

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DE INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII*
EM COLÔNIA DE MACACOS DA ESPÉCIE *MACACA MULATTA*E.J.G. Valentini², A. Caprara^{1*}, S.L.P. Souza¹, V.G.M. Mattaraia¹,
S.M. Gennari¹, U.P. Rodrigues², F.M. Francisco¹, R.M. Soares¹

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: rosoares@usp.br

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário de parasitismo intracelular obrigatório, capaz de infectar diversas espécies de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem. Infecções por *T. gondii* manifestam-se, em geral, de forma assintomática em macacos do Velho Mundo, de forma que a suscetibilidade ao agente e a sua patogenicidade sejam similares ao que ocorre na espécie humana. O caráter oportunista do agente, assim como para a espécie humana, também se aplica ao *T. gondii* no caso de infecções em macacos do Velho Mundo, pois condições que favoreçam o estabelecimento de estado imunossupressivo podem predispor estes animais à toxoplasmose aguda. O presente trabalho teve como objetivo realizar a investigação sorológica para a infecção por *T. gondii* em macacos Rhesus mantidos em uma colônia no Município de São Paulo. Foi comparado o desempenho de duas técnicas sorológicas, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação de aglutinação com antígenos modificados (MAT). Dos resultados, desprende-se que a prevalência da infecção é de 17,5% e 20,0% quando determinada pelo MAT e RIFI, respectivamente. As análises estatísticas indicam inexistência de diferença entre os resultados das provas. Aspectos relacionados à ocorrência e transmissão da toxoplasmose na colônia em tela são discutidos.

PALAVRAS-CHAVE: Macaco rhesus, protozoário, sorodiagnóstico, *Macaca mulatta*, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

SEROLOGICAL INVESTIGATION OF *TOXOPLASMA GONDII* INFECTION IN *MACACA MULATTA*. *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite which infects a wide range of mammals, including man. Infections in Old World monkeys are generally asymptomatic. The pathogenicity of the agent to Old World monkeys and their susceptibility to the agent resemble those of man. Opportunistic infection often occurs in immunocompromised animals predisposing them to acute toxoplasmosis. The present paper aimed to study the prevalence of serical antibodies to *T. gondii* in Rhesus monkeys kept in captivity. Performance of two serological tests, the immunofluorescent antibodies test (RIFI) and modified agglutination test (MAT) were compared. From the results it could be inferred that the seroprevalence of *T. gondii* antibodies is 17.5% and 20.0%, according to MAT and RIFI respectively. The statistical analyses indicate no differences between the results of both tests. Issues concerning the occurrence and transmission of *T. gondii* in the colony are fully discussed.

KEY WORDS: Rhesus monkey, protozoa, serodiagnosis, *Macaca mulatta*, *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii é um protozoário de parasitismo intracelular obrigatório, capaz de infectar diversas espécies de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (DUBEY, 1993). Embora infecções crônicas em seres humanos sejam, na maior parte das vezes, assintomáticas, *T. gondii* tem emergido como um importante patógeno oportunista em pacientes com

AIDS devido à imunodeficiência (McCABE & REMINGTON, 1988; LUFT *et al.*, 1993).

Sinais clínicos e achados de necrópsia, observados em infecções experimentais em macacos do Velho Mundo mostraram que estes animais sofrem, na maioria das vezes, infecções não letais por *T. gondii* (WONG & KOZEK, 1974; NERY-GUIMARAES *et al.*, 1971; COWEN &

² Instituto Butantan, Divisão Biotério Central, São Paulo, SP, Brasil.

* Bolsista de Iniciação Científica, CNPq.

WOLF, 1945) que normalmente desenvolvem-se de forma crônica (DRAPER *et al.*, 1971; ARAUJO *et al.*, 1973; WONG *et al.*, 1974), de forma que a suscetibilidade ao agente e a patogenicidade do mesmo sejam similares ao que ocorre na espécie humana (WONG *et al.*, 1974). O caráter oportunista do agente, assim como para a espécie humana, também se aplica ao *T. gondii* no caso de infecções em macacos do Velho Mundo, pois condições que favoreçam o estabelecimento de estado imunossupressivo podem predispor estes animais à toxoplasmose aguda (WONG & KOZEK, 1974; WONG *et al.*, 1974). Pneumonia, miocardite, meningoencefalite e broncopneumonia são sinais clínicos mais comuns em macacos do Velho mundo acometidos por toxoplasmose aguda (WONG *et al.*, 1974).

Estresse de captura e estresse promovido por procedimentos experimentais são exemplos de condições que podem levar macacos à imunossupressão e conseqüente reativação de infecção latente, fazendo com que a infecção por *T. gondii* possa representar um risco para animais utilizados em experimentos (WONG & KOZEK, 1974).

Face ao que foi exposto, torna-se clara a importância da toxoplasmose em primatas mantidos em cativeiro para fins de experimentação científica. O presente trabalho tem como objetivo reportar a investigação sorológica para infecção por *T. gondii* em macacos mantidos em uma colônia, com vistas ao estabelecimento de medidas de profilaxia e controle. Ainda, objetivou-se comparar duas provas para o sorodiagnóstico da infecção por *T. gondii* em macacos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação de aglutinação com antígenos modificados (MAT).

