*Saimiri sciureus*), os animais apresentaram alterações clínicas como tosse, tremor, depressão, taquipnéia, antes de evoluir a óbito.

Além dos sinais clínicos citados, *T. gondii* pode desencadear diversas alterações macroscópicas nos mais variados órgãos de primatas do novo mundo, sendo identificada em pulmão áreas de congestão, edema, hiperemia, pneumonia intersticial linfoplasmocítica e histiocítica, petéquias, deposição multifocal de fibrina em superfície alveolar, hemorragias multifocais e exsudatos espumosos. Em região hepática são observadas hepatomegalia, congestão hepática, lipidose, descoloração amarelada difusa com petéquias multifocais. Já no intestino, vem sendo identificadas enterite hemorrágica, úlceras gastrointestinais, petéquias, sufusões, necrose multifocal e gastrite fibrinogênia. Nos demais órgãos são identificadas esplenomegalia, petéquias e equimoses em regiões de rim e glândulas adrenais (EIPHANIO et al., 2003; PELÁEZ et al., 2011; MARQUES-SANTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2018; NISHIMURA et al., 2019; SANTANA et al., 2020).

Microscopicamente, as alterações também são variadas nesses órgãos, sendo descritas em fígado a presença de hepatite multifocal necrosante aguda, aumento de macrófagos e linfócitos. Pulmão com congestão difusa, edema, atelectasia e enfisema e inflamação intersticial alveolar que com presença de proliferação macrófagos alveolares e broncopneumonia fibrino-hemorrágica. No coração, miocardite multifocal e infiltração epicárdica leve de macrófagos e linfócitos, necrose coagulativa e inflamação de células mononucleares com agrupamentos de taquizoítos. Cérebro com infiltração linfocítica das meninges, e meningoencefalite linfo-histiocítica, encefalite não supurativa, necrose neuronal. Em outros órgãos, são relatados linfadenite necrosante multicêntrica, nefrite necrosante, enterite necrótica hemorrágica multifocal e esplenite necrótica com fibrina (EIPHANIO et al., 2003; ANDRADE et al., 2007; PELÁEZ et al., 2011; PARDINI et al., 2015; GRUMANN et al., 2017; MARQUES-SANTOS et al., 2017; OH, et al., 2018).

Os estudos disponíveis, ainda não elucidaram como ocorre a reação do sistema imunológico desses animais frente a infecção por *T. gondii*. Na literatura são encontradas apenas descrições das alterações clínicas ante e post-mortem e dados de levantamentos sorológicos (INNES, 1997; EIPHANIO et al., 2003; MARQUES SANTOS et al., 2017).

Diversas pesquisas de soroprevalência vem sendo realizadas em primatas, neotropicais, revelando baixa frequência de anticorpos anti-*T.gondii* em animais da família Callitrichidae (*Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callithrix*) (BOUER et al., 2010; PIRES et al., 2012; MOLINA et. al., 2017; MINERVINO et al., 2017; PAULA et al., 2020). Para PNH do gênero *Cebus* são detectadas altas frequências de reagentes para *T. gondii*, variando de 28.7% a 79.0% entre animais de cativeiro e vida livre pesquisados (CADAVID et al., 1991; VALENTINE et al., 2004; LEITE et al., 2008; NIEHAUS et al., 2020) (Tabela 1).

Tabela 1: Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em primatas neotropicais

Gênero/espécies	Número de examinados (n)	Número de positivo	Positivo (%)	Referência	País
<i>Cebus</i> sp.	21	16	76.19	Pires et al., (2012)	Brasil - RJ
<i>Cebus</i> sp.	105	83	79.0	Bouer et al., (2010)	Brasil - SP
<i>Cebus apella</i>	14	4	28.7	Leite et al., (2008)	Brasil - MS
<i>Cebus albifrons</i>	47	22	40.9	Cadauid et al., (1991)	Colômbia
<i>Alouatta caraya</i>	9	4	44.4	Minervino et al., (2017)	Brasil - AM
<i>Saimiri sciureus</i>	9	0	0	Minervino et al., (2017)	Brasil - AM
<i>Ateles geoffroyi</i>	44	26	59.1	Niehaus et al., 2020	Costa Rica
<i>Callithrix</i> sp.	22	1	4.5	Pires et al., (2012)	Brasil - RJ
<i>Saguinus</i> sp.	5	0	0	Bouer et al., (2010)	Brasil - SP
<i>Leontopithecus</i> sp.	15	3	20.0	Bouer et al., (2010)	Brasil - SP
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	126	0	0	Molina et. al., (2017)	Brasil - RJ
<i>Leontopithecus rosalia</i>	15	0	0	Paula et al., (2020)	Brasil - MG

De acordo com Dias-Catão et al., (2013) com base nos dados sorológicos, clínicos e macroscópicos é possível traçar três padrões de infecção causados por *T. gondii* em primatas do novo mundo. No padrão I se enquadram os primatas membros da família Callitrichidae exemplo dos *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callithrix*, este é um padrão marcado por infecção aguda com índices próximos a 100% de letalidade e consequentemente os estudos sorológicos identificam nenhuma ou muito baixa positividade. Já o padrão II é definido pela infecção de primatas das famílias Cebidae (*Saimiri*, *Aotus*) e Atelidae (*Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix*), sendo caracterizado por

letalidade variável. Essa característica propicia a detecção de um maior índice de animais com diagnóstico sorológico positivo para *T. gondii*. O padrão III é classificado pela infecção em animais do gênero *Cebus* levando a quadros clínicos discretos e inespecíficos, induzindo a altos níveis de anticorpos persistentes, raramente induzindo ao óbito.

Paula et al., (2020), avaliaram um surto de toxoplasmose que levou a óbito seis bugios (*Alouatta* sp.) que viviam em um Jardim Zoológico localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais. Concomitantemente avaliaram sorologicamente 10 primatas do velho mundo (*Miopithecus talapoin*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla gorilla*) que viviam no mesmo ambiente, e observaram que todos eles foram sororeagentes para *T. gondii*, mas não apresentaram nenhuma sintomatologia clínica e não evoluíram a óbito.

Um estudo semelhante foi realizado por Santana et al., (2020) avaliando casos sintomáticos e assintomáticos de primatas infectados por *T. gondii*. Sete macacos bugios (*Alouatta* sp.) adultos de uma coleção particular evoluíram a óbito ainda na fase aguda da infecção, em um período de 34 dias, com um intervalo de 2 a 15 dias entre os óbitos, sendo que, 3 tiveram morte súbita e os outros 4 apresentaram sinais clínicos, como tosse, apatia e prostração, edema pulmonar e hematêmese antes de evoluir a óbito. E sete *Sapajus apella* conviveram no mesmo ambiente permaneceram saudáveis sem óbitos neste grupo. Estes estudos reforçam a hipótese de que há espécies de primatas com maior resistência a infecção por *T. gondii*, enquanto outras são mais susceptíveis ao desenvolvimento de quadros clínicos graves com alta letalidade.

2.6 Diagnóstico de toxoplasmose

O diagnóstico clínico é complexo devido a inespecificidade dos sinais clínicos, podendo ser confundido com outras enfermidades como febre amarela, herpesvirus, tripanossomíase, leishmaniose (ANDRADE et al., 2006; DUBEY; JONES, 2008).

