



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

“Si le médecin soigne l'Homme,  
le vétérinaire soigne l'Humanité”

Louis Pasteur

## Índice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Resumen.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2. Introducción .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.1. El Proyecto Mucky .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.2 Introducción a los patógenos infecciosos y parasitarios .....</b>            | <b>6</b>  |
| <b>2.3. Importancia de la Medicina Preventiva: Bioseguridad .....</b>               | <b>6</b>  |
| <b>3. Justificación y objetivos.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>3.1. Objetivo 1: Estudio de microorganismos infecciosos y parasitarios .....</b> | <b>7</b>  |
| <b>3.2. Objetivo 2: Prácticas en un centro de rescate de primates .....</b>         | <b>8</b>  |
| <b>4. Estudio infeccioso y parasitario .....</b>                                    | <b>8</b>  |
| <b>4.1. Estudio de la prevalencia de <i>Leptospira</i> spp .....</b>                | <b>8</b>  |
| <b>4.2. Estudio de la prevalencia de Rotavirus .....</b>                            | <b>13</b> |
| <b>4.3. Estudio de la seroprevalencia de <i>Toxoplasma gondii</i> .....</b>         | <b>17</b> |
| <b>4.4. Estudio de la prevalencia de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>              | <b>22</b> |
| <b>5. Prácticas en un centro de rescate de primates.....</b>                        | <b>25</b> |
| <b>6. Conclusiones finales .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>7. Valoración personal .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>8. Autoría.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>9. Referencias.....</b>  | <b>29</b> |

## 1. Resumen

Muchas de las especies de primates neotropicales están en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat por acción del ser humano, y en primates de alto porte debido a la caza para su consumo (Kinzey, 1986). Otras amenazas, aparte de las anteriores, son las enfermedades infecciosas y parasitarias, cuya importancia radica en su gravedad, carácter inmunosupresor y potencial zoonótico (Encarnación y col., 2000; Romero y col., 2012; Bofill, 2016).

El presente Trabajo Fin de Grado tiene por objetivos la formación y adquisición de conocimientos relacionados con el cuidado básico de primates neotropicales y la patología asociada a algunas enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan a estas especies animales, así como aspectos relativos al control sanitario de un centro de rescate.

Para su realización el alumno ha llevado a cabo un estudio de patógenos de etiología infecciosa y parasitaria en el centro de rescate *Projeto Mucky*, situado en Itú, Estado de São Paulo (Brasil). Además, ha llevado a cabo un conjunto de tareas relacionadas con el manejo de primates.

En este estudio se ha investigado la prevalencia de *Leptospira* spp, Rotavirus, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* en primates neotropicales pertenecientes a los géneros *Alouatta* y *Callithrix*. La presencia de *Leptospira* spp, ha sido analizada en un total de 16 muestras de orina, colectivas e individuales, siendo todas negativas mediante cultivo microbiológico. En el caso de Rotavirus se analizaron 57 muestras de heces, colectivas e individuales, siendo todos los resultados negativos mediante PCR. La presencia de *Toxoplasma gondii* fue analizada en 11 muestras de suero de monos y una muestra de suero de gato, mediante test de aglutinación microscópica (MAT) siendo negativas todas las muestras de los monos y positiva la del gato. Finalmente, tampoco se identificó la presencia de *Trypanosoma cruzi* en 12 muestras de sangre utilizando PCR.

### **Abstract**

Many of the neotropical primate species are endangered due to the destruction of their habitat by human action as well as to the fact that large primates hunt them for their consumption (Kinzey, 1986). Other threats are infectious and parasitic diseases, because of

their gravity, immunosuppressive character and zoonotic potential (Innes, 1997; Romero et al., 2012; Bofill, 2016).

The purpose of this Final Degree Project is to provide training and knowledge regarding the basic care of neotropical primates and pathology related with some infectious and parasitic diseases which affect these animal species, as well as aspects related to the sanitary control of a rescue center.

To achieve this, the student has carried out a study of infectious and parasitic pathogens in the *Proyecto Mucky* Primate Rescue Center, located in Itú, in the State of São Paulo (Brazil). In addition, he has carried out a set of tasks related to the management of primates.

This study has researched the prevalence of *Leptospira* spp, Rotavirus, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in neotropical primates belonging to genera *Alouatta* and *Callithrix*. The presence of *Leptospira* spp has been analyzed on 16 collective and individual urine samples, all yielding negative results through microbiological culture. For Rotavirus, 57 collective and individual stool samples were analyzed, again yielding negative results through PCR. The presence of *Toxoplasma gondii* was analyzed in 11 samples of monkey serum and one sample of cat serum by Microscopic Agglutination Test (MAT), all the samples of the monkeys being negative and that of the cat positive. Finally, we did not identify the presence of *Trypanosoma cruzi* in 12 blood samples using PCR.

## **2. Introducción**

El presente Trabajo Fin de Grado (TFG) está estructurado por bloques en función de la taxonomía de los microorganismos estudiados: bacterias, virus y parásitos.

Es preciso destacar la actual situación de los primates neotropicales, situados en regiones tropicales y subtropicales, donde está localizada la mayor parte de la población. Existe, actualmente, una drástica disminución de la población como consecuencia de la deforestación de sus hábitats y caza furtiva, con especial incidencia en especies de alto porte (Encarnación y col., 2000). Otro factor que ha influido negativamente hace referencia a su mayor sensibilidad a enfermedades infecciosas y parasitarias, en comparación con los primates del Viejo Mundo (Innes, 1997).

### **2.1. El Projeto Mucky**

El *Projeto Mucky* es una ONG y un órgano de servicio público que, desde 1985, beneficia a varias especies de primates. Es la única entidad de sus características en Brasil, de acuerdo con el IBAMA 568.189 (*Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis*) y el Ministerio de Medio Ambiente, y está registrada como defensor de la vida silvestre en el Departamento de Medio Ambiente del Estado de São Paulo con el número 2452/2012.

La asociación tiene una visión de respeto, compasión y reconocimiento de la dignidad de las especies animales, para ello su misión principal es el rescate, recuperación, estudio y reproducción de especies en riesgo de extinción, ofreciendo una vida digna a los primates brasileiros víctimas de la pérdida de su hábitat natural, malos tratos, accidentes o presos por el comercio de animales.

Además, aun considerando la dificultad para conseguirlo, trabaja con el objetivo final de reintroducir los animales en el medio ambiente. No obstante y según algunos primatólogos de la asociación, la reintroducción de animales que han sido excluidos de la vida libre, que han nacido en cautividad o que son víctimas del maltrato es prácticamente imposible debido a las carencias físicas, psicológicas y las dificultades de encontrar grupo y ser aceptados.

El centro alberga varias especies de primates neotropicales de las especies *Callithrix penicillata*, *Callithrix jacchus*, *Callithrix aurita*, *Callithrix geoffroyi*, *Saimiri sciureus*, *Alouatta guariba* y *Alouatta caraya* a los que ofrece alojamiento, cuidados ininterrumpidos y atención veterinaria. La asociación también se dedica a la lucha contra el comercio de animales silvestres mediante la educación ambiental.

La casuística del centro incluye principalmente animales desnutridos, ciegos, con miembros fracturados o amputados y problemas de locomoción, generalmente, debido a las lesiones sufridas por la manutención inadecuada de animales en hábitats que no son los propios.

Una vez llegan al centro, los animales reciben una atención veterinaria con tratamientos alopáticos y/u homeopáticos. La asociación es también partidaria de la terapia alternativa mediante acupuntura, hidroterapia, fisioterapia, terapia floral, cromoterapia y musicoterapia, siendo según el *Projeto Mucky* extremadamente satisfactoria.

## 2.2 Introducción a los patógenos infecciosos y parasitarios

La importancia del estudio de microorganismos, infecciosos y parasitarios que infectan a primates neotropicales recae en el impacto que tienen sobre sus poblaciones, el entorno y los humanos con quien conviven y mantienen un íntimo contacto (Ninostka y col., 2008; Pinna y col., 2012; Romero y col., 2012; Casagrande y col., 2013; Menezes-Costa y col., 2013).

Durante su estancia en el *Projeto Mucky*, el alumno, entre otras tareas, realizó la obtención de muestras para el estudio de patógenos infecciosos y parasitarios, divididos en el presente trabajo en tres grupos: bacterias (*Leptospira* spp), virus (Rotavirus) y protozoos (*Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*).

## 2.3. Importancia de la Medicina Preventiva: Bioseguridad

Actualmente, los primates neotropicales se encuentran en una situación paradójica donde gran parte de las especies están en riesgo de extinción (Innes, 1997; Encarnación y col., 2000; Aquino y col., 2000, 2007; Romero y col., 2012). Por el contrario otras especies son consideradas plagas en territorios donde presentan un íntimo contacto con los humanos. Debido a esa situación es necesario estudiar los microorganismos zoonóticos y diseñar planes de prevención (Ninostka y col., 2008). Se considera la medicina preventiva como la ciencia encargada de la prevención y curación de las enfermedades, mientras que la bioseguridad se refiere al conjunto de conocimientos, equipos, medidas de manejo, ubicación y diseño de los establecimientos que permiten proteger las instalaciones donde se encuentran los animales de la entrada de microorganismos patógenos, o minimizar su difusión en caso de que acaben entrando, todo ello respetando el medio ambiente, bienestar animal y salud pública (Varela, 2011).

La bioseguridad en un centro de rescate de primates es esencial debido a la elevada concentración de animales susceptibles, la inmunodepresión por infección o estrés, el íntimo contacto con el medio natural y la presencia de portadores y vectores en la zona (Varela, 2011; Romero y col., 2012).

