



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO – MESTRADO PROFISSIONAL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Danielle da Silva Forneas

**PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Coxiella burnetii* E *Toxoplasma gondii* EM FÊMEAS DE
PRIMATAS NÃO HUMANOS EM UM INSTITUTO DE PESQUISA NO RIO DE
JANEIRO**

Rio de Janeiro

2021

Danielle da Silva Forneas

**PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Coxiella burnetii* E *Toxoplasma gondii* EM FÊMEAS
DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM UM INSTITUTO DE PESQUISA NO RIO DE
JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência em Animais de Laboratório do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fiocruz/RJ, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência em Animais de Laboratório.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

Coorientador: Dr. Marco Aurélio Pereira Horta

Rio de Janeiro

2021

da Silva Forneas, Danielle .

PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Coxiella burnetii* E *Toxoplasma gondii*
EM FÊMEAS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM UM INSTITUTO DE
PESQUISA NO RIO DE JANEIRO / Danielle da Silva Forneas. - Rio de Janeiro,
2021.

80 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia
em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2021.

Orientadora: Elba Regina Sampaio de Lemos.

Co-orientador: Marco Aurélio Pereira Horta.

Bibliografia: f. 55-70

1. Abortos. 2. primatas não humanos. 3. *Coxiella burnetii*. 4. *Toxoplasma gondii*. I. Título.

Danielle da Silva Forneas

**PESQUISA DE INFECÇÃO POR *Coxiella burnetii* E *Toxoplasma gondii* EM FÊMEAS DE
PRIMATAS NÃO HUMANOS EM UM INSTITUTO DE PESQUISA NO RIO DE
JANEIRO**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para qualificação, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ.

Aprovada em 30 de Setembro de 2021.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Jairo Dias Barreira – UNIRIO/ FIOCRUZ
(Presidente da Banca)



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia
Universidade Federal Fluminense



Dr. Jorlan Fernandes de Jesus
LHR/IOC – FIOCRUZ



Prof.ª Dr.ª Maria Inês Doria
ICTB/ FIOCRUZ



Prof.ª Dr.ª Elba Regina Sampaio de Lemos
LHR/IOC – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2021

AGRADECIMENTOS

À Dra Elba Lemos, por sempre ajudar em todas as dificuldades que apareceram durante o projeto.

A todos do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses (LHR), obrigada por toda ajuda em todos esses anos, em especial na dissertação, ao Adonai, Jonathan e Matheus.

À Dra Tatiana Rozental, mesmo ausente do laboratório, sempre solícita e pronta para me ajudar.

À Dra Maria Regina Amendoeira, por proporcionar que a pesquisa contemplasse também informações sobre *Toxoplasma*, obrigada pela parceria.

A todos os alunos e integrantes do Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses, obrigada por serem incríveis e terem uma generosidade enorme para me ensinar.

Aos meus colegas de turma que fizeram com que o processo todo se tornasse muito mais leve.

E por fim, aos coordenadores e professores do Programa de Mestrado Profissional em Ciências em Animais de Laboratório, pelos ensinamentos e por me proporcionarem uma visão diferenciada na ciência em animais de laboratório.

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha família, em especial minha mãe por sempre motivar nos momentos mais difíceis e contribuir com tudo que estivesse ao seu alcance.

*“What do you fear, my lady? - A cage. To stay behind bars until use and old age accept them
and all chance of valor has gone beyond recall or desire.”*

Lord of the Rings: The Two Towers – 2002.