Atualmente existem diversas técnicas de diagnóstico capazes de detectar a infecção por *Toxoplasma gondii* na fase aguda e crônica. Dentre as técnicas diagnósticas disponíveis, merece destaque os testes sorológicos pela efetividade e praticidade (SPALDING et al., 2002; PORTILHO; CARVALHO, 2019). Sendo possível ainda, contar com outras técnicas que possibilitam realizar o isolamento do DNA (ácido desoxirribonucleico) do parasito, bem como dos oocistos presentes nas fezes dos felinos por meio dos exames de PCR (reação em cadeia da polimerase) e parasitológicos respectivamente. A realização de exames histopatológicos (demonstração dos parasitos nos tecidos) e imuno-histoquímica também se apresentam como opções efetivas no diagnóstico post-mortem (HOLSBACK et al., 2012).

2.6.1 Diagnóstico sorológico de *Toxoplasma gondii*

As técnicas de diagnóstico sorológicos visam detectar anticorpos presentes na circulação sanguínea, representando uma ferramenta importante no diagnóstico da toxoplasmose (CANTOS et al., 2000). Esses anticorpos variam de acordo com a fase da infecção, sendo que na fase inicial de 1 a 2 semanas os anticorpos IgM e IgA já podem ser detectados, e posteriormente por IgE e IgG (SENSINI, 2006).

Existem diversos métodos sorológicos utilizados na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em humanos e animais: imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI), Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), Teste do Corante de Sabin-Feldman (Dye Test), aglutinação direta (MAD) e teste de aglutinação modificada (MAT) (KOMPALIC-CRISTO et al., 2004; DUBEY, 2010).

De acordo com Casartelli-Alves et al., (2014) a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade no diagnóstico da toxoplasmose. Pode ser utilizado para diagnóstico na fase aguda (detecção de IgM) e na fase crônica (para detecção de IgG), sendo de fácil execução. No entanto, sua desvantagem está relacionada a necessidade de anticorpos conjugados específicos de cada espécie, isotiocionato de fluoresceína e microscópio específicos, que são adquiridos por alto preço, além disso, necessita de profissionais experientes para

realização da leitura dos resultados, devido a subjetividade da fluorescência emitida (FRENKEL, 1988).

Hemaglutinação indireta (HAI) e aglutinação direta (MAD) são considerados métodos de alta especificidade, de fácil execução e de baixo custo. Utiliza hemácias ou partículas (látex, poliestireno), sensibilizadas com antígenos protéicos de *T. gondii*, com o objetivo de detectar anticorpos da classe IgM e IgG (MURAT et al., 2013). Na Hemaglutinação indireta (HAI), a capacidade de aglutinação das hemácias é bloqueada quando o agente reage com o anticorpo específico presente no soro do paciente (DEL RÍO et al., 2003).

O resultado pode ser observado a partir da seguinte interpretação: É considerado positivo quando ocorre a formação de tapete cobrindo a superfície da cavidade da placa em “V”, e negativo quando ocorre a sedimentação das hemácias no fundo da placa, formando um “botão” compacto (SANCHEZ, 2001). Esta técnica não é a mais indicada para diagnóstico de rotina, pois ocasionalmente pode levar a resultados falso positivos, por interferência de anticorpos IgM “naturais” (FERREIRA et al., 2001).

O teste do Corante de Sabin-Feldman foi um dos primeiros testes a serem elaborados para diagnóstico da toxoplasmose, este consiste na utilização de taquizoítos vivos, complemento e corante azul de metileno (YÜCESAN et al., 2019).

Com a presença dos anticorpos, ocorre a lise dos taquizoítos que acabam não incorporando ao corante (COUTINHO et al., 1970). Apesar de ser um teste de alta especificidade e sensibilidade, vem sendo substituído por outras metodologias devido ao fato de ser obrigatória a manipulação do parasito vivo para sua realização. Esta característica pode facilitar o risco de transmissão laboratorial (MARQUES et al., 2015).

O Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay) parte do princípio da utilização de uma enzima com o objetivo de detectar a ligação de antígenos e anticorpos. Este é um dos testes sorológicos mais utilizados principalmente por permitir o processamento de diversas amostras de forma simultânea, além de poder ser automatizado, evitando interpretações errôneas dos resultados (FELIN et al., 2017). Pode ser realizado a partir de três diferentes

métodos: direto, indireto e sanduiche, sendo esta uma técnica, simples, barata e com alta capacidade de diagnóstico (CAMARGO et al.,1989; CAMARGO, 2001).

O teste de aglutinação direta modificado (MAT) apresenta-se como um método não espécie-específico para o hospedeiro, macroscópico de fácil execução e leitura, podendo ser utilizado para diagnóstico em diversas espécies animais, além de possuir uma alta especificidade. Esta técnica é indicada na detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*, visto que o 2-mercaptoetanol (2ME) que faz parte dos materiais utilizados para execução do teste tem como função inativar as IgM específicas e não específicas presentes no soro testado (CAÑÓN FRANCO et al., 2003). A metodologia para realização do MAT foi proposta por Desmonts e Remington (1980), possibilitando a leitura do teste sem necessidade de equipamentos especiais. Desde então, a técnica vem sendo aprimorada e amplamente utilizada em várias pesquisas de soroprevalência (DUBEY; DESMONTS, 1987; COLA et al., 2010).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADOR, D. B., VIANA, V. M. Sistemas agroflorestais para recuperação de fragmentos florestais. **Série técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 105-110, 1998.

ANDRADE, M. C. R., et al. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1724-1727, 2007.

ANDRADE, A., PINTO, SC., OLIVEIRA, RS., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books.

BARRETT, M. A. et al. Climate change, predictive modeling and lemur health: assessing impacts of changing climate on health and conservation in Madagascar. **Biological Conservation**, v. 157, p. 409-422, 2013.

BERNAL, A. M. et al. Toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla. **Veterinário Méx.** v. 42, n. 2, p. 115–123, 2011

BOUER, A. et al. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally and naturally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and indirect ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 26-31, 2010.

CADAVID, A. P., et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Cebus spp in the Santa Fe Zoological Park of Medellín, Colombia. **Journal of medical primatology**, v. 20, n. 5, p. 259-261, 1991.

CANAVEZ, F.C., et al. Phylogenetic relationships of the callitrichinae (Platyrrhini, Primates) based on β 2-microglobulin DNA sequences. **American Journal of Primatology**, v. 48: 225 – 236, 1999.

CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**, v. 2, p. 278-286, 2001.

CAMARGO, M. E.; MOURA, M. E. G.; LESER, P. G. Toxoplasmosis serology: an eficiente hemagglutination procedure to detect IgG and IgM antibodies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 4, p. 279-285, 1989.

CAÑÓN FRANCO, W. A. et al. Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 452-456, 2003.

CANO-TERRIZA, D. et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive nonhuman primates in zoos in Spain. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 65, p. 54-57, 2019.

CANTOS, G. A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. Toxoplasmose: Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 4. P. 335-41, 2000.

CARME, B. et al. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. **Veterinary parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 132-135, 2009.

CARNEIRO et al. Inquérito Sorológico para *Toxoplasma gondii* em Mamíferos Neotropicais Mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres, Goiânia, Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 1, p. 69–78, 2014.

CASAGRANDE, R. A. et al. Toxoplasmose em primatas neotropicais: Estudo retrospectivo de sete casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 94–98, 2013.

CASARTELLI-ALVES, L. et al. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3–4, p. 346–351, 2014.

CATÃO-DIAS, J. L., EPIPHANIO, S., KIERULFF, M. C. M. Neotropical primates and their susceptibility to *Toxoplasma gondii*: new insights for an old problem. **Primates, pathogens, and evolution**, p. 253-289, 2013.