Además, el centro de rescate de primates debe tener en cuenta la salud de los humanos que contactan con los primates, siendo, las principales causas de enfermedad los traumatismos, las reacciones alérgicas e irritativas y las zoonosis (Varela, 2011).

Para ello, debe procederse al marcaje de especímenes, realizar registros médicos, prevención de traumas físicos, reducción de los factores generadores de estrés, enriquecimiento ambiental y correcta alimentación, nutrición y vacunación de los animales. Además, debe tener unas mínimas **instalaciones** en correcto estado, como sala de ingresos, zona de cuarentena, áreas de diagnóstico y áreas de servicios, todo ello, en relación con el tipo y cantidad de primates. También, se debe considerar la **higiene** del centro mediante el uso de pediluvios y tapetes sanitarios, control de plagas y disposición de desechos (Epiphanio y col., 2003; Varela, 2011; Romero y col., 2012).

### **3. Justificación y objetivos**

El presente TFG fue desarrollado durante la estancia del alumno en el centro de rescate de primates *Projeto Mucky*, situado en Itú, Estado de São Paulo (Brasil), durante el primer semestre del quinto curso del Grado en Veterinaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. La estancia fue realizada mediante convenio con UNIVERSA y gracias a la concesión de una beca dentro del *Programa de Movilidad Americampus*, financiado por el Banco Santander. Durante el periodo de formación, el alumno también participó en diversos procedimientos laboratoriales en varios laboratorios y departamentos de la Universidad de São Paulo.

La idea para la realización de ese TFG nace de la pasión del alumno por los animales silvestres, la primatología y la veterinaria. Todo ello, combinado con la posibilidad de realizar el periodo de prácticas en el centro de rescate de primates durante su estancia en el *Programa de Movilidad Americampus*. El siguiente TFG pretende profundizar en el conocimiento de la patología asociada a algunas enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan a los primates neotropicales y en aspectos básicos relacionados con el cuidado básico de estos animales.

Los objetivos concretos son:

#### **3.1. Objetivo 1: Estudio de microorganismos infecciosos y parasitarios**

Revisión bibliográfica de la etiología, epidemiología, patogenia, clínica y control de *Leptospira* spp, Rotavirus, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* en primates neotropicales. Estudio de la prevalencia de estos microorganismos en el centro de rescate de primates *Projeto Mucky* en Itú, São Paulo, Brasil, con la colaboración de los laboratorios del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal (VPS) de la Universidad de São Paulo (USP).



### **3.2. Objetivo 2: Prácticas en un centro de rescate de primates**

Realizar prácticas relativas al manejo y cuidado de primates y colaborar en la resolución de casos clínicos dirigidos por veterinarios especialistas en el centro de rescate de primates *Projeto Mucky* en Brasil.

## **4. Estudio infeccioso y parasitario**

### **4.1. Estudio de la prevalencia de *Leptospira* spp**

#### **4.1.1. Introducción**

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana zoonótica reemergente de importancia y distribución global. Presenta un comportamiento endémico con brotes epidémicos en ciertas áreas y continentes (Ellis, 1998; Pinna y col., 2012; Romero y col., 2012). El agente causal son bacterias gram negativas (-) del género *Leptospira* spp, habiendo 21 especies, 23 serogrupos y 212 serovares con poder patógeno (Ellis, 1998; Romero-Vivas, 2016). El carácter reemergente de la enfermedad implica una gran diversidad de especies reservorio de vida silvestre, constituyendo una amenaza potencial para la biodiversidad global (Romero y col., 2012).

Las bacterias persisten en los riñones y el tracto genital de los portadores produciendo excreción por orina y fluidos genitales. Las condiciones ideales para su crecimiento corresponden a temperaturas de 28-30 °C hasta 37 °C, pH entre 7.2-7.6 y ambientes aeróbicos o microaerófilos. Aun así *Leptospira* puede sobrevivir en el agua durante largos periodos de tiempo siendo resistentes a las bajas temperaturas y pH alcalinos, pero sensibles a la desecación, pH ácidos y a productos como detergentes (Ellis, 1998).

La virulencia de *Leptospira* spp es consecuencia de su capacidad de infección intercelular y la producción de citotoxinas, altamente inmunógenas, induciendo una acción autoinmune sobre ciertos órganos (Ellis, 1998; Romero-Vivas y col., 2016).

La importancia de *Leptospira* spp recae en la epidemiología y patogenia sobre hospedadores accidentales y la amplia distribución en hospedadores definitivos y de manteamiento, ambos asintomáticos a la infección. Los primates neotropicales actúan como hospedadores de mantenimiento con prevalencias del 50%, y los humanos como hospedadores definitivos con incidencia de fallo renal en el 87% de los casos y letalidad del 10% (Romero y col., 2012; Almeida y col., 2016; Romero-Vivas y col., 2016).

La infección se produce por contacto de las bacterias, normalmente en el alimento contaminado, con membranas mucosas. Inicialmente, se produce una bacteriemia con posible presentación de síntomas inespecíficos como pirexia y excreción bacteriana por orina. A los 10 días post-infección se activa la respuesta inmune y las bacterias pasan a localizarse en túbulos renales proximales, tracto genital de adultos enteros y posible persistencia en el SNC (Ellis, 1998).

Los primates no humanos de vida libre, generalmente, se presentan asintomáticos con posible estado febril y conjuntivitis con una respuesta humoral corta. Aun así en condiciones de cautiverio, desnutrición y estrés crónico puede presentarse una clínica más severa, donde la enfermedad puede llegar a provocar hemorragias pulmonares, necrosis hepática y nefritis tubular (Romero y col., 2012).

El diagnóstico se realiza por técnicas serológicas como el test de aglutinación microscópica (MAT). También es posible realizar diagnóstico molecular por PCR o por cultivo celular (Ellis, 1998; Dos Santos y col., 2017; Madeiros y col., 2017)

#### **4.1.2. Materiales y métodos**

En el presente estudio fueron evaluados 16 primates no humanos del centro de rescate *Projeto Mucky* en Itú, Estado de São Paulo, Brasil. Los animales formaban parte de las siguientes especies *Saguí Tufo Preto* (*Callithrix penicillata*), *Saguí Tufo Branco* (*Callithrix jacchus*) y mestizos de ambas especies.

Se estudió la presencia de *Leptospira* spp mediante cultivo de orina cuyo protocolo de extracción y cultivo, había sido aprobado por la Comisión de Ética de la Universidad de São Paulo y por *Projeto Mucky*.

##### **4.1.2.1. Toma de muestras**

Se obtuvieron muestras de la orina, individuales y colectivas, de un total de 16 monos, de los cuales 5 eran paralíticos y 11 sin ninguna deficiencia física. Los métodos usados para la extracción de orina fueron ideados por el alumno, aprovechando el material y los recursos disponibles en el *Projeto Mucky*. Aunque el centro no presentaba los recursos suficientes para garantizar la esterilidad de las muestras de orina, el alumno intentó realizar la técnica de obtención de orina lo más estéril posible dadas las circunstancias.

En individuos paralíticos, el alumno adaptó la técnica de masaje abdominal para la extracción de orina realizada por el *Projeto Mucky*, de esa manera no se inducía más estrés del producido por la misma rutina. El alumno, realizó una serie de modificaciones para mejorar la calidad microbiológica de las muestras.

Inicialmente, antes de cada colecta se preparaba el material estéril consistente en un recipiente de cerámica lavado con agua a 80 °C durante 1 minuto y posterior esterilizado mediante *Herbalvet*® producto bactericida, fungicida y viricida. Se utilizaron guantes de látex bañados en alcohol al 70% y 2 jeringas estériles. Posteriormente, se realizaba un lavado de la zona genital y perigenital con agua y jabón con clorhexidina, aclarado y lavado con alcohol al 70%. Una vez esterilizada la zona, con ayuda de algún trabajador experimentado del *Projeto Mucky* se posicionaba el animal, se dejaba la zona genital libre de pelos y se realizaba el masaje abdominal, hasta que el animal orinaba con recolección de la orina en el recipiente de cerámica. Durante la recolección de orina se evitaba en todo momento poner el recipiente debajo del animal para evitar posibles contaminaciones.

En individuos no paralíticos el alumno obtuvo, mediante el diseño de un protocolo propio, 5 muestras colectivas (de 2 a 3 animales) de un total de 11 animales. Se usó una jaula de colecta (20 x 20 x 30 cm), filtro de poliéster, bandeja de colecta, recipiente de plástico estéril y jeringa estéril. El material usado fue debidamente esterilizado con un protocolo de limpieza a base de agua caliente y detergente, con posterior esterilización a base de baño en agua hirviendo (100 °C) durante 10 minutos, posterior baño con *Herbalvet*® durante 10 minutos, aclarado y secado natural en recinto limpio sin corrientes de aire.