RESUMO

Desordens reprodutivas ocasionam grandes perdas para colônias de primatas, principalmente quando, por exemplo, se tem como objetivo que um determinado animal tenha descendentes com determinadas características genéticas. Este problema pode estar relacionado a diversos fatores, entre eles, fatores genéticos, questões de obesidade, comportamental/bem-estar e fatores de origem infecciosa. Em relação a este último fator, além dos gêneros *Mycoplasma* e *Brucella*, a proteobactéria *Coxiella burnetii* que é o agente etiológico da febre Q em humanos e coxielose em animais, assim como o protozoário *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose humana e animal, são agentes infecciosos que também precisam ser considerados, especialmente em animais com histórico de aborto e de outros distúrbios reprodutivos. Neste contexto, este projeto teve como proposta desenvolver um estudo descritivo seccional com o objetivo de verificar a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* e anti-*T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), além da reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de *C. burnetii* em amostras de soro de fêmeas de PNHs, com e sem histórico de distúrbios reprodutivos, mantidas em cativeiro no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB. Das 152 amostras de soro dos PNHs, espécies *Saimiri ustus*, *S. sciureus*, *Macaca fascicularis* (Cynomolgus) e *Macaca mulatta* (Rhesus), submetidas à análise sorológica (RIFI) e molecular (PCR) para a pesquisa de infecção por *C. burnetii*, todas foram negativas. Quanto à pesquisa de infecção por *T. gondii*, a presença de anticorpos foi detectada em sete das 152 amostras (4,6 %). Quatro destas sete fêmeas tinham histórico de abortos e todas pertenciam a espécie *M. mulatta*. Nossos resultados sugerem que em casos de abortos a pesquisa de *T. gondii* deve ser considerada.

Palavras-chave: Abortos, primatas não humanos, *Coxiella burnetii*, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Reproductive disorders cause great losses to primate colonies, especially when, for example, the goal is for a particular animal to have offspring with certain genetic characteristics. This problem may be related to several factors, among them, genetic factors, obesity issues, behavioral/well-being and infectious origin factors. Regarding this last factor, besides the *Mycoplasma* and *Brucella* genera, the proteobacterium *Coxiella burnetii*, which is the etiological agent of Q fever in humans and coxiellosis in animals, as well as the protozoan *Toxoplasma gondii*, which causes human and animal toxoplasmosis, are infectious agents that also need to be considered, especially in animals with a history of abortion and other reproductive disorders. In this context, the purpose of this project was to develop a descriptive sectional study to verify the presence of anti-*C. burnetii* and anti-*T. gondii* antibodies by indirect immunofluorescence reaction (IFT), and polymerase chain reaction (PCR) to search for *C. burnetii* in serum samples from NHP females, with and without a history of reproductive disorders, kept in captivity at the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB. Of the 152 serum samples from NHP, species *Saimiri ustus*, *S. sciureus*, *Macaca fascicularis* (Cynomolgus) and *Macaca mulatta* (Rhesus), submitted to serological (RIFI) and molecular (PCR) analysis for *C. burnetii* infection, all were negative. For *T. gondii* infection, antibodies were detected in seven of 152 samples (4.6%). Four of these seven females had a history of abortion and all belonged to the species *M. mulatta*. Our results suggest that in cases of abortions the investigation for *T. gondii* should be considered.

Keywords: Abortions, nonhuman primates, *Coxiella burnetii*, *Toxoplasma gondii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representante de primatas não humanos do velho mundo.....	14
Figura 2- Representante de primatas não humanos do novo mundo	14
Figura 3- Fenômeno de <i>sex skin</i>	15
Figura 4- Transmissão de <i>Coxiella burnetii</i>	19
Figura 5- Desenho esquemático da anatomia do <i>Toxoplasma gondii</i>	26
Figura 6- Oocisto de <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Figura 7- Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	29
Figura 8- A: Mapa do Campus Fiocruz em Manguinhos.....	40
Figura 9- Lâmina do teste comercial Focus®	42
Figura 10- Lâmina de <i>Cynomolgus (Macaca fascicularis)</i> reativa para <i>T. gondii</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Número total de primatas não humanos da colônia do ICTB. Dados referentes a 2020. ...	48
Tabela 2 -Amostras de fêmeas de PNH, do ScPrim reativas para <i>Toxoplasma gondii</i>	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Principais estudos atuais sobre infecção por *Coxiella burnetii* em animais com distúrbio de reprodução.....Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.2 Características principais dos primatas não humanos	12
2.2.1 Reprodução dos primatas não humanos	14
2.2.2 O primatanão humano como biomodelo	16
2.3 <i>Coxiella burnetii</i>	16
2.3.1 Transmissão.....	18
2.3.2 Infecção em humanos: Febre Q.....	19
2.3.3 Infecção em animais: Coxielose.....	20
2.3.4 Diagnóstico laboratorial	23
2.3.5 Tratamento.....	23
2.3.6 Medidas profiláticas e controle.....	24
2.3.7 <i>Coxiella burnetii</i> e primatas não humanos	24
2.4 <i>Toxoplasma gondii</i>	25
2.4.1 Transmissão.....	27
2.4.2 Infecção em humanos	29
2.4.3 Infecção nos animais	30
2.4.4 Diagnóstico laboratorial	31
2.4.5 Tratamento.....	33
2.4.6 Medidas profiláticas e controle.....	34
2.4.7 <i>Toxoplasma gondii</i> e primatas não humanos.....	35
3. OBJETIVO GERAL	36
3.1 Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Desenho do estudo	37