CATENACCI, L. S. et al. Diet and feeding behavior of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae) in degraded areas of the Atlantic Forest of South-Bahia, Brazil. **International Journal of Primatology**, v. 37, n. 2, p. 136-157, 2016.

CEDILLO-PELÁEZ, C. et al. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 3-4, p. 368-371, 2011.

COLA, G. A., et al. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in rats. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 717-722, 2010.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: Host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 893–898, 2009.

DEL RÍO, M. L.; GUTIÉRREZ, C. B.; RODRÍGUEZ FERRI, E. F. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 880–882, 2003.

DUBEY J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2010.

DUBEY J. P., LINDSAY D. S, SPEER C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

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

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877–882, 2009.

DUBEY, J. P. the *Toxoplasma Gondii* Oocyst From Cat Feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636–662, 1970.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.

DUBEY, J.P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v.19, p.337–339, 1987.

EPIPHANIO, S., SINHORINI, I. L.,CATÃO-DIAS, J. L. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. **Journal of comparative pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 196-204, 2003.

ESTRADA, A. et al. Primates in peril: the significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. **PeerJ**, v. 6, p. 4869, 2018.

FELIN, E.; NÄREAHO, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Comparison of commercial ELISA tests for the detection of *Toxoplasma* antibodies in the meat juice of naturally infected pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 30–34, 2017.

FERGUSON D., DAVID J P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009.

FERREIRA, A. W. et al. Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes. In: **Diagnóstico Laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes**, p. 443-443, 2001.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. 4, n. 10, p. 273–278, 1988.

COUTINHO, S. G., et al. Análise comparativa entre as sensibilidades da reação indireta de anticorpos fluorescentes e da reação de Sabin-Feldman na pesquisa de anticorpos séricos para toxoplasmose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 5, p. 315-325, 1970.

GRUMANN, M. R. et al. Immunohistochemical and serological aspects of *Toxoplasma gondii* infection in Neotropical primates. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1375-1382, 2017.

HILL, D. E., CHIRUKANDOTH, S., DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal health research reviews**, v. 6, n. 1, p. 41, 2005.

HOLSBACK, L. et al. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of *Toxoplasma gondii* in free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 721-726, 2012.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio, p. 622.

IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on [01 in February, 2021].

KOMPALIC-CRISTO, A. et al. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 92-95, 2004.

LEITE T. et al.. 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, p. 307–310, 2008.

MARQUES, T. et al. Revisão sistemática dos métodos sorológicos utilizados em gestantes nos programas de triagem diagnóstica pré-natal da toxoplasmose. **Revista Medicina Minas Gerais**, v. 25, n. 6, p. 68–81, 2015.

MARQUES-SANTOS, F. et al. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and risk factors for infection in pigs raised and slaughtered in the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 570-576, 2017.

MELO, R. P. B., et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in heart tissue from common marmoset (*Callithrix jacchus*) monitored for yellow fever and rabies in Pernambuco state, Northeastern of Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 100 - 447, 2020.

MEYER, L. S. A., MARCIO R. P., FERNANDO C P. Assessing the exposure of lion tamarins (*Leontopithecus spp.*) to future climate change. **American Journal of Primatology**, v. 76, n. 6, p. 551-562, 2014.

MINERVINO, A. H. H. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive non-human primates in the Amazon region, Brazil. **Journal of medical primatology**, v. 46, n. 6, p. 343-346, 2017.

MOLINA, C. V. et al. Negative serosurvey of *Toxoplasma gondii* antibodies in Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) from Niterói/RJ, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 115-118, 2017.

MORRISSETTE, N. S.; AJIOKA, J. W.; NICOLLE, C. The early years of *Toxoplasma* research : What ' s past is prologue. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 865–869, 2009.

MOURA, M. A., AMENDOEIRA, M. R. R., BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 862-864, 2009.

MURAT, J. B., et al. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 9, p. 943-956, 2013.

NICOLLE M.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 148, p. 369, 1909.

NIEHAUS, C., et al. Relationship between *Toxoplasma gondii* exposure and Forest Cover and Precipitation in Neotropical Primates of Costa Rica. **Authorea Preprints**, 2020.

NISHIMURA, M. et al. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. **Parasitology International**, v. 68, n. 1, p. 79–86, 2019.

OH, H. et al. An outbreak of toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in South Korea. **Journal of medical primatology**, v. 47, n. 4, p. 238-246, 2018.

OLIVEIRA, L. C.; DIETZ, J. M. Predation risk and the interspecific association of two Brazilian Atlantic forest primates in Cabruca agroforest. **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 9, p. 852-860, 2011.

PARDINI, L. et al. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Parasitology international**, v. 64, n. 6, p. 587-590, 2015.

PAULA, N. F., et al. Host range and susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in captive neotropical and Old-world primates. **Journal of Medical Primatology**, v.49, p. 202-210. 2020.

PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561–569, 2008.

- PEREZ-SWEENEY, B. M. et al. Examination of the taxonomy and diversification of *Leontopithecus* using the mitochondrial control region. **International Journal of Primatology**, v. 29, n. 1, p. 245-263, 2008.
- PINTO, L. P. S.; RYLANDS, A. B. Geographic distribution of the golden-headed lion tamarin, *leontopithecus chrysomelas*: Implications for its management and conservation. **Folia Primatologica**, v. 68, n. 3–5, p. 161–180, 1997.
- PIRES, J. S. et al. Infection by *Toxoplasma gondii* in Neotropical non-human primates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1041-1044, 2012.
- PORTILHO, M. B. F., CARVALHO, A. V. A toxoplasmose em felinos: parasitologia, imunologia e diagnóstico animal. **Agrariae Liber**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2019.
- RABOY, B. E.; DIETZ, J. M. Diet, foraging, and use of space in wild golden-headed lion tamarins. **American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists**, v. 63, n. 1, p. 1-15, 2004.
- REIS, N.R., PERACCHI, A.L. ANDRADE, F.R. Primatas Brasileiros. 1ª ed. **Londrina: Technical Books**, p. 359, 2008.
- ROBERT-GANGNEUX, F., DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
- RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Systematics, distributions, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: RYLANDS, A. B. Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology. **Oxford, Oxford University Press**, p.11-77, 1993.
- RYLANDS, A.B., KIERULFF, M.C.M. e PINTO, L.P. S. Distribution and status of lion tamarins. In D.G. Kleiman and A.B. Rylands (eds.), **Lion Tamarins Biology and Conservation**, p. 42-70, 2002.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA JR, J. S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **International Zoo Yearbook**, v. 46, n. 1, p. 11-24, 2012.
- RYLANDS, ANTHONY B., et al. "Primates of the Atlantic forest." *Adaptive radiations of Neotropical primates*. **Springer, Boston, MA**, p 21-51, 1996.
- SANCHEZ M. C. A. Testes Sorológicos In: Ferreira AW, Ávila, SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, p 9 – 48, 2001.
- SANTANA, C. H., et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a lethal toxoplasmosis outbreak affecting captive howler monkeys (*Alouatta* sp.). **Journal of Medical Primatology**, v. 6, p. 12506, 2020.

SANTOS, S. V. et al. Fatal toxoplasmosis in a southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from São Paulo state, Brazil: Pathological, immunohistochemical, and molecular characterization. **Journal of medical primatology**, v. 47, n. 2, p. 124-127, 2018.