El procedimiento de extracción se iniciaba la noche anterior a la colecta con un ayuno mínimo de 8 horas. Posteriormente, de noche, a las 22:00 horas, aproximadamente, se trasladaba a los *saguís* a la sala de colecta dentro del habitáculo donde permanecían durante la noche. El habitáculo se anexaba a una jaula de mantenimiento (20 x 40 x 30 cm), allí permanecían toda la noche. Por la mañana siguiente, el alumno entre 60 y 90 minutos antes del inicio de la recolección (6:00 horas), preparaba la sala de colecta y esterilizaba todo el material a usar. Una vez preparado, anexaba el habitáculo (estando los *saguís* dentro y preferiblemente durmiendo) a la jaula de colecta. Al amanecer, sobre las 6:00 horas, los monos salían del habitáculo a la jaula de colecta, en ese momento el estudiante cerraba la compuerta de conexión entre habitáculo y jaula, desanexando el habitáculo. La combinación del estrés de manejo, el ayuno y la retención nocturna de orina hacía que los *saguís* orinasen, pasando la orina por el filtro de poliéster y depositándose sobre la bandeja de colecta, la cual estaba

ligeramente inclinada en un ángulo de 30° para permitir el depósito de la misma en la parte más baja de dicha bandeja. El filtro de poliéster permitía retener las heces evitando la contaminación de la orina. Una vez depositada la orina, el estudiante colectaba la misma con una jeringa estéril y la depositaba en el recipiente de plástico estéril con tapa en rosca y la llevaba al laboratorio para realizar el cultivo.

El cultivo se encontraba duplicado en tubos de ensayo con medio semi-líquido compuesto por medio EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris). Uno de los duplicados estaba enriquecido, además, con suero de conejo al 10% y el otro con enriquecimiento comercial a base de BSA, Polissorbato 80 y factores del crecimiento para leptospira (Leptospira Enrichment EMJH, DIFCO). Ambos duplicados estaban desprovistos de antibióticos.

En el laboratorio del *Projeto Mucky* se preparó un espacio específico para la realización de los cultivos. Se caracterizaba por estar parcialmente aislado del resto del laboratorio, sin corrientes de aire y sin personal ni animales cerca. Allí se colocó un campo estéril formado por una gradilla con 5 velas en forma de semicírculo estando en el medio el tubo de ensayo con el medio de cultivo. Cerca del campo estéril se encontraba el filtro de membrana específico para *Leptospira* spp con poros de 0.22 µm, jeringa estéril, filtro de café, recipiente de plástico estéril y recipiente con la orina colectada.

Durante el proceso todo el material estéril fue flameado antes y después del contacto con la orina, evitando el contacto de la misma con el fuego. Todos los procedimientos con material estéril y con el medio de cultivo fueron realizados dentro del campo estéril.

El proceso se iniciaba con un primer filtrado de 3 a 5 ml de orina con el filtro de café, depositándose la orina filtrada en el recipiente de plástico estéril. Posteriormente, mediante la jeringa estéril y flameada se colectaba la orina filtrada. Se flameaba la jeringa con la orina y se acoplaba al filtro de membrana y se flameaba la punta del filtro. En ese mismo momento, se abría y flameaba el tubo de ensayo con cultivo y se depositaban de 2 a 5 gotas de orina filtrada. *A posteriori*, se flameaba el tubo de ensayo, se cerraba y se guardaba envuelto en papel de aluminio dentro de la caja isopor protegiendo las muestras de la luz solar.

Los cultivos fueron conservados, inicialmente, en el *Projeto Mucky* a temperatura ambiente (entre 25 y 30 °C) dentro de la caja isopor y envueltos por papel de aluminio para evitar la desactivación bacteriana por irradiación solar. Posteriormente, en el laboratorio de la *Universidade de São Paulo* fueron incubadas en estufa bacteriológica a 28°C.

#### 4.1.2.2. Detección de *Leptospira* spp

Las muestras de orina fueron analizadas en el *Laboratorio de Zoonoses Bacterianas* del departamento de *Medicina Veterinária preventiva e saúde animal* (VPS) de la *Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia* (FMVZ) del *Campus de São Paulo* de la *Universidade de São Paulo*, a cargo del Dr. Marcos Bryan Heinemann.

En el laboratorio las muestras inoculadas fueron incubadas en estufa bacteriológica a 28°C durante un periodo mínimo de 12 semanas siendo consideradas negativas, sólo, a partir de la 16ª semana de incubación. Los cultivos fueron examinados semanalmente analizando la turbidez del medio y la presencia de formas bacterianas compatibles con leptospiros mediante la observación microscópica de campo oscuro. Al final de las 12 semanas el medio fue diluido al 10% (p/v) mediante TE (10 mM de Tris HCL, 1 mM de EDTA, pH 8.0). Seguidamente, 200 µl del homogenizado fue transferido a un microtubo y almacenado a -20°C hasta el momento de la extracción del DNA.

La extracción y purificación del DNA de las muestras fue realizada mediante el uso de 450 µl de isotiocionato de guanidina que fue adicionado a los 200 µl de las muestras. El conjunto fue homogenizado vigorosamente con agitador de tubos tipo vórtex e incubados a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, se acondicionaron 100 µl de cloroformo y el conjunto fue centrifugado a 12000g durante 5 minutos a 4 °C. Seguidamente, 200 µl de sobrenadante fueron transferidos a un nuevo microtubo con 200 µl de propanol y el conjunto fue homogenizado por inversión e incubado durante un mínimo de 2 horas a -20 °C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12000g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado, el sedimento fue lavado con 900 µl de etanol al 70%, y el conjunto fue centrifugado a 12.000 G durante 10 minutos a 4 °C descartándose el sobrenadante. El sedimento fue secado en placa caliente sin agitación a 56 °C durante 10 minutos. El material extraído fue almacenado a -20 °C hasta el momento de uso.

La amplificación del DNA para *Leptospira* spp. fue realizada mediante el uso de Go Taq™ Green Master Mix (Promega Brasil), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pares de *primers* utilizados se describen en Mérien y col. (1992), Lep1 (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') que amplificaron la región de 330pb del gen 16S rDNA. Las muestras fueron sometidas a una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 94 °C de 30 segundos, 60 °C de 30 segundos, 72 °C de 30 segundos y extensión final a 72 °C durante 5 minutos, todo ello, mediante un termociclador. Como control positivo fue

utilizada *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno y como control negativo agua ultrapura.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v), con tampón de corrida TBE 0.5X. El gel fue coloreado con SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) y posteriormente fotografiado bajo luz ultravioleta con ayuda de un transiluminador.

#### **4.1.3. Resultados y discusión**

Se analizaron las 10 muestras, individuales y colectivas, de primates no humanos pertenecientes a 16 individuos, de los cuales 4 se correspondían con *Saguís de Tufo Branco* (*Callithrix jacchus*), 4 con *Saguís de Tufo Preto* (*Callithrix penicillata*) y 8 mestizos de ambas especies (*Callithrix* spp). Después de 16 semanas de cultivo de las muestras de orina en estufa a 28°C hubo un crecimiento nulo en los 10 tubos de ensayo.

La nula presencia de bacterias en cultivo bacteriano puede explicarse por la no circulación de la bacteria en la población estudiada debido a las excelentes prácticas higiénicas del centro y/o a la muerte de los animales infectados pues el género *Callithrix* spp es más sensible, respecto de otros géneros, y en combinación con la situación de cautiverio y estrés crónico pueden llegar a presentar cuadros agudos y letales (Romero y col., 2012; Molina y col., 2014). También, el resultado negativo puede ser consecuencia a la baja sensibilidad de la prueba utilizada (Hartskeerl y col., 2011). En comparación con otros estudios de prevalencia de *Leptospira* spp (Silva-Zacarias y col. 2007, Pinna y col. 2012, Romero y col. 2012, Molina y col. 2014, Almeida y col. 2016, Medeiros y col. 2017), todos ellos utilizan técnicas serológicas (MAT) para su determinación siendo la técnica de referencia.

## **4.2. Estudio de la prevalencia de Rotavirus**

### **4.2.1. Introducción**

Actualmente, los agentes etiológicos más frecuentes causantes de gastroenteritis aguda no bacteriana en humanos son Rotavirus y Norovirus (Jiang y col., 2003; Menoncin, 2011; Babkin y col., 2013). Estudios demuestran que las cepas de Rotavirus humanos provienen de primates del Viejo Mundo (Jiang y col., 2003), existiendo varias vacunas en humanos obtenidas a base de virus de primates no humanos (Martella y col. 2010; Babkin y col., 2013).

Su importancia de estudio se basa en los datos epidemiológicos donde Rotavirus infecta, aproximadamente, a todos los niños menores de 5 años con 2 millones de hospitalizaciones en EUA (Jiang y col., 2003) y provoca de 0.8 a 1 millón de muertes anuales a nivel mundial (Chege y col., 2005; Martella y col., 2009), con una letalidad de 1/293 (3.41‰), y una mayor casuística en países desarrollados (Martella y col., 2009).

Los Rotavirus son virus de la familia *Reoviridae* compuestos por una cápside icosaédrica sin envoltura externa. Su genoma consiste en 11 segmentos de RNA bicatenario (Cook y col., 2004; Martella y col., 2010; Menoncin, 2011). Existe gran variabilidad genética entre los distintos Rotavirus en función de la especie hospedadora sugiriendo la existencia de una restricción de hospedadores (Cook y col., 2004). Aun así, existe la posibilidad de mutación, reordenamiento y recombinación de varios virus en un mismo hospedador formándose Rotavirus atípicos con capacidad zoonótica, por lo que debe considerarse cualquier mamífero como reservorio potencial (Cook y col., 2004; Martella y col., 2010; Menoncin, 2011).

Actualmente, se conocen hasta 7 serogrupos de Rotavirus del A al G. Los rotavirus del serogrupo A (GARV) son los principales causantes de diarrea aguda en primates jóvenes. Los demás serogrupos suelen ser detectados en animales sanos. Los primates no humanos pueden estar infectados por Rotavirus del serogrupo A, B y C (Martella y col., 2010; Menoncin, 2011).