Para tanto, foram testados os soros de 40 animais pertencentes à espécie *Macaca mulatta*, conhecidos popularmente como macacos Rhesus. Os animais provêm de uma colônia mantida pelo Instituto Butantan de São Paulo, constituída por 7 machos adultos, 13 fêmeas adultas, 6 filhotes jovens e 14 filhotes infantis.

Os animais foram sedados com cloridrato de quetamina associado ao relaxante muscular cloridrato de di-hidrotiazina, administrados por via intra muscular. A colheita de sangue foi feita por punção da veia femoral sem anti-coagulante e o soro, obtido por centrifugação a 1.500 g por 10min, foi estocado a -20° C até o momento do uso.

Para a detecção da presença de anticorpos anti-*T. gondii*, as amostras de soro dos macacos foram submetidas à RIFI segundo CAMARGO (1967). Amostras de soro, em diluições seriadas na base dois, a partir de 1:16, foram incubadas a 37° C durante 30min, em câmara úmida. Após 3 lavagens por 10min. com PBS, as lâminas foram secas e conjugado (anti-macaco obtido em coelhos, Sigma™, St Louis, USA) previamente diluído em solução de PBS contendo Azul de Evans 0,01% foi adicionado. Após 30min, em câmara úmida, a 37° C foram realizadas novas lavagens e as

lâminas foram montadas. Em todas as lâminas havia soros controle positivo e negativo, os quais orientaram a interpretação da correspondente reação.

Para o teste de soroaglutinação (MAT) foi utilizada a técnica descrita por DUBEY & DESMONTS (1987). O MAT foi realizado em placas de 96 orifícios com fundo em U e os soros testados em diluições seriadas na base dois, a partir de 1:25.

Para ambas as técnicas sorológicas, foram utilizados para controle soros positivos de *Cebus apella* e *Erythrocebus patas*, gentilmente cedidos pela Profª Drª Rosângela Zacharias Machado, FCAV UNESP, Jaboticabal, SP. Foram considerados positivos para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* soros cujos títulos fossem maiores ou iguais a 16 para a RIFI e maiores ou iguais a 25 para o MAT.

As seguintes análises estatísticas foram feitas para a comparação entre a RIFI e o MAT: o teste de McNemar (McNEMAR, 1947, *apud* SIEGEL, 1981) foi utilizado para avaliar a igualdade entre as proporções de positividade geradas por cada uma das técnicas. Ainda, a concordância entre as provas foi aferida pela avaliação do coeficiente Kappa (Cohen, 1960) enquanto o teste exato de Fisher (FISHER, 1970, *apud* PETRIE & WATSON, 1999) foi utilizado para avaliar a concordância entre os resultados das provas no mesmo indivíduo. Para a medida da correlação entre a magnitude dos títulos alcançados pelas provas foi empregado o coeficiente de correlação por postos de Spearman (r) (SIEGEL, 1981).

A prevalência da infecção foi de 20% (8 / 40) quando determinada pela RIFI e de 17,5% (7 / 40) quando determinada pelo MAT. Dos animais positivos pela RIFI, 3 foram positivos com título 16, 1 com título 32, 1 com título 64, 1 com título 128, 1 com título 512 e 1 com título 1024. Dos animais positivos pelo MAT, 3 foram positivos com título 25, 2 com título 50, 1 com título 200 e 1 com título 400. Entre as 8 amostras positivas pela RIFI (título = 16), 6 foram positivas pelo MAT (título = 25), enquanto entre as 32 amostras negativas pela RIFI, uma foi positiva pelo MAT. Os resultados da RIFI e MAT, com seus respectivos títulos são mostrados na Tabela 1 de contingência.

Os resultados desta investigação demonstram que as técnicas sorológicas empregadas para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* têm uma concordância substancial quando avaliadas pelo índice Kappa (k=0,7540). Pelo teste de significância, a concordância no mesmo indivíduo demonstra a não independência entre o MAT e a RIFI, enquanto, pelo teste McNemar, não há diferença significativa entre as proporções de positividade, independentemente de concordância dos resultados, para um mesmo indivíduo. O intervalo de confiança 95% para a diferença entre as positivities está compreendido entre -6% e 11% em favor da RIFI. Em conjunto, as análises estatísticas indicam inexistência de diferença de positividade entre as provas.

Tabela 1 - Tabela de contingência para a representação dos resultados das provas sorológicas para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de macacos Rhesus.

RIFI ^b									Total
		0	16	32	64	128	512	1024	
MAT ^a	0	31	2 ^c						33
	25	1	1	1					3
	50				1	1			2
	100								0
	200						1		1
	400							1	1
Total		32	3	1	1	1	1	1	40

^a Títulos empregados no MAT^b Títulos empregados na RIFI^c Os valores dispostos no quadro interno da figura representam o número de amostras reagentes para cada título, para cada prova sorológica. Por exemplo, dois soros foram reagentes pela RIFI com título 16, mas não foram reagentes pelo MAT (título nulo).