SCHLÜTER, D. et al. International Journal of Medical Microbiology Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 917–929, 2014.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: Opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 6, p. 504–512, 2006.

SOUZA, W., and BELFORT J. R., R., comp. Apresentação. In: *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: **Editores Fiocruz**, 2014, pp. 17-19. ISBN: 978-85-7541-571-9.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMAR, R.C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, p. 131-143, 2010.

SPALDING, S. M. et al. Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 105–110, 2002.

SPLENDRE, A. Sopra um nuovo protozoo parasita dei conigli. **Sci Society Magazine São Paulo**, v. 4, 1909.

SUBAUSTE, C. S., AJZENBERG, D., KIJLSTRA, A. Review of the series “Disease of the year 2011: toxoplasmosis” pathophysiology of toxoplasmosis. **Ocular immunology and inflammation**, v. 19, n. 5, p. 297-306, 2011.

SULLIVAN, W. J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 717–733, 2012.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, LOUIS M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

VALENTINI, E. J. G. et al. Investigação sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* em colônia de macacos da espécie *Macaca mulatta*. **Arquivo do Instituto de Biologia de São Paulo**, v. 71, p. 507-510, 2004.

VIANA, V. M. Dynamics and restoration of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest. **Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities**, p. 351-365, 1997.

VILLARD, O. et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection.

Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 22–33, 2016.

WEBSTER, J. P. Review of “Toxoplasmosis of Animals and Humans (Second Edition)” by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 112, 2010.

YÜCESAN, B. et al. Investigation of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Cats Using Sabin-Feldman Dye Test in Ankara in 2016. **Turkiye parazitolojii dergisi**, v. 43, n. 1, p. 5–9, 2019.

4 - ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos serão apresentados em forma de artigo científico, o qual será submetido ao periódico *International Journal of Primatology*. Desta forma, a formatação do manuscrito aqui apresentado seguirá as normas do periódico.

AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* EM MICO-LEÃO-DE-CARA-DOURADA (*Leontopithecus chrysomelas*) NO SUL DA BAHIA

Evaluation of Anti-*Toxoplasma gondii* Antibodies in Golden Face-Lion Myco
(*Leontopithecus Chrysomelas*) In Southern Bahia

Reizane P. Lordelo, Lilian S. Catenacci, Danilo Simonini, George R. Albuquerque

Resumo (Abstract)

Toxoplasma gondii é um protozoário zoonótico, mundialmente distribuído e infecta as mais variadas espécies de vertebrados. Este coccídio vem demonstrando alta virulência em primatas não humanos neotropicais de cativeiro, principalmente para aqueles pertencentes a família Callitrichidae, sendo uma importante causa de óbitos nesses animais. São escassos os estudos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas neotropicais de vida livre. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar o levantamento da presença de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas de vida livre da espécie *Leontopithecus chrysomelas*, em áreas de Mata Atlântica do Sul do estado da Bahia – Brasil. Entre os anos de 2008 a 2019 foram capturados 147 *L. chrysomelas* com recapturas e recoletas de 20 animais, obtendo assim, um total de 171 amostras de soro. Para detecção de anticorpos foi realizada sorologia aplicando o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), com ponto de corte de 1:25 e diluições de 1:50, 1:100 e 1:200. A ocorrência total de anticorpos anti-*T. gondii* foi de 2,72% (4/147) na diluição 1:25 com 2 animais positivos na diluição de 1:100. Este é o primeiro relato de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas da espécie *Leontopithecus chrysomelas* de vida livre.

Palavras-chave: primatas, sorologia, vida livre, protozoário, mata Atlântica.

Introdução

Toxoplasma gondii já foi identificado em mais de 350 espécies de animais homeotérmicos, incluindo os seres humanos, nos mais variados países do mundo (Niehaus et al., 2020; Lindsay; Dubey, 2020). A infecção causada por esse parasito pode levar a quadros assintomáticos ou discretamente sintomáticos na maioria das espécies acometidas. No entanto, em primatas não humanos (PNHs) neotropicais pode provocar doença severa com altas taxas de letalidade, principalmente nos primatas da família Callitrichidae (Dias-Catão et al., 2013; Casagrande et al., 2013; Oh et al., 2018; Paula et al., 2020; Santana et al., 2020).

Leontopithecus chrysomelas é um PNH neotropical, pertencente à família Callitrichidae conhecido como mico-leão-de-cara-dourada (Kierulff et al., 2008; Almeida-Rocha et al., 2020). Essa espécie é endêmica da mata Atlântica na região Sul da Bahia – BA e extremo norte do Estado de Minas Gerais - MG. Atualmente encontra-se na lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza – IUCN (Kierulff et al., 2008; IUCN, 2020).

Dentre as ameaças que interferem na sobrevivência dos *L. chrysomelas* no Sul da Bahia, evidencia-se o desmatamento com a redução de habitats por meio da exploração madeireira, práticas agropecuárias e agrícolas que implicam na fragmentação florestal (Raboy et al., 2010; Moraes et al., 2018). Além desses fatores, a implantação de sistemas de produção agroflorestais para o cultivo do cacau, conhecido localmente como “cabruca”, provocam uma redução da disponibilidade de recursos alimentares (Catenacci et al., 2016; Moraes et al., 2018; Almeida-Rocha et al., 2020). A redução do ambiente e a menor disponibilidade de alimentos, faz com que os primatas precisem se deslocar mais vezes ao solo em busca de alimentos tornando-os mais susceptíveis a ocorrência de infecções causadas por vírus, bactérias, helmintos e protozoários a exemplo de *Toxoplasma gondii* presentes no solo (Myers et al., 2000; Dias-Catão et al., 2013; Pereira et al., 2020).

A seroprevalência da infecção por *T. gondii* em PNH neotropicais no Brasil varia de 0 a 76% (Molina et al 2016 e Pires et al 2012). A maioria dos estudos realizados com primatas da espécie *Leontopithecus* e em outras espécies são provenientes de

animais de cativeiro (Pertz et al., 1997; Epiphanio et al., 2000; Bouer et al., 2010; Molina et al., 2017; Paula et al., 2020). Assim, torna-se necessários estudos em animais de vida livre. Neste sentido, objetivou-se com este estudo realizar o primeiro levantamento da presença de anticorpos anti-*T. gondii* em primatas da espécie *Leontopithecus chrysomelas* de vida livre, endêmicos do Sul da Bahia – Brasil.

MÉTODOS

Área de estudo

Foram realizadas coletas de amostras de sangue de *Leontopithecus chrysomelas* capturados em dezesseis pontos de capturas distribuídos em três municípios na região Sul da Bahia, sendo eles; Una-Ba, Ilhéus-Ba, Jussari-Ba. Parte das capturas ocorreram na Reserva Biológica de Una (REBIO – Una) pertencente ao município de Una-Ba (15°10'S, 39°03'W), considerada como um refúgio importante para a conservação do mico-leão-da-cara-dourada, sendo descrita por Gouvêa et al., (1976) como Mata Higrófila Sul Baiana por suas características de vegetação e umidade.

Na REBIO - Una foram implantados quatro pontos de capturas distintos denominados de quatro grupos distintos: Quintal (15°10'39"S, 39°08'48"W), Flamengo (15°09'56"S, 39°10'04"W), Palmeiras (15°10'07"S, 39°09'34"W), Rabito (15°11'45"S, 39°10'04"W). No mesmo município foram realizadas capturas em áreas fragmentos de mata circundados por atividades agrícolas e agropecuárias, sendo determinados cinco pontos de capturas Gideon (15°17'09"S, 39°08'25" W) Ribeiro (15°17'11"S, 39°08'04"W), Osawa (15°17'22"S, 39°08'22"W), Manoel Rosa (15°17'08"S, 39°08'17"W), Elias (39°08'23"W, 15°17'22"S).