El virus se transmite, principalmente, por vía feco-oral (Martella y col., 2010; Menoncin, 2011), aunque también existe la vía aerógena (Menoncin, 2011). Presenta gran estabilidad medioambiental produciendo infecciones por consumo de agua o alimentos contaminados (Cook y col., 2004; Martella y col., 2010; Menoncin, 2011). Su estabilidad se debe a la resistencia físico-química a condiciones exteriores, ciertos compuestos químicos y pH de 3 a 9. Son sensibles a etanol del 95% siendo el mejor desinfectante (Menoncin, 2011). Presenta su máxima actividad en climas tropicales y templados en primavera e invierno (Martella y col., 2010). La eliminación fecal del virus en individuos jóvenes es significativamente mayor respecto a individuos adultos (Wang y col., 2007).

Su replicación se considera un proceso complejo y parcialmente incomprendido. La transcripción es asimétrica y en caso de infección múltiple existe la posibilidad de recombinación génica, aportando una mayor variabilidad genética (Menoncin, 2011).

La patogenia es distinta en función de la edad y especie animal, en el caso de los primates de Nuevo Mundo presentan una menor respuesta inmune a la infección por Rotavirus respecto a los primates del Viejo Mundo (Jiang y col., 2003; Menoncin, 2011). El virus siempre afecta al

paquete gastrointestinal, principalmente, intestino delgado. Aun así las lesiones no están correlacionadas con la gravedad diarreica.

Los individuos presentan un síndrome de mala-absorción secundaria provocada por la destrucción celular, isquemia, activación del sistema nervioso entérico o acción paracrina de toxinas virales. La gravedad de los síntomas están relacionados con la edad. En individuos jóvenes se presenta un cuadro de malestar general con cólicos abdominales, vómitos y diarrea grave; en cambio, en individuos adultos el cuadro es de leve a asintomático (Martella y col. 2010; Menoncin, 2011).

Su diagnóstico laboratorial consiste en uso de técnicas serológicas como aglutinación en látex o la electroinmunoestimulación (EIE) o técnicas moleculares como la RT-PCR (Retro Transcriptasa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa) o hibridación. Las técnicas más sensibles y específicas son la EIE y la hibridación. También es posible la identificación directa por microscopia electrónica (Menoncin, 2011).

#### **4.2.2. Materiales y métodos**

El presente estudio, aprobado por la Comisión de Ética de la Universidad de São Paulo y por *Projeto Mucky*, evaluó la presencia de Rotavirus mediante técnicas moleculares en 57 muestras de heces frescas, individuales y colectivas de un total de 121 primates no humanos del centro de rescate *Projeto Mucky* en Itú, Estado de São Paulo, Brasil. De las muestras analizadas, 48 pertenecía a *saguís* (*Callithrix penicillata*, *Callithrix jacchus* y mestizos de ambas especies) y 9 a *bugios* (*Alouatta caraya* y *Alouatta guariba*) con un total de 103 y 18 individuos analizados, respectivamente. Además de los 57 viveros analizados 51 eran animales sanos, 5 animales paralíticos y 1 con diarrea.

##### **4.2.2.1. Obtención de las muestras**

Las muestras de heces frescas se colocaban en recipientes cerrados, de boca ancha y con cierre en rosca. La técnica realizada para la obtención de las heces no precisaba de esterilidad.

La mayor parte de las muestras fueron obtenidas mediante colecta directa en los viveros. El procedimiento precisaba del aislamiento de todos los individuos para mantener la seguridad del estudiante durante la colecta de heces dentro del vivero. Otra parte de las muestras fueron obtenidas durante el procedimiento de colecta de orina. Para ello, el alumno diseñó un sistema para aislar las heces de la orina que consistía en un filtro de polietileno el cual retenía



las heces y dejaba pasar la orina. Y de forma minoritaria, el estudiante aprovechó el manejo de individuos paralíticos para la obtención de muestras de heces.

Las heces fueron depositadas en recipientes cilíndricos, limpios, de boca ancha, cierre con rosca y debidamente identificados. Éstos fueron almacenados en condiciones de congelación hasta su análisis en las instalaciones del *Laboratorio de Zoonoses Bacterianas* de la *Faculdade de Veterinária da Universidade de São Paulo*.

#### **4.2.2.2. Detección de Rotavirus**

Las muestras de heces fueron analizadas en el *Laboratorio de Zoonoses Bacterianas* del departamento de *Medicina Veterinária preventiva e saúde animal (VPS)* de la *Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ)* del *Campus de São Paulo da Universidade de São Paulo*, a cargo del Dr. Marcos Bryan Heinemann.

La extracción del ácido nucleico total de las muestras de heces fue realizada mediante el uso del reactivo Trizol (Invitrogen®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los pares de *primers* utilizados se describen en Salem y col. (2010).

Para la síntesis de cDNA fue utilizada la enzima MMLV (Invitrogen®) Reverse Transcriptase, con la adición de 14 µl de RNA, previamente calentados a 95 °C durante 5 minutos e inmersos en baño de gel, más 400 UI de MMLV, 1xFirst Strand Buffer (Invitrogen®), 1mM dNTP, 10 mM DTT, 1 *primer* (P1 5'GGCTTTTAAAGCGCTACAGTGATGTCTCT3' y P2 5'GGTCGTGATTGTGTTGATGAATCCATAGA3') para un volumen final de 40 µl. El ciclo fue de 42 °C durante 60 minutos.

Para la PCR fueron utilizados los *primers* P3 (5'CTCAGCATTGACGTAACGAGTCTCC3') y P4 (5'TGAGTGGATCGTTTGAAGCAGAATCAGA3'), los cuales generaron un amplificado de 208pb. La reacción fue realizada con 2.5 µl cDNA, 1x PCR Buffer (Invitrogen®), 0.2 mM dNTP, 0.25 µM de *primers* P3 y P4, 1.5 µM de MgCl<sub>2</sub> y 0.5 U de Platinum Taq GNA Polymerase (Invitrogen®), para un volumen final de 25 µl.

El ciclo fue compuesto por los siguientes pasos; se inició a 94 °C durante 4 minutos seguido de 35 ciclos compuestos por 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 45 segundos y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v), con tampón de corrida TBE 0.5X. El gel fue coloreado con SYBR Safe DNA gel stain

(Invitrogen®) y posteriormente fotografiado bajo luz ultravioleta con ayuda de un transiluminador.

#### **4.2.3. Resultados y discusión**

La amplificación por PCR de los marcadores de cDNA de Rotavirus resultó negativa en las 57 muestras colectivas, de 121 primates no humanos investigadas en este trabajo, hallazgo que confirma la ausencia de circulación de este virus en el centro de rescate objeto de estudio.

El resultado podría ser consecuencia de las excelentes medidas higiénico-sanitarias del centro. También podría existir una influencia del tamaño de muestreo en comparación con otros autores (Wang y col., 2007). Si se compara el presente trabajo, en el cual se estudió una población total de 121 individuos, de los que sólo 1 presentaba diarrea, con el realizado por Wang y col. (2007) que estudiaron la rotavirus en 92 individuos, todos ellos con diarrea, de los cuales 12 (13%) resultaron positivos, puede observarse una gran diferencia en la cantidad de individuos susceptibles muestreados entre ambas investigaciones, pudiendo ser la baja frecuencia de los mismos la causa del resultado del presente estudio. Para realizar la comparación entre ambos estudios se debería suponer que no hay diferente comportamiento vírico entre las especies de ambos trabajos pues Wang y col. (2007) realizaron su estudio en las especies *Macaca nemestrina* y *Macaca mulatta*, ambas pertenecientes a primates del Viejo Mundo.

### **4.3. Estudio de la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii***

#### **4.3.1. Introducción**

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria zoonótica y sistémica producida por *Toxoplasma gondii*. Está considerada una patología mortal en diversas especies de vertebrados, entre las que se incluyen los primates neotropicales (Miró y col., 2001; Epiphanyo y col., 2003; Cedillo-Peláez, 2011; Casagrande y col., 2013).

*Toxoplasma gondii* es un protozoo cosmopolita que precisa de felinos para su supervivencia. Los felinos domésticos y salvajes, actúan como hospedadores definitivos (HD) y cualquier animal de sangre caliente, incluyendo los felinos, como hospedadores intermediarios (HI). El éxito biológico de ese parásito obedece entre otros factores la diversidad de vías por las que puede transmitirse, bien mediante la ingestión de ooquistes esporulados, quistes con

bradizoitos o pseudoquistes con taquizoítos, siendo estos últimos muy sensibles a las condiciones del sistema digestivo, o bien también por vía transplacentaria (Miró y col., 2001).

El ciclo biológico comprende una fase enteroepitelial en el HD y una fase extraintestinal en el HI. La primera incluye la gametogonia, con producción de ooquistes no esporulados que salen con las heces de los felinos y esporulan en el medio, mientras que la fase extraintestinal incluye la reproducción asexual, con producción de pseudoquistes y quistes en diversos órganos y tejidos, especialmente, musculatura y encéfalo (Casagrande y col., 2013). Los quistes tienen importancia fisiopatológica por su localización, inmunológica al mantener la respuesta inmune constante y epidemiológica por su resistencia en el sistema digestivo y tratamiento térmico (Miró y col., 2001; Casagrande y col., 2013).

Las formas infectantes más importantes, por su resistencia, son los ooquistes y los quistes. Los felinos se infectan tanto por la ingestión de alimentos contaminados por ooquistes esporulados, como por la ingestión de carne u órganos contaminados con quistes. Los herbívoros, incluyendo los primates neotropicales, se infectan por la ingestión de alimentos contaminados por ooquistes esporulados. También se debe considerar la posibilidad de infección transplacentaria (Miró y col., 2001; McLeod y col., 2009; Casagrande y col., 2013).