4.2	Considerações éticas	37
4.3	Local de estudo	37
4.4	Metodologia laboratorial	41
4.5	Teste sorológico	41
4.5.1	Teste sorológico – <i>Coxiella burnetii</i>	41
4.5.2	Teste sorológico – <i>Toxoplasma gondii</i>	43
4.5.2.1	Preparação do antígeno	43
4.5.2.2	Reação de Imunofluorescência indireta	43
4.6	Reação em cadeia de polimerase	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6	ANEXOS	50
6.1	O artigo submetido à publicação (ANEXO A)	50
6.2	Artigo (ANEXO B)	51
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	53
ANEXO A	Licença para utilização das amostras dos Primatas Não humanos da colônia do ICTB	69
APÊNDICE A	Escopo do artigo submetido para publicação na RBRA, em junho de 2021, seguido da confirmação via e-mail da submissão do artigo	70
APÊNDICE B	Folder informativo sobre agentes correlacionados em causar distúrbios reprodutivos em animais. Fonte: Arquivo pessoal	72

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas ocasionados em colônias de animais de laboratório é a perda ou comprometimento sanitário do animal. Neste contexto e considerando que os primatas não humanos (PNH) possuem um manejo mais elaborado em relação aos outros animais de menor porte, fica evidente que os custos e as estruturas acabam sendo maiores.

Quando em uma colônia existem fêmeas de alto interesse genético e as mesmas desenvolvem distúrbios reprodutivos, com perda da capacidade de geração de descendentes, os prejuízos principalmente para pesquisa são enormes. Os fatores associados a abortos e distúrbios reprodutivos comuns em colônias de PNH podem ser decorrentes de manejo incorreto, consanguinidade ou conseqüentes da infecção por diferentes microrganismos (KNAP et al., 2019; GOODMAN et al., 1998; SPRINGER et al., 2012).

Diversos agentes infecciosos estão ligados a causas de distúrbios reprodutivos em animais, seja de origem viral, bacteriana, fúngica ou protozoária. Grande parte desses agentes, quando os animais não são assintomáticos, causa, entre outros danos, principalmente abortos, fetos natimortos, mastite e vaginite. Destacam-se como agentes causadores mais frequentes, as bactérias dos gêneros *Brucella*, *Leptospira*, *Mycoplasma*, além do protozoário da espécie *Toxoplasma gondii* (BARKER et al., 2011; CASAGRANDE et al., 2013; RAMALHO et al., 2016; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2008).