Também foram organizados seis girais de capturas de seis grupos que sobrevivem em áreas de sistema agroflorestal de cacau (“cabruca”) distribuídos nos municípios de Jussari-Ba (15°11'29"S, 39°29'43"W) e Ilhéus – Ba (14°47'20"S, 39°02'58"W). São eles: Teimoso (15°09'19"S, 39°31'17"W), Santa Rita (14°41'58"S,

39°11'50"W), Almada (14°39'49"S, 39°11'45"W), Ararauna (15°18'31"S, 39°09'59"W), Bom pastor (14°41'06"S, 39°10'22"W) e Bonfim (14°39'39"S, 39°11'49"W).

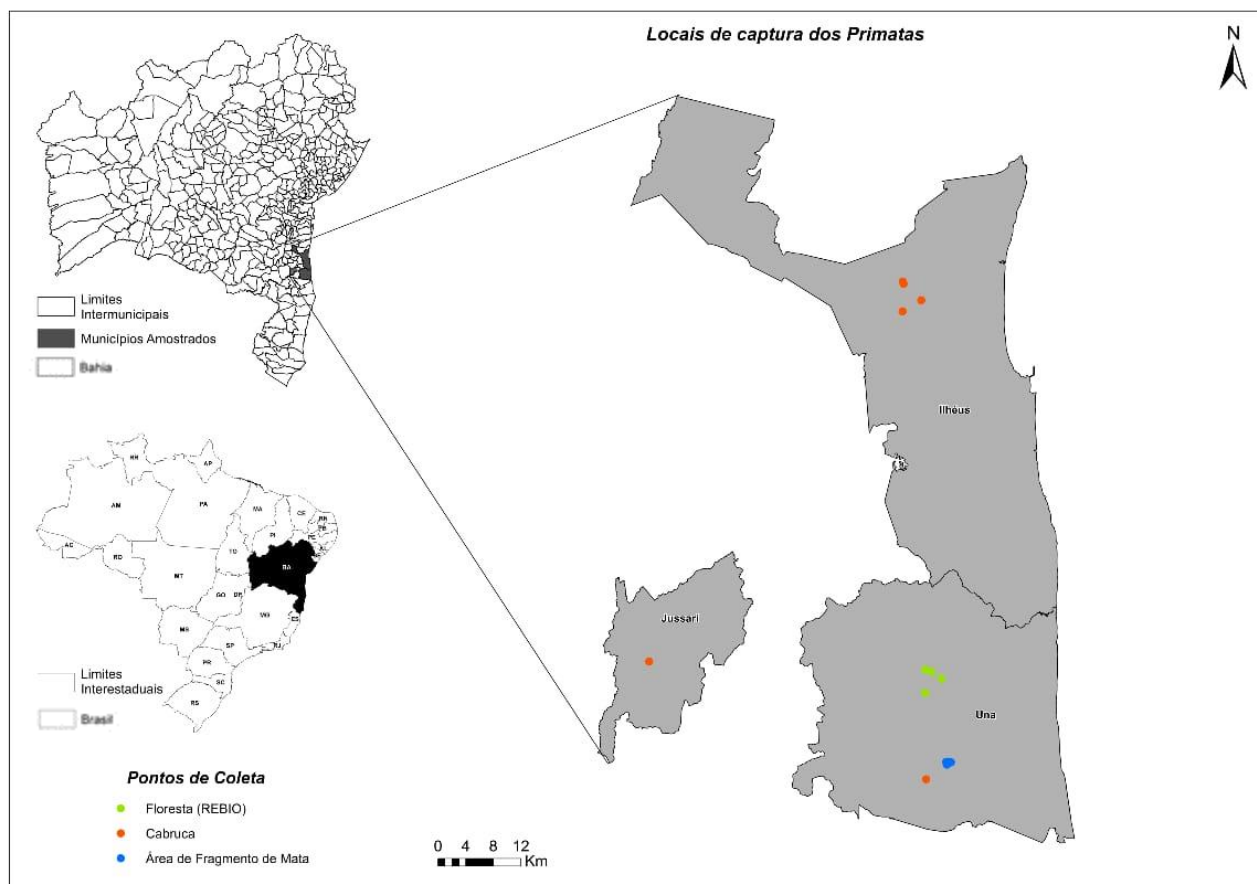


Figura 1: Pontos de captura de *Leontopithecus chrysomelas* distribuídos em três municípios no sul da Bahia.

Capturas

As capturas ocorreram entre os anos de 2008 a 2019, após submissão e aprovação no Comitê de ética de Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC sob o protocolo de número 004/2008. Além disso, esta pesquisa foi submetida ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO sob os números 11885-1, 113/2007, 23069-2, 15025-1, 12787-1, 12787-3, 12787-4, 23457-4, 23457-5, 45513-1.

Para as capturas, foram estabelecidos pontos estratégicos nas regiões de mata em locais conhecidos previamente de passagem dos primatas e próximo aos ocos (locais onde os animais dormem). Nestes locais foram montados girais para alocar armadilhas automáticas do tipo Tomahawk (Figura 2). Essas armadilhas possuem dimensões de 15cm x 15cm x 30cm, sendo utilizadas habitualmente nas práticas de captura de mamíferos de até 1kg de massa corporal, de acordo com a metodologia estabelecida por Dietz et al., (1996).

O interior das armadilhas foi cevado com bananas maduras para atrair os animais. Nos três primeiros dias após as instalações das armadilhas, eram abertas sem serem ativadas para que os animais pudessem entrar e sair e assim se acostumassem com as mesmas. Após esse período de adaptação, que dura em média 1 semana, as mesmas eram armadas, cevadas e monitoradas a cada três horas.



Figura 2: Gaiola do tipo Tomahawk com *Leontopithecus chrysomelas* capturado.

A abertura e ativação das armadilhas iniciavam as 04:00hs no período do verão e as 05:00hs no período chuvoso e eram fechadas e encerradas as 15 horas do mesmo dia.

Após serem capturados, os primatas eram encaminhados para base de campo próximo ao local de captura para realização dos procedimentos de contenção química, avaliação física e colheita de material biológico.

Colheita de material biológico

Foram excluídos do estudo os animais com peso menor de 100 gramas e as fêmeas com filhotes ou supostamente prenhas. Estes foram soltos no local de captura. Para os demais, foi realizado o procedimento de anestesia inalatória por meio de vaporização universal (Figura 1 a) com utilização do agente anestésico Isoflurano 100% (Braz et al., 2019) ou anestesia dissociativa com uma injeção de cloridrato de cetamina (10 mg / kg; i.m.) e cloridrato de midazolam (0,3 mg / kg; i.m.) (Catenacci et al. 2016).

Após a indução anestésica do animal, foi realizado o monitoramento da frequência cardíaca e respiratória, além de testes de reflexos (palpebral, interdigital e anal) durante todo o procedimento. Em seguida, o animal, passava por um processo de avaliação física para coleta de dados (sexo, idade estimada e peso), sendo considerados como jovens os animais de com idade estimada de três meses a um ano de vida, subadultos aqueles com um a dois anos e adultos com idade acima de dois anos. Posteriormente, era realizada a colheita de sangue por meio de venopunção da veia femural, obtendo até 3ml (Figura 3 b).