La enfermedad puede presentar un cuadro clínico muy variado, pues teóricamente, el protozoo puede localizarse en cualquier tejido y órgano, siendo de preferencia la musculatura y el encéfalo como se ha indicado anteriormente (Miró y col., 2001). En primates puede tener carácter asintomático o cursar con síntomas inespecíficos como fiebre, malestar y nerviosismo. También es posible la presencia de distensión abdominal, disnea e hipotermia (Casagrande y col., 2013).

La gravedad del cuadro clínico depende de la respuesta inmune e intensidad de la infección. El cuadro más habitual en individuos inmunodeprimidos y/o con infestaciones intensas es un proceso sobreagudo con muerte sin sintomatología (Miró y col., 2001; Epiphanyo y col., 2003; Carne y col., 2009; Casagrande y col., 2013). En caso de sobrevivir, se produce una fase aguda por multiplicación de taquizoítos en diversos tejidos (pulmón hígado, bazo, linfonodos, intestino y cerebro) donde ocasionan focos de necrosis (Casagrande y col., 2013). El cuadro adquiere un carácter subagudo al desarrollarse la respuesta inmune, lo que provoca la formación de quistes con bradizoitos, que se concentran en encéfalo y tejido muscular esquelético y cardíaco durante la fase crónica de la enfermedad (Miró y col., 2001).

Existe diferente receptividad a la toxoplasmosis entre las distintas especies animales. Innes (1997) describe una hipótesis que determina la receptividad en función del tiempo que una determinada especie animal no ha mantenido contacto con el HD. Así se observa que los primates del Nuevo Mundo, que no han tenido contacto con el hospedador definitivo durante generaciones, son más susceptibles a enfermar y morir como consecuencia de la infección respecto a los primates del Viejo Mundo, los cuales han tenido contacto permanente con el HD y han desarrollado resistencia frente al parásito, al igual que sucede con el ser humano (Cunningham y col., 1992; Innes, 1997).

En el caso de los primates neotropicales, la gravedad de la toxoplasmosis es todavía mayor en individuos mantenidos en cautividad, como consecuencia del hacinamiento que favorece la transmisión de microorganismos y el padecimiento de un estado de inmunodepresión por estrés. En conclusión, los animales en cautividad son más propensos a sufrir cuadros de carácter sobreagudo con baja supervivencia (Epiphonio y col., 2003; Carme y col., 2009; Cedillo-Peláeza, 2011; Alvarado-Esquivel y col., 2013; Casagrande y col., 2013).

Los estudios anatomopatológicos describen como principales lesiones macroscópicas la presencia de edema y congestión pulmonar, esplenomegalia y linfadenitis mesentérica pudiendo llegar a tener un componente hemorrágico (Epiphonio y col., 2003; Casagrande y col., 2013). También se describe hemorragia intestinal y de la vejiga urinaria, así como esplenomegalia y hepatomegalia (Casagrande y col., 2013). Los principales hallazgos histopatológicos son hepatitis necrótica intersticial, linfadenitis, neumonía intersticial y esplenitis necrótica (Epiphonio y col., 2003). También se ha descrito miocarditis, enteritis y sialitis necróticas con localización de taquizoítos de *T. gondii* en hígado, pulmones, bazo, corazón, linfonodos y glándula salivar (Casagrande y col., 2013).

#### **4.3.2. Material y métodos**

En este apartado del estudio se determinó la seroprevalencia de *T. gondii* en un total de 11 primates no humanos del centro de rescate *Projeto Mucky* en Itú, Estado de São Paulo, Brasil. Como se ha indicado anteriormente, este centro dispone de supervisión veterinaria, encontrándose todos los animales estudiados clínicamente sanos en el momento de tomar las muestras.

Entre ellos se encontraban 9 individuos la especie *Alouatta caraya*, y dos ejemplares híbridos de las especies *Callithrix penicillata* y *Callithrix jacchus*. Además se investigó la presencia de

anticuerpos frente a *T. gondii* en un gato salvaje que se alojaba dentro de las instalaciones del *Projeto Mucky*, al considerarlo potencial diseminador del patógeno.

El protocolo de extracción, conservación y análisis fue aprobado por la Comisión Ética de la Universidad de São Paulo y la Dirección del *Projeto Mucky*.

#### **4.3.2.1. Toma de muestras**

La toma de muestras de sangre en los animales seleccionados para este apartado del estudio fue realizada previa anestesia con una dosis intramuscular de clorhidrato de ketamina (10mg/kg) y midazolam (0.6 mg/kg).

En cada animal se extrajo un volumen de sangre inferior al 1% del peso corporal por punción en vena axilar, cefálica o caudal. A la vez se tomaron datos relativos a la especie, origen, edad y sexo y se realizó un examen físico evaluando el peso, estado corporal e hidratación. Los tubos con las muestras de sangre fueron remitidos en refrigeración al laboratorio de la *Universidade de São Paulo* donde se extrajo el suero mediante centrifugación (3000 rpm durante 1 minuto) y se mantuvo congelado a -20 °C hasta su análisis.

#### **4.3.2.2. Detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii***

Las muestras de suero fueron analizadas en el *Laboratorio de Doenças Parasitarias* del departamento de *Medicina Veterinária preventiva e saúde animal (VPS)* de la *Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ)* del *Campus de São Paulo* de la *Universidade de São Paulo*, a cargo de la Dra. Solange Maria Gennari.

El análisis laboratorial se realizó mediante el test modificado de aglutinación (MAT) a diluciones 1:25; 1:50; 1:500; 1:5000 en solución salina tamponada (PBS pH 7.2). La metodología usada para el análisis de los anticuerpos anti-*T. gondii* se encuentra descrita en el trabajo de Vitaliano (2012).

Brevemente, la dilución de los sueros fue realizada en micro-placa de 96 pocillos, usando solución salina tamponada a pH 7.2, filtrada en membrada de policarbonato con 0.45 µm de porosidad. Posteriormente, fueron diluidos 120µl de antígeno (taquizoítos enteros fijados con formalina) en 2.5ml de solución alcalina tamponada, pH 8,95, 35µl de mercaptoetanol 0.2M y 50µl de Azul de Evans 0.2%. El conjunto fue homogenizado y distribuido inmediatamente en una microplaca con fondo en U, con 25µl de reactivo por pocillo. Los sueros diluidos fueron

transferidos a esa microplaca y mezclados con los reactivos (v/v). La placa fue sellada con plástico adhesivo para evitar la evaporación e incubada durante la noche en estufa a 37 °C.

La formación de un botón de contorno definido en la base del pocillo fue considerada como resultado negativo, y la ausencia o presencia de un botón sin contorno definido fue anotado como positivo. Se consideraron positivos los animales con títulos iguales o superiores a 25. En todas las reacciones se utilizaron controles positivos y negativos.

#### **4.3.3. Resultados y discusión**

Se analizaron las 11 muestras de primates no humanos, de las cuales 9 muestras fueron obtenidas de *Bugio Preto (Alouatta caraya)*, 2 de ejemplares híbridos de *Saguí de Tufo Branco (Callithrix jacchus)* y *Saguí de Tufo Preto (Callithrix penicillata)* y 1 de gato doméstico (*Felis silvestris catus*) sin raza determinada, de las cuales sólo esta última resultó positiva.

Los estudios sobre la seroprevalencia de *T. gondii* en primates del Nuevo Mundo, incluyendo especies de los géneros *Alouatta* y *Callithrix* como los analizados en el presente trabajo, han proporcionado resultados variables. Algunos autores identifican anticuerpos en un porcentaje de monos que oscila entre el 8% y 66%, como en los trabajos realizados por Garcia y col. (2005) en Paraná, Brasil [13/60=21.7%], Sanchis y col. (1972) en São Paulo, Brasil [8/17=47.1%], Leite y col. (2008) en Mato Grosso do Sul, Brasil [4/13=30.8%], Alvarado-Esquivel y col., (2013) en México City, México [4/6 =66.7%], Pimentel y col., (2009) en Sergipe, Brasil [6/18 =33.3%], Pires y col, (2012) en Rio de Janeiro, Brasil [17/43=39.5%], Da Silva y col., (2013) en São Paulo, Brasil [3/36=8.33%] y Molina y col. (2014) en São Paulo , Brasil [23/68 =33.8%]. Sin embargo, también hay estudios donde todos los animales resultaron seronegativos, como los realizados por Cadavid y col., (1991) en Medellín, Colombia.

Los primates neotropicales, y especialmente los géneros *Alouatta* spp. y *Callithrix* spp, entre otros, son muy sensibles a la toxoplasmosis. Normalmente, en esos animales se desarrolla un cuadro sobreagudo y letal en el 100% de los animales entre los días 1 y 11 post-infección (Potkay, 1992; Henrik y col., 1997; Epiphanio y col., 2003; Casagrande y col., 2013). Como se ha señalado anteriormente, todos los animales analizados en este trabajo estaban clínicamente sanos, lo que coincide con los resultados obtenidos.

La ausencia de títulos positivos de anticuerpos en la totalidad de animales podría estar relacionada con las condiciones higiénico-sanitarias en que se encuentran los monos, consideradas como satisfactorias por el equipo veterinario del centro.