Considerando a inexistência de investigação sobre outros agentes infecciosos associados com distúrbios reprodutivos em mamíferos é preciso chamar a atenção para a possibilidade de infecção pela proteobactéria *Coxiella burnetii* que pode infectar diferentes grupos de vertebrados. A bactéria *C. burnetii* é responsável por ocasionar abortos principalmente em pequenos ruminantes (ovelhas, cabras) e bovinos, uma zoonose de interesse em saúde pública e saúde animal, mas totalmente negligenciada e desconhecida no Brasil, apesar do crescente aumento de casos em diversos países do mundo (ÁLVAREZ-ALONSO et al., 2018; ESMAEILI, et al., 2019; KNAPet al., 2019; MAGOURAS et al., 2017; SELIM et al.; SEO et al, 2017). Desta forma, é preciso considerar também a possibilidade de infecção por este agente bacteriano, visto que pessoas que manipulam principalmente materiais de abortos como placentas, sem adequada proteção, podem desenvolver a doença. Outro agente que precisa ser

considerado é o protozoário *T. gondii*, também de grande importância em saúde pública como agente infeccioso associado com distúrbios de reprodução (OLIVEIRA et al., 2019; AL-ADHROEY et al., 2019).

Em relação à infecção em PNH, pouco se sabe sobre a prevalência de *C. burnetii* e *T. gondii* como agentes causadores de abortos e de outros distúrbios reprodutivos, porém em relação a *C. burnetii*, PNHs tem sido utilizado como biomodelos para testes de vacinas (ELDIN et al., 2017.; GREGORY et al., 2019; METTERS et al., 2019). Assim, o presente projeto tem como proposta verificar a presença de infecção por *C. burnetii* e *T. gondii* em fêmeas PNH mantidas em cativeiro em uma instituição de pesquisa. Em adição, com o desenvolvimento do projeto, pretende-se realizar um levantamento bibliográfico que possa subsidiar a elaboração de protocolo que inclua a investigação destes dois agentes no campo da primatologia, auxiliando, assim, na elaboração de medidas preventivas que possam reduzir a ocorrência de distúrbios reprodutivos em PNH que permaneçam sem etiologia definida.

Diante do exposto, com a hipótese de que *C. burnetii* e *T. gondii* possam estar infectando animais mantidos em cativeiro, o objetivo principal deste projeto foi verificar a presença da infecção por *C. burnetii* e *T. gondii* em fêmeas de PNH com e sem histórico de abortos, mantidas no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses e no Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses, do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, com o apoio essencial e estratégico do Serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim), do Instituto de Ciência de Tecnologia em Biomodelos – ICTB/Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, no período de outubro de 2019 a março de 2020.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2 Características principais dos primatas não humanos

Os primatas não humanos (PNH) são animais que possuem alto grau de semelhança genética com os seres humanos, incluindo similaridades etológicas, anatômicas e fisiológicas. Atualmente, os PNHs são classificados como os do Novo Mundo (NM) e os do Velho Mundo (VM). Os primatas do NM são pertencentes à ordem Platyrrhini (platy=

largo, rhini = nariz) e à família Cebidae, constituída pelos gêneros *Cebus* e *Callithrix*. Já os PNH do VM, pertencentes à infra-ordem Catarrhini (kata = inferior; rhini = nariz) e à Superfamília Cercopithecoidea e Hominoidea são encontrados nos continentes asiático, africano e europeu (GOODMAN et al., 1998; SPRINGER et al., 2012).

As principais diferenças dos primatas do NM e do VM estão relacionadas às características anatômicas, fisiológicas e etológicas. As aberturas nasais dos primatas do VM (Figura 1) são voltadas para baixo e com a presença de um septo nasal delgado. Em adição, estes PNHs apresentam uma arcada dentária composta por 32 dentes, unhas achatadas, orelhas com membrana timpânica conectada por tubo ósseo, além de uma calca que, quando presente, não é preênsil. Com uma ampla variedade no seu habitat, principalmente no solo, outra característica deste grupo de PNH é que frequentemente existe um grupo social composto por um macho com muitas fêmeas. Os machos raramente contribuem com os cuidados aos filhotes e sua alimentação onívora se baseia em plantas de forragens, insetos e pequenos animais (ANDRADE, 2002; Mattison & Vaughan, 2016).