Para coletas realizadas com a utilização da anestesia inalatória as amostras obtidas foram adicionadas a um microtubo contendo gel ativador de coágulo, identificadas e armazenadas a - 4 ° C em caixa de isopor contendo gelo até serem encaminhadas ao laboratório para posteriores processamentos. Já para coletas obtidas de animais que passavam por anestesia dissociativa as amostras de sangue

eram mantidas a 4°C por 3 h até centrifugação para coleta de soro, sendo então colocado em nitrogênio líquido até serem encaminhadas ao laboratório.

Todo procedimento durava no máximo 20 minutos para garantir o menor nível de estresse possível ao animal. Após o processamento, o animal era colocado na sua armadilha de origem até o retorno anestésico. Depois do retorno completo, os PNH recebiam uma banana no interior na armadilha, após se alimentar, eram soltos no mesmo local em que foram capturados. As solturas ocorriam sempre até as 16 horas, devido ao hábito diurno desses animais. Os animais que passaram por anestesia dissociativa eram liberados apenas na manhã do dia seguinte no local de captura (Miller e Dietz 2006).



Figura 3: Procedimentos para colheita de material biológico em *Leontopithecus chrysomelas* (A) Realização de anestesia inalatória no interior de armadilha do tipo Tomahawk, (B) colheita de sangue através da veia femoral durante o procedimento anestésico.

Diagnóstico sorológico

As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro e acondicionadas em microtubos, identificadas e armazenadas a -20 °C até a realização do exame sorológico.

A técnica de diagnóstico sorológico empregada foi a de Aglutinação Modificada (MAT) de acordo com o protocolo utilizado por Dubey e Desmonts (1987), com o objetivo de realizar a detecção de anticorpos anti-*T gondii* nas amostras analisadas. Foram usados soros sabidamente positivo e negativo como controles para facilitar a interpretação dos resultados das reações das amostras.

Foram considerados como reações positivas as amostras que após o tempo de incubação formaram uma malha pouca definida com abrangência de pelo menos 50% da área da cavidade da microplaca. Já as amostras negativas, foram aquelas que formaram um depósito de antígenos no fundo do poço em forma de botão bem evidente. Para as amostras com resultado positivo, foram realizadas diluições seriadas de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200.

Análise Estatística

Para avaliar a associação entre os dados epidemiológicos e os resultados da sorologia foi aplicado o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson, considerando o nível de significância (α) de 5% ($p < 0,05$). Para realização dos testes foi utilizado o programa EpiInfo™ v.3.5.1.

Resultados

Foram avaliados 147 *Leontopithecus chrysomelas* endêmicos de áreas de mata Atlântica do Sul da Bahia. Deste total, foram feitas recapturas de 20 animais com recoletas de amostras, totalizando assim, 171 amostras de soro.

Dos 147 *L. chrysomelas* pesquisados, 2,72% (4) tiveram anticorpos reagentes para *Toxoplasma gondii* na diluição 1:25. Dessas 4 amostras, apenas duas foram

reagentes na titulação de anticorpos de 1:50 e 1:100. Todos os animais positivos eram adultos, sendo três machos e uma fêmea. Todos os primatas recapturados foram negativos.

Dos animais pesquisados, 37,41% (55/147) eram fêmeas, 57,82% (85/147) machos e 4,76% (7/147) não foram identificados. Em relação a idade dos animais 9,35% (14/147) eram jovens, 24,56% (36/147) subadultos, 59,65% (88/147) adultos e 6,43% (9/147) não foram identificados. Na tabela 2 estão descritas as distribuições dos *L. Chrysomelas* e os ambientes de capturas, bem como, os animais reagentes para *T. gondii*.

Tabela 1: Distribuição dos *Leontopithecus chrysomelas* por ambientes de capturas e resultado do teste sorológico.

Locais de capturas	Primatas capturados	Porcentagem %	Positivos	Negativos
REBIO - Una	51	34,69	1	50
Agroflorestas	59	40,14	3	56
Fragmentos florestais	37	25,17	0	37
Total	147	100%	4	143

Considerando um p-valor < 0,05 foi possível observar que não houve diferença estatística significativa entre a frequência de animais reagentes, idade, sexo e local de captura. A prevalência foi de 2,7% (IC 95%: 1,0%-7,1%).

Discussão

Neste estudo, dos 147 primatas da espécie *L. chrysomelas* pesquisados, 2,72% tiveram anticorpos IgG reagentes para *Toxoplasma gondii*. As baixas frequências na detecção de anticorpos nesta pesquisa corroboram com estudos realizados em cativeiros no Brasil (Bouer et al., 2010; Molina et al., 2017; Paula et al., 2020).

De acordo com um estudo realizado por Catão-Dias et al., (2013), baseado em dados clínicos, patológicos e experimentais, existem espécies de primatas que são mais susceptíveis a infecção por *T. gondii*, com maior tendência a desenvolver infecções graves e fatais. As espécies de *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callithrix* são os primatas neotropicais que apresentam maior susceptibilidade para desenvolver infecção aguda, com mortalidade próxima a 100% antes mesmo do início da produção de Imunoglobulina G. O baixo índice de animais reagentes para *T. gondii*, contribui para o entendimento de que a toxoplasmose nesses animais pode estar associada a morte súbita, sem permitir tempo suficiente para que ocorra soroconversão (Paula et al., 2020; Epiphany et al., 2000; Bouer et al., 2010; Pardini et al., 2015).

A alta susceptibilidade dos Callitrichidae em desenvolver infecção grave pode estar associada a evolução desta espécie sem o contato com felídeos por mais de 20 milhões de anos e seu padrão evolutivo extremamente arborícola, principalmente em áreas não degradadas, o que diminui o contato com o solo e conseqüentemente com os oocistos liberados nas fezes dos felídeos (Catão-Dias et al., 2013). A ausência desse contato frequente com o agente, acaba impossibilitando a estimulação do sistema imunológico para a formação de anticorpos anti-*T. gondii*, inviabilizando assim, a formação de uma resposta imunológica efetiva (Dubey, 2010; Catão-Dias et al., 2013).

Três dos 4 primatas com anticorpos anti-*T. gondii* foram oriundos de áreas de sistema agroflorestral, no qual há um maior manejo e raleio de árvores para plantio. É possível que a expansão do meio urbano associado ao desmatamento, fragmentação florestal e sistemas agroflorestrais possam contribuir para que os animais desçam com maior frequência ao solo em busca de alimentos ou para se deslocar. Esses eventos contribuem para aumentar a possibilidade de contato com fezes de felinos selvagens e domésticos contendo oocistos infectantes, bem como, com lixo de humanos, expondo-os a infecção (Altizer et al., 2007; Carne et al., 2009; Santos et al., 2014; Albuquerque et al. 2020). Daí a importância em continuar e priorizar o monitoramento de saúde destes primatas em áreas rurais ou mais antropizadas.

Conclusão

O presente estudo comprovou a presença de infecção por *Toxoplasma gondii* em primatas da espécie *Leontopithecus chrysomelas* de vida livre que habitam na região Sul do estado da Bahia – Brasil, por meio do método sorológico MAT. Assim, esta pesquisa contribui diretamente para compreensão da distribuição da infecção por *T. gondii* em *L. chrysomelas* de vida livre, sendo de grande importância para a conservação desta espécie por se tratar de uma enfermidade altamente patogênica e pela inexistência de estudos em primatas nesta região. Além disso, confirma o mesmo padrão de frequência de anticorpos obtidos em primatas de cativeiros, reforçando a hipótese de que os *L. chrysomelas* de vida livre encontram-se entre as espécies mais susceptíveis a infecção fatal na fase aguda, portanto com baixas frequências de anticorpos. Assim, sugerimos a realização de novas pesquisas na região, afim de detectar os principais genótipos que acometem esses animais, bem como, a relação da infecção por *T. gondii* e a ação do sistema imunológico.