Todos los animales del *Projeto Mucky* se encontraban separados físicamente del exterior por una red metálica que delimitaba los viveros. No obstante, el contacto indirecto con heces de felinos era posible, ya que en el centro se encontraban varios gatos que a veces ascendían al techo de los viveros. Cabe destacar la presencia de anticuerpos en el gato estudiado, aunque esta circunstancia únicamente implica que el animal ha tenido contacto previo con el parásito, pero no significa que lo esté eliminando con sus heces. Los gatos se pueden comportar como HD y como HI y en ambos casos se van a producir anticuerpos específicos en sangre. No obstante, la eliminación de ooquistes en heces únicamente se produce en el primer caso y se mantiene durante un periodo de tiempo reducido, que normalmente no supera las dos semanas (Miró y Cordero del Campillo, 1999). En cualquier caso, sería recomendable impedir el acceso de estos felinos a las instalaciones de los monos.

#### **4.4. Estudio de la prevalencia de *Trypanosoma cruzi***

##### **4.4.1. Introducción**

*Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la tripanosomosis americana o enfermedad de Chagas, localizada en áreas tropicales y subtropicales del planeta y de gran importancia por su potencial zoonótico, las consecuencias sobre la población humana y la dificultad para su erradicación en las zonas endémicas (Zicardi y col., 2000; Navarrete y col., 2001). Aunque el ser humano es el hospedador más importante, *T. cruzi* también puede encontrarse en primates neotropicales, junto con otras especies como *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma minasense* y *Trypanosoma devei* (Zicardi y col., 2001).

*T. cruzi* tiene morfología fusiforme, aunque ésta varía a lo largo de su ciclo evolutivo, de tipo heteroxeno. En el hospedador definitivo adopta la forma de tripomastigote, estadio caracterizado por poseer un kinetoplasto posterior al núcleo y larga membrana ondulante, mientras que en el vector invertebrado adquiere la forma de epimastigote, caracterizado por presentar el complejo cinetoplástico cercano al núcleo con una pequeña membrana ondulante (Navarrete y col., 2001). El hospedador definitivo más importante es el ser humano y los vectores invertebrados son insectos triatominos, principalmente *Panstrongylus megistus* (Minuzzi-Souza y col., 2016), *Reduvidae* spp (Navarrete y col., 2001) y *Rhodnius* spp (Marcili y col., 2009a).

La transmisión de la enfermedad de Chagas es de tipo contaminativo, por los hábitos alimenticios de los insectos triatominos, que eliminan las formas infectantes con las heces. Estas formas, denominadas tripomastigotes metacíclicos, penetran en el hospedador

vertebrado por soluciones de continuidad de la piel que suelen producirse por el prurito que ocasiona la picadura y posterior rascado (Navarrete y col., 2001; Minuzzi-Souza y col., 2016). De forma secundaria es posible la transmisión congénita en el momento del parto, a través de transfusiones, alimentos o en el manejo laboratorial (Minuzzi-Souza y col., 2016).

Actualmente existe una expansión de *T. cruzi* en regiones y poblaciones libres de la enfermedad, expansión favorecida por el cambio climático y la deforestación (Bahia y col., 2016). Esos factores producen movimientos demográficos y modificación de los hábitats de los insectos, que inducen un mayor acercamiento entre hospedadores vertebrados e invertebrados e incrementan la incidencia de la enfermedad (Marcili y col., 2009a; Bahia y col., 2016). El proceso de transmisión a humanos se maximiza en situaciones de pobreza o hábitats semi-selvajes donde los insectos hematófagos se localizan en el mismo recinto que los humanos (Navarrete y col., 2001).

La tripanosomosis es una de las parasitosis más frecuentes en primates neotropicales (Ziccardi y col., 2000). La infección por *T. cruzi* se ha descrito en 180 especies de vertebrados, incluyendo tanto humanos como primates no humanos (Navarrete y col., 2001; Bahia y col., 2016; Minuzzi-Souza y col., 2016). Entre estos últimos hay 30 especies de primates neotropicales, pertenecientes a 12 géneros y 4 familias (Minuzzi-Souza y col., 2016). Su expansión se ha visto favorecida por los programas de translocación y reintroducción, apareciendo en zonas anteriormente consideradas libres (Bahia y col., 2016).

La importancia de la enfermedad en primates se basa en su potencial zoonótico y letalidad, además de incrementar la receptividad a otras patologías (Minuzzi-Souza y col., 2016).

La infección por *T. cruzi* en primates neotropicales suele ser subclínica, aunque las consecuencias dependen del estado inmunológico. El cuadro clínico en animales en cautividad puede ser grave con posible miocarditis debido al estrés e inmunodepresión por su situación de cautiverio (Bahia y col., 2016). Por el contrario, la enfermedad presenta un curso crónico en individuos inmunocompetentes, en los que *T. cruzi* se multiplica en corazón y musculatura lisa, principalmente del aparato digestivo. El desarrollo crónico de la enfermedad está asociado a la formación de focos de necrosis miocárdica y digestiva con producción de miocardiopatía chagásica, megacolon o megaesófago (Miró y col., 2001).



#### **4.4.2. Material y métodos**

En este apartado se investigó la infección por *T. cruzi* en un total de 12 primates no humanos del centro de rescate *Projeto Mucky* en Itú, Estado de São Paulo, Brasil, en base a la detección de DNA del parásito en muestras de sangre mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El centro posee la supervisión veterinaria, encontrándose todos los animales estudiados clínicamente sanos en el momento de tomar las muestras. Entre los animales estudiados se encontraban 9 ejemplares de la especie *Alouatta caraya* y tres ejemplares híbridos de las especies *Callithrix penicillata*, *Callithrix jacchus*. El protocolo de extracción, conservación y análisis de muestras fue aprobado por la Comisión Ética de la Universidad de São Paulo y la Dirección del *Projeto Mucky*.

##### **4.4.2.1. Toma de muestras**

La toma de muestras de sangre en los animales seleccionados para este apartado del estudio fue realizada previa anestesia con una dosis vía intramuscular de clorhidrato de ketamina (10mg/kg) y midazolam (0.6 mg/kg). En cada animal se extrajo un volumen de sangre inferior al 1% del peso corporal por punción en vena axilar, cefálica o caudal. Cada muestra fue depositada en un tubo colector con EDTA adecuadamente identificado, mezclándola ligeramente para asegurar el contacto con el anticoagulante. A la vez se tomaron datos relativos a la especie, origen, edad y sexo y se realizó un examen físico evaluando el peso, estado corporal e hidratación. Los tubos de sangre fueron remitidos en refrigeración al laboratorio de la *Universidade de São Paulo*, donde se mantuvieron congelados a -20 °C hasta su análisis.

##### **4.4.2.2. Detección de *Trypanosoma cruzi***

Las muestras de sangre fueron analizadas en el *Laboratorio de Doenças Parasitárias* del departamento de *Medicina Veterinária preventiva e saúde animal (VPS)* de la *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)* del *Campus de São Paulo* de la *Universidade de São Paulo*, a cargo del Dr. Arlei Marcili. El análisis laboratorial se realizó mediante técnicas moleculares con extracción de DNA y posterior PCR de dos marcadores, incluyendo la pequeña subunidad ribosomal del ARN (SSS rRNA) y el citocromo b. Para ello se utilizó el kit de extracción y purificación de DNA Purelink Genomic DNA (Invitrogen) en las muestras de sangre de los primates. Los oligonucleótidos y condiciones de las reacciones utilizadas para amplificar ambos marcadores están descritas por Da Silva y col. (2004 y 2009) y Marcili y col. (2009b).

#### 4.4.3. Resultados y discusión

La amplificación por PCR de los marcadores SSU rDNA y el gen citocromo B de *T. cruzi* resultó negativa en las 12 muestras de primates no humanos investigadas en este estudio, hallazgo que confirma la ausencia de circulación de este protozoo en el centro de rescate. Estudios previos realizados en primates en diversas zonas del Brasil sí han confirmado la presencia de *T. cruzi* en estos hospedadores. Concretamente, Bahía y col. (2016) lo identifican en el 12,5% de los animales en la Amazonia brasilera y Ziccardi y col. (2000) en el 8,7% de los animales en Pará, todos ellos fueron asintomáticos. No obstante, otros estudios en el Estado de São Paulo, donde se ha realizado el presente trabajo, concluyen la menor relevancia de este protozoo en humanos o animales. Concretamente, Slavov y col. (2017) identifican *T. cruzi* en tan solo el 0.1% de las muestras de humanos y Pinto (2000) lo identifican en el 8% de animales silvestres, aunque todos los primates neotropicales investigados por estos últimos autores también resultaron negativos.

#### 5. Prácticas en un centro de rescate de primates

Esas prácticas fueron inscritas en UNIVERSA como prácticas extracurriculares y registradas en el IBAMA. En total se cumplieron alrededor de 280 horas de prácticas durante el mes de febrero del 2017. El alumno fue evaluado por el centro al final de las mismas con una nota final de 9.5 sobre 10 puntos. Para el desarrollo de este objetivo el alumno residió en el centro, colaborando en todas las tareas diarias relativas al manejo, higiene y seguimiento de casos clínicos de los primates del *Projeto Mucky*.

El área ocupada por el centro de rescate del *Projeto Mucky* es de 2 hectáreas donde mantienen a unos 200 primates no humanos dentro de jaulas o viveros. El centro se encuentra distribuido en 3 grandes apartados. La entrada del centro se encuentra en una colina donde se alojan animales sanos en viveros pequeños, ya sea por necesidad del animal o por incapacidad del centro. En la zona intermedia se sitúa la enfermería donde se encuentran animales sanos y enfermos que necesitan una atención especial con un manejo más intensivo. En la zona final y más extensa del centro se encuentran todos aquellos animales sanos en viveros grandes donde van a permanecer, generalmente, toda su vida.