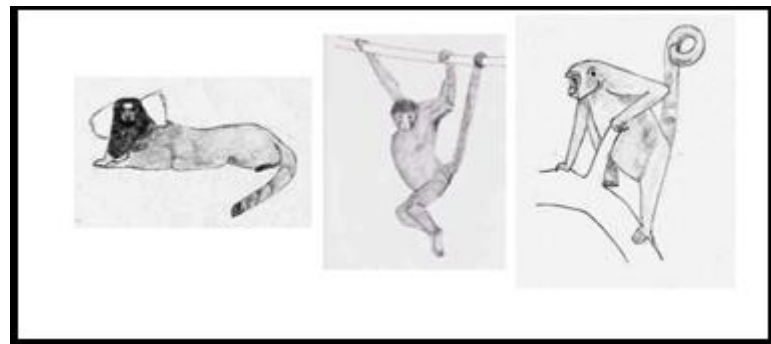
Em relação às espécies do NM (Figura 2), estes, além de apresentarem em geral um porte menor, possuem septo nasal largo, arcada dentária composta por 32 ou 36 dentes, 12 pré-molares e uma cauda preênsil. Além destas características, estes PNHs do NV não têm o polegar completamente oponível, não possuem unhas e apresentam a membrana timpânica conectada pelo anel ósseo. Diferentemente dos PNHs do VM, se observa uma pequena variedade no seu habitat, com predomínio de locais arbóreos, onde a fêmea sozinha fica com muitos grupos sociais de macho. Os machos contribuem com o crescimento dos filhotes e sua dieta compreende nozes, frutas e insetos. (ANDRADE, 2002; Mattison & Vaughan, 2016).

Figura1- Representantes de primatas não humanos do Velho Mundo: macaca do gênero *Macaca*, *Colobos* e *Babuínos*.



Ilustrações: Fabrício Belmiro. Fonte: Módulo didático de biologia Nº 23 -Parte I - Evolução.

Figura 2- Representantes de primatas não humanos do Novo Mundo: safui-do-tufo-branco, macaco-aranha e mono-carvoeiro.



Ilustrações: Fabrício Belmiro. Fonte: Módulo didático de biologia Nº 23 -Parte I - Evolução.

2.1.1 Reprodução dos primatas não humanos

Devido à ampla variedade de espécies dos PNHs, estes mamíferos apresentam particularidades nos seus ciclos reprodutivos, principalmente as fêmeas. Os PNHs do VM apresentam os ciclos parecidos com o da mulher, com ciclos ovarianos do tipo menstrual, com ovulações espontâneas e comportamento de cópula, ocorrendo em qualquer fase do ciclo e em qualquer época do ano, exceto as lêmures de Madagascar que copulam somente em determinadas estações do ano, quando apresentam maior atratividade e receptividade ao macho (GUIMARÃES, 2007).

As fêmeas dos PNHs do VM, em geral, apresentam o fenômeno chamado de *sex skin* (Figura 3), alterações morfológicas externas caracterizadas por vermelhidão ao redor da linha pubiana, estendendo-se na parede abdominal, nádegas, costas (parte caudal), internamente nas coxas, debaixo da cauda, assumindo formato simétrico, bilateral. Estas

alterações são apresentadas tanto nas fêmeas como também nos machos (ANDRADE, 2002).

Figura3-Fenômeno de *Sex Skin* representado numa fêmea de espécie *Macaca Mulata* (Rhesus).



Fonte: Andrade, M.C.R.; Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica. Pag: 74. Editora Fiocruz. 2010.

Quanto aos PNHs do NM, onde se encontram uma maior diversidade de espécies, é possível observar diferentes ciclos menstruais e ciclos estrais. Os saguis (*Callithrix*) possuem uma diferença em copular independente da fase do ciclo, podendo realizar cópulas férteis no período pós-parto e durante a lactação (DIXON, 1993; GUIMARÃES, 2007). Algumas fêmeas apresentam inibição no seu ciclo ovariano devido a quesitos de interação social, como a presença de uma fêmea mais velha e dominante no local.