Agradecimentos

Agradecemos ao Projeto Bio Brasil, ao Centro de Pesquisa e Conservação da Sociedade Zoológica de Antuérpia na Bélgica, ao Instituto de Estudos Socioambientais do Sul da Bahia (IESB), bem como, ao Projeto Almada Mata Atlântica Brasil (AMAP – Brasil), da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC) e a Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus Botucatu por proporcionarem meios que viabilizaram a realização desta pesquisa. Agradecemos também a Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa da Bahia pelo apoio financeiro. Agradecemos ainda, a todos os pesquisadores envolvidos de forma direta e indireta neste trabalho por meio de orientações, avaliações e informações.

Referências Bibliográficas

- Albuquerque, J. R., & Oliveira, M. A. B. (2020). Common marmosets *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758) (Primates: Cebidae: Callitrichinae) in an urban mangrove: behavioral ecology and environmental influences. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais*, 15(3),617-632. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v15i3.219>.
- Almeida-Rocha, J. M., Peres, C. A., Monsalvo, J. A., & Oliveira, L. D. C. (2020). Habitat determinants of golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) occupancy of cacao agroforests: Gloomy conservation prospects for management intensification. *American Journal of Primatology*, 82(9), e23179. <https://doi.org/10.1002/ajp.23179>.
- Altizer, S., Nunn, C.L. & Lindenfors, P. (2007). Do threatened hosts have fewer parasites? A comparative study in primates. *Journal of Animal Ecology*, 76, 304–314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01214.x>.
- Bezerra, R., Giné, G., Maciel, B., Gaiotto, F., & Albuquerque, G. (2015). Identification and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in free-ranging bristle-spined porcupine (*Chaetomys subspinosus*), a threatened arboreal mammal from the Brazilian Atlantic Forest. *Parasites & Vectors*, 8(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0882-6>.
- Braz, B. A., Fogaça, M. D., Victorio, G. G., & Ferreira, L. G. (2019). Método de captura e sedação utilizado em um grupo de híbridos de *Callithrix penicillata* e *Callithrix jacchus* (Primates: Callitrichidae) em uma floresta urbana no Instituto Butantan, São Paulo. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia*, 80, 16-19.
- Bouer, A., Werther, K., Machado, R. Z., Nakaghi, A. C. H., Epiphanyo, S., & Catão-Dias, J. L. (2010). Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally and naturally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and indirect ELISA. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(1), 26-31. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01901005>.
- Carme, B., Demar, M., Ajzenberg, D., & Dardé, M. L. (2009). Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerging infectious diseases*, 15(4), 656. doi: 10.3201/eid1504.081306.
- Casagrande, R. A., da Silva, T. C., Pescador, C. A. et al., (2013). Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(1), 94-98. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000100017>.
- Catão-Dias, J. L., Epiphanyo, S., & Kierulff, M. C. M. (2013). Neotropical primates and their susceptibility to *Toxoplasma gondii*: new insights for an old problem. *In Primates, pathogens, and evolution*, p. 253-289.

Catenacci, L. S., Pessoa, M. S., Nogueira-Filho, S. L., & De Vleeschouwer, K. M. (2016). Diet and feeding behavior of *Leontopithecus chrysomelas* (Callitrichidae) in degraded areas of the Atlantic Forest of South-Bahia, Brazil. *International Journal of Primatology*, 37(2), 136-157. Doi <https://doi.org/10.1007/s10764-016-9889-x>.

Catenacci, L. S., Ferreira, M., Martins, L. C., De Vleeschouwer, K. M., Cassano, C. R., Oliveira, L. C., ... & da Rosa, E. T. (2018). Surveillance of arboviruses in primates and sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. *EcoHealth*, 15(4), 777-791. doi:10.1007/s10393-018-1361-2

Dietz, J.M., de Sousa, S.N. e Billerbeck, R. 1996. 16 Population dynamics of golden-headed-lion17 tamarins *Leontopithecus chrysomelas* in Una Reserve, Brazil. *Dodo*, 32: 115-122.

Dubey J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2010.

Dubey, J. P., Desmonts, G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine veterinary journal*, 19(4), 337-339. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1987.tb01426.x>.

Epiphanio, S., Guimarães, M. A. V., Fedullo, D. L., Correa, S. H., Catão-Dias, J. L. (2000). Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(2).

231235.[https://doi.org/10.1638/10427260\(2000\)031\[0231:TIGHLT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/10427260(2000)031[0231:TIGHLT]2.0.CO;2)

Estrada, A., Garber, P. A., Mittermeier, R. A., Wich, S., Gouveia, S., Dobrovolski, R., Setiawan, A. (2018). Primates in peril: the significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. *PeerJ*, 6, e4869. <https://doi.org/10.7717/peerj.4869>.

GOUVÊA, J., & MATTOS, L. & HORI, M. (1976). Fitogeografia In: Diagnóstico Socioeconômico da Região Cacaueira, vol 7: Recursos Florestais. *Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas–OEA. Ilhéus, Bahia, Brasil.*

IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on [01 in February, 2021].

Kierulff, M. C. M., Rylands A. B., Mendes S. L., Oliveira M. M. 2008. *Leontopithecus chrysomelas*. In: International Union for Conservation of Nature – IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species [online]. Version 2015.2. Available from: www.iucnredlist.org.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (2020). Toxoplasmosis in wild and domestic animals. *Toxoplasma Gondii*, 293–320.

- Mbora, D. N., McPeck, M. A. (2009). Host density and human activities mediate increased parasite prevalence and richness in primates threatened by habitat loss and fragmentation. *Journal of Animal Ecology*, 78(1), 210-218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01481.x>.
- Meyer, A. L., Pie, M. R., & Passos, F. C. (2014). Assessing the exposure of lion tamarins (*Leontopithecus spp.*) to future climate change. *American Journal of Primatology*, 76(6), 551-562. <https://doi.org/10.1002/ajp.22247>.
- Miller K. E., Dietz J. M. (2006). Effects of individual and group characteristics on feeding behaviors in wild *Leontopithecus rosalia*. *Int J Primatol* 26:1291–1319. <https://doi.org/10.1007/s10764-005-8854-7>
- Molina, C. V., Krawczak, F. D. S., Bueno, M. G., Soares, H. S., Genari, S. M., Pissinatti, A., & Catão-Dias, J. L. (2017). Negative serosurvey of *Toxoplasma gondii* antibodies in Golden-headed Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) from Niterói/RJ, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(1), 115-118. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612016069>.
- Moraes, A. M., Grativol, A. D., De Vleeschouwer, K. M., Ruiz-Miranda, C. R., Raboy, B. E., Oliveira, L. C., & Galbusera, P. H. A. (2018). Population Genetic Structure of an Endangered Endemic Primate (*Leontopithecus chrysomelas*) in a Highly Fragmented Atlantic Coastal Rain Forest. *Folia Primatologica*, 365–381. <https://doi.org/10.1159/000492176>.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, G., Fonseca G.A.B. e Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>.
- Niehaus, C., Spínola, M., Su, C., Rojas, N., Rico-Chávez, O., Ibarra-Cerdena, C., & Chaves, A. (2020). Relationship between *Toxoplasma gondii* exposure and Forest Cover and Precipitation in Neotropical Primates of Costa Rica. *Frontiers in Veterinary Scienc.* 7:583032. doi 10.22541/au.159188468.88616416.
- Oh H., Eo K.Y., Gumber S., Hong J.J., et al. (2018). An outbreak of toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in South Korea. *J Med Primatol. Journal of Medical Primatology*, 47(4), 238–24630. <https://doi.org/10.1111/jmp.12344>.
- Pardini, L., Dellarupe, A., Bacigalupe, D., Quiroga, M. A., Moré, G., Rambeaud, M., & Venturini, M. C. 2015. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). *Parasitology International*, 64(6), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.08.009>
- Paula, N. F. D., Dutra, K. S., Oliveira, A. R. D., Santos, D. O. D., Rocha, C. E. V., Vitor, R. W. D. A., Santos, R. L. (2020). Host range and susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in captive neotropical and Old-world primates. *Journal of Medical Primatology*, 49(4), 202-210. <https://doi.org/10.1111/jmp.12470>.