En las zonas laterales a lo largo de todo el centro nos encontramos con las instalaciones complementarias. En la colina se sitúan los alojamientos de los trabajadores y la dirección del *Projeto Mucky*, en la zona intermedia aparecen las áreas de descanso, la enfermería y las

cocinas (de monos y de humanos) y en la zona final está la lavandería, los almacenes de material y las áreas de preparación de enriquecimiento ambiental.

El alumno realizó en el centro una serie de actividades relacionadas con los cuidados generales diarios de los animales como limpieza de viveros, medicina alternativa general, cirugías (esterilización), necropsias, visita un centro GAP (*Great Ape Project*), recolección de hojas para el forrajeo de los animales, preparación de suplementos alimenticios, preparación de comidas, seguimiento de las nuevas entradas, manejo de primates, observación del comportamiento de primates en sus viveros, cuidado del resto de animales del centro (perros y gatos), preparación de medicamentos, preparación y diseño de enriquecimiento ambiental y alimentario.

En el centro coexistían varios tipos de trabajadores en función de sus cualidades y conocimientos. Aparte de la dirección formada por directora, coordinadora y auxiliares de dirección, estaban las cocineras, los cuidadores, los auxiliares y los practicantes. La rutina de trabajo para un día concreto se exponía en la tabla de información el día anterior sobre las 19 horas. Las tareas a realizar para cada grupo de trabajo eran fijas, a excepción de los practicantes, que a lo largo de su periodo de prácticas realizaban tareas en todos los campos.

El alumno no se especializó en ninguna tarea concreta. Principalmente, realizó la preparación y distribución de comidas; el diseño, preparación y colocación de enriquecimiento ambiental y alimentario; y manejo de animales en la enfermería.

Los primates se alimentaban a base de hojas verdes de lechuga, fruta variada (mango, plátanos, manzana, naranja, uvas) y cereales fibrosos (avena y trigo). Además, se añadían otros alimentos en función de su disponibilidad en el centro. Se distribuían 3 comidas a lo largo del día a las 7, 12 y 18 horas. Además de un suplemento alimenticio a aquellos animales más débiles o con problemas de salud a media tarde sobre las 15 horas y ya empezada la noche sobre las 22 horas. Los suplementos alimenticios consistían en un alimento líquido o semilíquido con elevado contenido en carbohidrato y proteína, con posible adición de vitaminas o minerales en función de la necesidad específica del animal.

El *Projeto Mucky* pone mucho empeño en el adecuado enriquecimiento ambiental y alimentario. El enriquecimiento ambiental consiste en colocar una serie de objetos para inducir una reacción natural del animal, similar a los primates no humanos de vida libre, evitando la aparición de estereotipias. Busca activar todos los sentidos del animal desde la **vista** con objetos brillantes o de colores dominantes como el rojo, hasta el **olfato** con colocación de hojas de eucalipto u otras plantas aromáticas, pasando por el **tacto** con objetos

de distintas rugosidades (cartón, plástico, metal, brancas, hojas, flores, etc.) y el **oído** mediante la colocación de objetos ruidosos dentro de cajas. Los objetos colocados en los viveros para el enriquecimiento ambiental eran específicos de la condición del animal potenciando todos los sentidos posibles, por ejemplo, en animales ciegos se intentaba potenciar el oído, el tacto y el olfato.

Además, el manejo ambiental se encuentra complementado con el enriquecimiento alimentario que consiste en la aportación de frutas entre comidas como premios. En ese apartado el alumno intentó aportar una mejora en el *Projeto Mucky* con la colocación de la fruta en lugares específicos difíciles de alcanzar. De esa manera se obligaba al primate a desarrollar sus habilidades físicas y mentales para obtener el premio. La dificultad era proporcional a las capacidades físicas y mentales del animal.

En la enfermería, el alumno, participó en la esterilización quirúrgica de 2 *saguís*, colecta de sangre de 2 *saguís* y 9 *bugios*, nebulización periódica con acetilcisteína a varios *saguís* con problemas respiratorios, limpieza y tratamiento periódico con blastoestimulina a varios *saguís* con úlceras en las extremidades, musicoterapia y homeopatía en los primates de la enfermería, asistencia durante el proceso de colocación y extracción de la prótesis en un *bugio* paralítico y necropsia de 5 *saguís* muertos en los últimos 6 meses.

## **6. Conclusiones finales**

El excelente manejo higiénico sanitario y las medidas de bioseguridad instauradas por parte del centro justifican la nula presencia del agente o reacción inmunológica para todos los microorganismos investigados en el presente estudio. Aun así sería necesaria la realización de estudios complementarios para la determinación del comportamiento de los microorganismos estudiados en primates neotropicales de los géneros *Callithrix* spp y *Alouatta* spp.

El periodo de prácticas desarrollado ha permitido la adquisición por parte del alumno de conocimientos teórico-prácticos muy valiosos y poco usuales en los veterinarios sobre aspectos y cuidados básicos en el contexto de un centro de rescate de primates.

### ***Final conclusions***

The absence of any agents or immune reactions for all the microorganisms studied can be explained by the excellent health and hygiene management and all the biosecurity measures established by the rescue center. Even so, other supplementary studies should be developed

in order to determinate the performance of the studied microorganisms in neotropical primates of genera *Callithrix* and *Alouatta*.

The practice period undertaken has enabled the student to gain valuable and unusual theoretical-practical knowledge in veterinary science focusing on specific aspects and basic care in the context of a primate rescue center.

## 7. Valoración personal

El alumno valora muy positivamente la oportunidad de haber podido realizar el TFG enfocado a los primates neotropicales, y está muy satisfecho del periodo de prácticas disfrutado en el centro de rescate pues ha cumplido satisfactoriamente con los siguientes objetivos:

1. Iniciación en la investigación científica en el campo de agentes infecciosos y parasitarios.
  - a. Aprendizaje de la metodología para llevar a cabo un estudio científico, donde el alumno tuvo que diseñar y aplicar un protocolo de toma de muestras en función de las instalaciones y material disponible en el centro de rescate
  - b. Realización de algunas de las técnicas de detección de agentes infecciosos y parasitarios.
  - c. Manejo e interpretación de los datos obtenidos
2. Aprendizaje sobre el manejo y cuidados generales en primates.

## 8. Autoria

### AUTORES

Además del alumno –**Eloi Mazó Gratacós**- y sus orientadores del TFG –**Tania Pérez Sánchez** y **Joaquín Quílez Cinca**- los estudios de prevalencia de la parte primera de la presente memoria han sido realizados conjuntamente con el Laboratorio de Zoonosis Bacterianas y el Laboratorio de Enfermedades Parasitarias, ambos del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal (VPS), dirigidos por el profesor –**Marcos Bryan Heinemann**- y la profesora –**Solange Maria Gennari**-, respectivamente. También cabe destacar la ayuda recibida por el *Projeto Mucky* durante el proceso de obtención de las muestras.

## AGRADECIMIENTOS

**-Ignasi Bofill-** (*Laboratório da Malaria, Departamento de parasitologia, ICB, USP*), **-Vanessa da Silva Souza-** (*Projeto Mucky*), **-Livia Maria Botár-** (*Projeto Mucky*) y **-Arleii Marcili-** (*Laboratório de Doenças Parasitárias, VPS, FMVZ, USP*)

## **9. Referencias**

### **Artículos científicos**

Almeida D.S., dos Santos A.C., da Silva C.L.R., Oriá A.P., Oliveira A.V.D., Libório F.A., Athanzio D.A., Pinna M.H. 2016. Evidence of leptospiral exposure in neotropical primates rescued from illegal trade and a Zoo in Bahia, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 36(9): 864-868.

Alvarado-Esquivel C., Gayosso-Dominguez E.A., Villena I., Dubey J.P. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three zoos in Mexico City, Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44(3): 803–806.

Aquino R., Terrones C., Navarro E., Terrones W. 2007. Evaluación del impacto de la caza en mamíferos de la Cuenca del río Alto Itaya, Amazonía Peruana. *Revista Perú Biología*. 14: 181-186.

Babkin I.V., Tyumentsev A.I., Tikunov A.Y., Kurilshikov A.M., Ryabchikova E.I., Zhirakovskaya E.V., Netesov S.V., Tikunova N.V. 2013. Evolutionary time-scale of primate bocaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 14: 265–274.

Bahía M., Barros F.N.L., Magalhães-Matos P.C., Gonçalves T.S., Neto L.C., Faria D.C.L.O., Romeiro S.A., Monteiro F.O.B., Góes-Cavalcante G., Scofield A. 2016. *Trypanosoma cruzi* infection in captive Neotropical primates in the Brazilian Amazon. *American Journal of Wiley Primatology*. 79: 1-6.

Carme B., Ajzenberg D., Demar M., Simon S., Darde M.L., Maubert B., Thoisy B. 2009. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. *Veterinary Parasitology*. 163: 132–135.