Os principais sinais indicativos da fêmea em período fértil são o aumento da temperatura corpórea, aumento do órgão genital e mudança na sua coloração. O comportamento da fêmea muda tornando-se mais ativas e solicitam o acasalamento (RODRIGUES, 2010).

A gestação de uma fêmea é próxima entre as espécies dos PNHs, variando em poucos dias de diferença. Por exemplo, a espécie *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*) tem uma gestação de 155 a 165 dias, parindo apenas um filhote, semelhante à espécie de *Macaca mulatta* (Rhesus) que possui um período gestacional entre 165 e 175 dias, parindo também apenas um filhote. O mesmo com os macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus* e *Saimiri ustus*), cujo período de gestação varia de 148 a 172 dias, parindo um filho que é desmamado por volta de seis meses de idade (BRADY, 2000; ICTB, 2020).

É preciso ressaltar que fatores como manejo, nutrição, controle sanitário de doenças e enriquecimento ambiental e de medidas para minimizar o estresse irão aumentar as chances de estas fêmeas terem uma gestação finalizada sem intercorrências. Porém, algumas situações como idade reprodutiva, intervalo entre partos e se a fêmea é primípara podem influenciar no fato da gestação não ser completa (SOUZA et al., 2016).

2.2.2 O primata não humano como biomodelo

A similaridade genética com os seres humanos proporciona que os PNHs sejam muito utilizados em pesquisas biomédicas há décadas, por serem considerados excelentes modelos experimentais para diversos agentes. Neste cenário, existem muitos estudos utilizando a espécie *M. fascicularis* como biomodelo nas infecções causadas por diversos agentes. Dentre eles, destaque para estudos experimentais com rotavírus A (BENTES et al., 2018), vírus da hepatite E e A (CARVALHO, 2011; LEON et al., 2016), vírus Zika (OSUNA & WHITNEY, 2017; SCHOUDEST et al., 2020; STEINBACH et al., 2020), além de estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas contra hepatite A, tuberculose, além de trabalhos com *Trypanosoma cruzi* na Fundação Oswaldo Cruz (ICTB, 2020).

Em adição, os PNHs têm sido utilizados também como modelos experimentais em estudos sobre epilepsia (HARRIS & LOCKARD, 1979) e endometriose (NISHIMOTO-KAKIUCHI et al., 2018). Quanto aos PNHs Rhesus (*M. mulatta*), os principais estudos experimentais estão relacionados ao desenvolvimento de vacinas para leishmaniose, febre amarela, além dos testes de neurotropismo e neurovirulência relacionados ao vírus vacinal da febre amarela (ICTB, 2020). Mais recentemente foram também considerados importante biomodelo para brucelose, uma zoonose que, semelhante à febre Q, está associada com distúrbios reprodutivos (RUSSELL-LODRIGUE et al., 2017) e babesiose (GUMBER et al., 2016).

Ainda como PNHs do NM de importância para as pesquisas aplicadas, merecem destaque as espécies do gênero *Saimiri* como animais para experimentação no campo de estudos sobre vacinas antimaláricas (GYSIN, 1980) e ensaios pré-clínicos da doença, devido ao seu menor porte, o que facilita o manuseio e a sua contenção (ICTB, 2020).

2.3 *Coxiella burnetii*

Ao investigar o surgimento de uma doença febril que acometia trabalhadores do matadouro público de Cannon Hill, em Brisbane - Austrália, o pesquisador Edwar

Holbrook Derrick descobriu em 1937 a bactéria *C. burnetii* (DERRICK, 1937; STOKER & MARMION, 1955). Inicialmente, como não haviam descoberto qual doença era, passou a ser chamada de “*query fever*”, - interrogação / dúvida (STOKER & MARMION, 1955). Acreditava-se que se tratava de bactérias do gênero *Rickettsia*, denominada primeiramente *Rickettsia burnetii*. Mais tarde, com os avanços de técnicas moleculares, o agente foi reclassificado para o gênero *Coxiella*, com a denominação de *C. burnetii* em homenagem a Cox e Burnet, pesquisadores responsáveis pelo seu isolamento (PHILIP, 1948). Assim, com os sequenciamentos realizados em 2003, foi estabelecida a classificação taxonômica atual da bactéria (SESHADRI et al., 2003).