Em relação à concordância entre os títulos alcançados pelas provas, verifica-se que existe correlação positiva altamente significativa ($r = 0,8126$, intervalo de confiança 95% para r compreendido entre 0,6657 a 0,8989 e valor de $p < 0,0001$).

Todos os animais positivos são adultos nascidos antes de 1995, exceto um animal de 18 meses cuja mãe testou positiva para a toxoplasmose por ambas as técnicas sorológicas. Vale ressaltar que todos os animais em estudo nasceram e desde então vêm sendo criados na colônia em estudo.

Na colônia em estudo, os animais são mantidos em viveiros externos ou gaiolas para casais, cobertos por telas de alambrado com malha de 10 cm. Os viveiros são divididos para alojarem grupos familiares diferentes, incluindo uma creche, que hospeda os animais após o desmame. Os animais recebem ração formulada exclusivamente para a espécie. (Nuvilab; Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Brasil). Suplementa-se ainda com ovos, pães, frutas e vegetais da época. Com base nestas informações e considerando-se as vias de transmissão do *T. gondii*, os animais soropositivos podem ter entrado em contato com o parasito pelo consumo da dieta que lhes é oferecida, por intermédio da ingestão de oocistos esporulados contaminantes de frutas e vegetais. Entretanto, as condições do viveiro permitem a invasão da colônia por animais como aves ou roedores que podem ser predados pelos macacos. De fato, a predação de roedores como fator de risco para a infecção por *T. gondii* já foi especulada por EPIPHANIO *et al.* (2000) como tentativa para explicar a ocorrência de toxoplasmose aguda, em quatro sagüis-imperadores (*Saguinus imperator*) e quatro micos-leões-de-caras-douradas (*Leontopithecus chrysomela*) mantidos em cativeiro.

Pelos resultados, concluímos que a técnica de aglutinação como descrito por DUBEY & DESMONTS (1987) pode ser empregada em estudos de triagem para o sorodiagnóstico da toxoplasmose em macacos Rhesus. Ainda, o manejo adotado para a criação em estudo permite a ocorrência de infecções por *T. gondii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F.G.; WONG, M.M.; THEIS, J.; REMINGTON, J.S. Experimental *Toxoplasma gondii* infection in a nonhuman primate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.22, n.4, p.465-472, 1973.
- CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.6, n.1, p.117-118, 1967.
- COCHRAN, W.G. Some methods for strengthening the common X2 tests. *Biometrics*, v.10, p.417-451, 1954.
- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Measurem.*, v.20, p.37-46, 1960.
- COWEN, D. & WOLF, A. Toxoplasmosis in the monkey: acute fatal infection experimentally produced in a young *Macaca mulatta*. *J. Infect. Dis.*, v.77, n.1, p.144-157, 1945.
- DRAPER, C.C.; KILLICK-KINDRICK, R.; HUTCHISON, W.M.; GARNHAM, P.C. Experimental toxoplasmosis in chimpanzees. *Br. Med. J.*, v.15, n.2(758), p.375-378, 1971.
- DUBEY, J.P. & DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.*, v.19, n.3, p.337-339, 1987.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neoplasma, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of human and animals. In: KREIER, P.J. (Ed.) *Parasitic Protozoa*, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1993. p.1-56.

- EPIPHANIO, S.; GUIMARÃES, M. A.; FEDULLO, D.L.; CORREA, S.H.; CATAO-DIAS, J.L. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity, *J. Zoo Wildl. Med.*, v.31, n.2, p.231-235, 2000.
- FISHER, R.A. *Statistical methods for research workers*. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1970.
- KENDALL, M. G. *Rank correlation methods*. London: Griffin, 1948.
- LUFT, B.J.; HAFNER, R.; KORZUN, A.H.; LEPORT, C.; ANTONISKIS, D.; BOSLER, E.M.; BOURLAND, D.D.; UTTAMCHANDANI, R.; FUHRER, J.; JACOBSON, J. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, v.30, n.329(14), p.995-1000, 1993.
- MCCABE, R. & REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis: the time has come. *N. Engl. J. Med.*, v.318, n.5, p.313-315, 1988.
- MCMENAR, Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions of percentages. *Psychometrika*, v.12, p.153-157, 1947.
- NERY-GUIMARAES, F.; FRANKEN, A.J.; CHAGAS, W.A. Toxoplasmosis in nonhuman primates. I. Natural infection in *Macaca mulatta* and *Cebus apella*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.69, n.2, p.77-87, 1971.
- PETRIE, A. & WATSON, P. *Statistics for veterinary and animal science*. Oxford: Blackwell Science, 1999. 243p.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. 350p.
- WONG, M.M. & KOZEK, W.J. Spontaneous toxoplasmosis in macaques: a report of four cases. *Lab. Anim. Sci.*, v.24, n.2, p.273-278, 1974.
- WONG, M.M.; THEIS, J.; KARR, S. J.R. Experimental toxoplasmosis in the stump-tailed macaque (*M. arctoides*). *J. Med. Primatol*, v.3, n.3, p.195-212, 1974.

Recebido em 18/3/04

Aceito em 17/12/04