Pereira, F. V., Lucena, F. P., Rodrigues, R. L., Barros, L. A., Pires, C. A., Ferreira, A. M. R., & Mello, M. F. V. (2020). Prevalência e distribuição espacial da ocorrência de helmintos em primatas não humanos de vida livre no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(5), 1705-1712. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11868>.

Pertz, C., Dubielzig, R. R., & Lindsay, D. S. (1997). Fatal *Toxoplasma gondii* infection in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia rosalia*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 491-493.

Raboy, B.E., Neves, L.G., Zeigler S., Saraiva, N.A., Cardoso, N., Santos, G.R. dos, Ballou, J.D. & Leimgruber, P. 2010. Strength of habitat and landscape metrics in predicting golden-headed Lion tamarin presence or absence in Forest patches in southern Bahia, Brazil. *Biotropica* 42(3): 388-397. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2009.00595.x>.

Rocha, D. S., Nilsson, M. G., Maciel, B. M., Pena, H. F. J., Alves, B. F., Silva, A. V., & Albuquerque, G. R. (2018). Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* Isolates From Free-Range Chickens In Bahia, Brazil. *Journal of Parasitology*, 104(4), 377–382. <https://doi.org/10.1645/18-9>.

Santana, C. H., de Oliveira, A. R., Dos Santos, D. O., Pimentel, S. P., de Souza, L. D. R., Moreira, L. G. A., & Santos, R. L. (2020). Genotyping of *Toxoplasma gondii* in a lethal toxoplasmosis outbreak affecting captive howler monkeys (*Alouatta sp.*). *Journal of Medical Primatology*, V 6, p. 12506. <https://doi.org/10.1111/jmp.12506>.

Santos, M., Duarte, M., Young, R. J. (2014). Behavioural and ecological aspects of black tufted-ear marmosets, *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) (Primates: Callitrichidae) in a semi-urban environment. *Revista de Etologia = Journal of Ethology*, 13(1), 37-46.

Santos, S. V., Pena, H. F., Talebi, M. G., Teixeira, R. H., Kanamura, C. T., Diaz-Delgado, J., Catão-Dias, J. L. (2018). Fatal toxoplasmosis in a southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from São Paulo state, Brazil: Pathological, immunohistochemical, and molecular characterization. *Journal of medical primatology*, 47(2), 124-127. <https://doi.org/10.1111/jmp.12326>.

Zeigler, S.L., Fagan, W. F., DeFries, R. & Raboy, B.E. 2010. Identifying important forest patches for the long-term persistence of the endangered golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*). *Tropical Conservation Science*, 3(1): 63-77. <https://doi.org/10.1177/194008291000300106>.

ANEXO I

PROTOCOLO DO TESTE DE AGLUTINAÇÃO MODIFICADA (MAT) PARA *Toxoplasma gondii*

Laboratório do Dr. Chunlei Su. 5-7-2014. Departamento de Microbiologia da Universidade de Tennessee Knoxville.

Modificado do protocolo do Dr. Dubey. Laboratório do Dr. Chunlei Su. 5-7-2014.
Modificado do protocolo do Dr. Dubey.

Materiais:

- a) 1x PBS, estéril pH 7,2. Armazene a 4C.
- b) Tampão alcalino (semelhante ao Tampão de diluição do antígeno no protocolo de Dubey) (7,02 g NaCl, 3,09 g ácido bórico (H₃BO₃), 24 ml de NaOH 1N, 4 g de albumina de plasma bovino (fração V) em 1 litro de água destilada, ajustar o pH para 8,7, adicionar 1 g de azida de sódio (0,1% final) como conservante), pH final 8,2- 8.4. Armazene a 4C.
- c) Antígeno de célula inteira de Toxoplasma (antígeno MAT de *T. gondii*, parasitas inteiros fixados em formalina, KeraFAST # EH2001, 4 ml de 2x10⁸ taqui / ml).
- d) 2-mercaptoetanol.
- e) Corante azul de Evans (2 mg / ml em H₂O).
- f) Placas de microtitulação de fundo em U de 96 poços.
- g) Soro de controle positivo (título 1: 200).
- h) Soro de controle negativo.
- l) Amostras de soro. Nota: A quantidade mínima de soro para uma amostra é 6 ul.

Procedimentos:

1. Para a primeira rodada do teste para identificar amostras soropositivas, cada amostra de soro será diluída 1:25 em 1x PBS em tubos de 1,5 ml.

1X PBS	72,0 ul
Amostra de soro	3 ul

Volume total 75 ul (Misture bem)

2. Transfira 50 µl de amostras diluídas para a primeira e quinta fileiras de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U. (20 amostras, 1 controle negativo e 1 controle positivo). Consulte o Modelo 1 para diluições de soro.

3. Adicione 25 µl de PBS ao resto dos poços usando uma pipeta multicanal.

4. Faça a diluição em série para 1: 200 para cada amostra, mas para 1: 3.200 para controles negativos e positivos. Descartar os últimos 25 ul de amostras de soro diluídas.

5. Prepare a mistura de antígeno (cada placa de 96 poços):

Tampão Alcalino	2,5 ml
2-mercaptoetanol	35 ul
Corante azul de Evans	(2 mg / ml em H ₂ O) 50 ul
Antígeno MAT de <i>T. gondii</i>	150 ul

Total 2.735 ml

6. Misture bem o antígeno por pipetagem, transfira imediatamente 25 ul da mistura de antígeno para cada poço usando multicanal pipeta. Para evitar o transporte de soro, as pontas da pipeta não devem tocar o fundo do poço. Toque em placa levemente para levar o líquido para o fundo dos poços. Nota: Cada poço tem 30×10^4 tachys.

7. Um controle positivo deve ser incluído em cada placa. O controle deve ter um título de 1: 200, e duas vezes diluições de 1:25 a 1: 3200 devem ser usadas (diluição de 8 séries).

8. Cubra a placa com fita adesiva e incube a 37 ° C durante a noite (cerca de 16 horas) e, em seguida, 4 ° C por 4 – 6 horas. Leia os resultados. Um pellet no fundo do poço significa negativo. As amostras sem pellets são positivas.

9. Para amostras positivas com títulos $\geq 1: 200$, outro teste será realizado para determinar os títulos. Diluições em série incluem 1:25, 50, 100, 200.

10. Realize o ensaio MAT como acima.