- Casagrande R.A., Da Silval T.C.E., PescadorII C.A., Borellil V., Souza J.C., Souza E.R., Traversol S.D. 2013. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 33(1): 94-98.
- Cedillo-Peláeza C., Rico-Torresa C.P., Gerardo C.S.G., Correa D. 2011. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 180:368–371.
- Chege G.K., Steele A.D., Hart C.A., Snodgrass D.R., Omolo E.O., Mwenda J.M. Experimental infection of non-human primates with a human rotavirus isolate. *Vaccine*. 23: 1522-1528.
- Cook N., Bridger J., Kendall K., Gomara M.I., El-Attar L., Gray J. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infection*. 48: 289–302.
- Cunningham A.A., Buxton D., Thomson K.M. 1992. An Epidemic of Toxoplasmosis in a Captive Colony of Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). *Journal of Comparative Pathology*. 107: 207-219.
- Epiphanio S., Sinhorini I.L., Catão-Dias J.L. 2003. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. *Journal of Comparative Pathology*. 129(2): 196-204.
- Da Silva M., Noyes H., Campaner M., Junqueira A.C.V., Coura J.R., Añez N., Shaw J.J., Stevens J.R., Teixeira M.M.G. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Cambridge University Press Parasitology*. 129: 549–561.
- Da Silva M., Marcili A., Lima L., Cavazzana Jr M., Ortiz P.A., Campaner M., Takeda G.F., Paiva F., Nunes V.L.B., Camargo E.P., Teixeira M.M.G. 2009. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica*. 109: 199–207.
- Da Silva R.C., Machado C.P., Cruvinel C.A., Langoni H. 2013. Frequency of *Toxoplasma gondii* antibodies in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella nigrilus*) from an

- ecological station in the State of São Paulo, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 33(2):251-253.
- Flores B.J., Pérez-Sánchez T., Fuertes H., Sheleby-Elías J., Múzquiz J.L., Jirón W., Duttman C., Halaihel N. 2017. A cross-sectional epidemiological study of domestic animals related to human leptospirosis cases in Nicaragua. *Acta Tropica*. 170: 79-84.
- Garcia J.L., Svoboda W.K., Chryssafidis A.L., De Souza Malanski L., Shiozawa M.M., Navarro I.T., De Moraes Aguiar L., Ludwig G., Teixeira G.M., Da Silva L.R., Hilst C. 2005. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp., *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 133(4): 307-311.
- Hartskeerl R.A., Collares-Pereira M., Ellis W.A. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection*. 17: 494-501.
- Henrik H.D., Henrisken P., Bille-Hansen V., Aage S.H. 1997. Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys. *Veterinary Parasitology*. 68: 299-304.
- Innes E.A. 1997. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 20(2): 131-138.
- Jiang B., McClure H.M., Fankhauser RL., Monroe S.S., Glass R.I. 2004. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. *Journal of Medical Primatology*. 33: 30-33.
- Leite T.N.B., Maja T.A., Ovando T.M., Cantadori D.T., Schmidt L.R., Guércio A.C., Cavalcanti Á., Lopes F.M.R., Cunha I.A.L., Navarro I.T. 2008. Ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii* em macacos-prego (*Cebus apella*) de Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 17(1): 307-310.
- Marcili A., Valente V.C., Valente S.A., Junqueira A.C.V., Da Silva F.M., Pinto A.Y.N., Naiff R.D., Campaner M., Coura J.R., Camargo E.P., Miles M.A., Teixeira M.M.G. 2009a. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates,



- Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology* 39: 615-623.
- Marcili A., Lima L., Valente V.C., Valente S.A., Batista J.S., Junqueira A.C.V., Souza A.I., Da Rosa J.A., Campaner M., Lewis M.D., Llewellyn M.S., Miles M.A., Teixeira M.M.G. 2009b. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 1265-1274.
- Martella V., Bányai K., Matthijssens J., Buonavoglia C., Ciarlet M. 2009. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology* 140: 246-255.
- McLeod R., Kieffer F., Sautter M., Hosten T., Pelloux, H. 2009. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(2): 320-344.
- Medeiros L. dos S., de Souza S.F., de Carvalho Y.K., Ribeiro V.M.F., Martins G.M. de S., Lilienbaum W. 2017. Detection of anti-Leptospira antibodies in domestic captive primates from Acre, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 38(1): 301-304.
- Menezes-Costa A., Machado-Ferreira E., Voloch C.M., Bonvicino C.R., Seuánez H.N., Leoncini O., Soares C.A.G. 2013. Identification of Bacterial Infection in Neotropical Primates. *Microbial Ecology*. 66: 471-478.
- Mérien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Sanint-Girons, T. 1992. Polymerase chain reaction goes detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 2219-2224.
- Minuzzi-Souza T.T.C., Nitz N., Knox M.B., Reis F., Hagström L., Cuba C.A.C., Hecht M.M., Gurgel-Gonçalves R. 2016. Vector-borne transmission of *Trypanosoma cruzi* among captive Neotropical primates in a Brazilian zoo. *Parasites & Vectors*. 9: 39.
- Molina C.V., Catão-Dias J.L., Neto J.S.F., Vasconcellos S.A., Gennari S.M., Do Valle R.R., De Sousa G.O., De Moraes Z.M., Vitaliano S.N., Strefezzi R.D.F., Bueno M.G. 2014. Sero-epidemiological survey for brucellosis, leptospirosis, and toxoplasmosis in free-ranging *Alouatta caraya* and *Callithrix penicillata* from São Paulo State, Brazil. *Journal of Medical Primatology*. 43: 197-201.

- Ninostka B.A., Pacheco L.F. 2008. Densidad de población y uso de hábitat de *Cebus libidinosus* (primates, cebidae) en un bosque yungueño de Bolivia. *Mastozoología Neotropical*. 15(2): 273-283.
- Pinna M.H., Martins G., Pinheiro A.C., Almeida D.S., Oriá A.P., Lilenbaum W. 2012. Detection of Anti-*Leptospira* Antibodies in Captive Nonhuman Primates From Salvador, Brazil. *American Journal of Primatology*. 74: 8-11.
- Pinto P.L.S. 2000. Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 43(1): 44.
- Potkay S. 1992. Diseases of the callitrichidae - A review. *Journal of medical primatology* 21(4): 189-236.
- Romero M.P., Astudillo M.H., Sanchez J.V., Gonzalez L.G., Varela N.A. 2012. Titulos de anticuerpos contra *Leptospira* spp en primates del zoológico Matecaña, Pereira Colombia. *Revista MVZ de Córdoba*. 17(3): 3224-3230.
- Romero-Vivas C.M., Falconar A.K. 2016. *Leptospira* spp. and human leptospirosis. Review article. *Salud Uninorte. Barranquilla*. 32 (1): 123-143.
- Salem B.A., Chupin S.A., Bjadovskaya O.P., Andreeva O.G., Mahjoub A., Prokhvatilova L.B. 2010. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *Journal of Virological Methods*. 165(2):283-293.
- Sanchis F.S., Jamra L.F., Guimarães E.C., Deane M.P. 1972. Toxoplasmosis espontânea em animais domésticos e silvestres. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14(5): 314-320.
- Silva-Zacarias F.G., Spohr K.A.H., Lima B.A.C., Svoboda K., Malanski L.S., Alves L.A., Shiozawa M.M., Hilst C.L.S., Maron A., Aguiar L.M., Ludwig G., Passos F.C., da Silva V.O., Navarro I.T., de Freitas J.C. 2007. Avaliação da glicose sérica em pingüim de magalhães (*Spheniscus magellanicus* FOSTER, 1781) (Sphenicidae-aves) em cativeiro. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(2): 390-391.

- Slavov S.N., Otaguiri K.K., Pinto M.T., Valente V.B., Ubiali E.M.A., Covas D.T., Kashima S. 2017. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors from the Sao Paulo State, Brazil, between 2012 and 2014. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 11(3): 277-281.
- Varela N. 2011. Bioseguridad en el manejo de fauna silvestre y no convencional. *Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional*. 7(1): 20-30.
- Wang Y., Tu X., Humphrey C., McClure H., Jiang X., Qin C., Glass R.I., Jiang B. 2007. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. *Journal of Medical Primatology*. 36: 101-107.
- Ziccardi M., Lourenço-de-Oliveira R., Lainson R., Brígido M.C.O., Pereira J.A.C.M. 2000. Trypanosomes of Non-human Primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(2): 157-159.

### Libros

- Aquino R., Bodmer R.E., Gil J.G. 2000. *Impacto de la caza en poblaciones de primates de la cuenca del río Samiria. Reserva Nacional Pacaya-Samiria*. La primatología en el Perú. Vol II. Espinoza J., San Martín F., Montoya E. Lima-Perú: 81-91.
- Ellis W.A. 1998. *Leptospirosis*. Zoonoses. Palmer S.R., Soulsny L., Simpson D.I.H. New York. United States. Oxford University Press Inc: 115-127.
- Encarnación F., Moya L., Aquino R., Tapia J., Soini P. 2000. *Situación y estado actual de las especies de primates no humanos en el Perú*. La primatología en el Perú. Vol II. Espinoza J., San Martín F., Montoya E. Lima-Perú: 219-228.
- Miró Corrales G., Cordero del Campillo M. 2001. *Toxoplasmosis. Neosporosis. Encefalitozoonosis*. Parasitología Veterinaria. Cordero del Campillo M., Rojo Vazquez F.A. Madrid-España. McGraw-Hill-Interamerica: 665-668.
- Navarrete I., Acosta I. 2001. *Tripanosomosis*. Parasitología Veterinaria. Cordero del Campillo M., Rojo Vazquez F.A. Madrid-España. McGraw-Hill-Interamerica. 302-309.

**Tesis doctoral-master-grado**

Bofill I.V. 2016. Iniciación a los cuidados generales, los aspectos clínicos y el estudio de parásitos gastrointestinales en primates neotropicales del centro de rescate Projeto Mucky en Itu, Estado de São Paulo, Brasil. Universidad de Zaragoza.

Menoncin F.S. 2011. Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (rotavírus a, b e c, norovírus e sapov rus) em primatas não humanos em localidades do sul do brasil. Universidade Federal do Paraná. 18-35.

Vitaliano S.N. 2012. Isolamento e caracteriza o biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil. Universidade de São Paulo.