Coxiella burnetii é uma bactéria Gram-negativa obrigatória, pertencente à ordem Legionellales, família Coxiellaceae (SESHADRI et al., 2003), fazendo parte do grupo das gama proteobactérias (STEIN et al., 1992). Possui tropismo por monócitos e macrófagos sendo responsável por causar a febre Q em humanos e coxielose nos animais.

Classificada como agente de classe risco 3 e de seleção nível 2 /categoria B em ameaça bioterrorista ao ser usada como arma biológica, a bactéria tem o potencial de se dispersar numa linha de 2 km e provocar doença incapacitante aguda (MADARIAGA et al., 2003). São bactérias bem resistentes ao ambiente, por formam partículas “*esporos-like*” e não dependem da transmissão exclusiva por artrópodes (MCCAUL & WILLIAMS, 1981). Possui duas variações de fases: I e II relacionadas com a mutação do lipopolissacarídeo (LPS). Na fase II, denominada aguda, encontrada nos animais infectados, artrópodes ou seres humanos, corresponde ao LPS de variação lisa. Em contrapartida, a fase I, possui um potencial de menor infectividade, sendo adquirida mais em laboratórios, correspondendo ao LPS de variação rugosa/truncado na qual se identifica a ausência de algumas proteínas determinantes da superfície celular (ANGELAKIS & RAOULT, 2011; MARES-GUIA, 2015; MAURIN & RAOULT, 1999; MCCAUL & WILLIAMS, 1981).

Por ser uma bactéria intracelular, *C. burnetii* utiliza receptores específicos eucarióticos para invadir células hospedeiras. Nesta fase (II), a bactéria penetra nos macrófagos humanos a partir de receptores de complemento 3 (CR3), enquanto que na fase I, a entrada além de ser bloqueada através do receptor CR3, a bactéria se liga a monócitos humanos pelo complexo de LRI (leucócitos resposta integrina, $\alpha\beta3$) e IAP (proteína associada à integrina). Assim, enquanto *C. burnetii* de fase I, apesar de ser mal internalizada pelos monócitos e macrófagos, sobrevive dentro dessas células, na fase II é

interiorizada com facilidade pelos monócitos e macrófagos, embora seja rapidamente eliminada pela via fagolisossomal (ANGELAKIS & RAOULT, 2011; MARES-GUIA, 2015; MAURIN & RAOULT, 1999). Quanto ao carrapato infectado com *C. burnetii*, a bactéria se replica dentro do intestino dos mesmos, sendo eliminada uma grande carga de bactérias nas fezes (ELDIN et al., 2017).

A primeira descrição de infecção por *C. burnetii* no Brasil ocorreu em 1953, em operários de um frigorífico no estado de São Paulo, com base em evidência sorológica (BRANDÃO, VALE & CHRISTÓVÃO, 1953) e, somente em 2008, o primeiro caso de febre Q foi confirmado a partir da análise molecular PCR (reação em cadeia de polimerase) em um paciente residente no município de Itaboraí, no estado do Rio de Janeiro (LEMOS et al., 2011,). Além do Rio de Janeiro, casos têm sido identificados nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Goiás, Ceará e São Paulo, comprovando a presença desta bactéria no Brasil, incluindo estudos mais recentes no estado de Alagoas, onde placentas de cabras foram positivas para *C. burnetii* (OLIVEIRA, et al., 2020; de SOUZA, et al., 2019; FERREIRA, et al., 2018; MARES-GUIA, 2011; MARES-GUIA et al., 2014; SOUZA, et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; ZANATTO, et al., 2019).

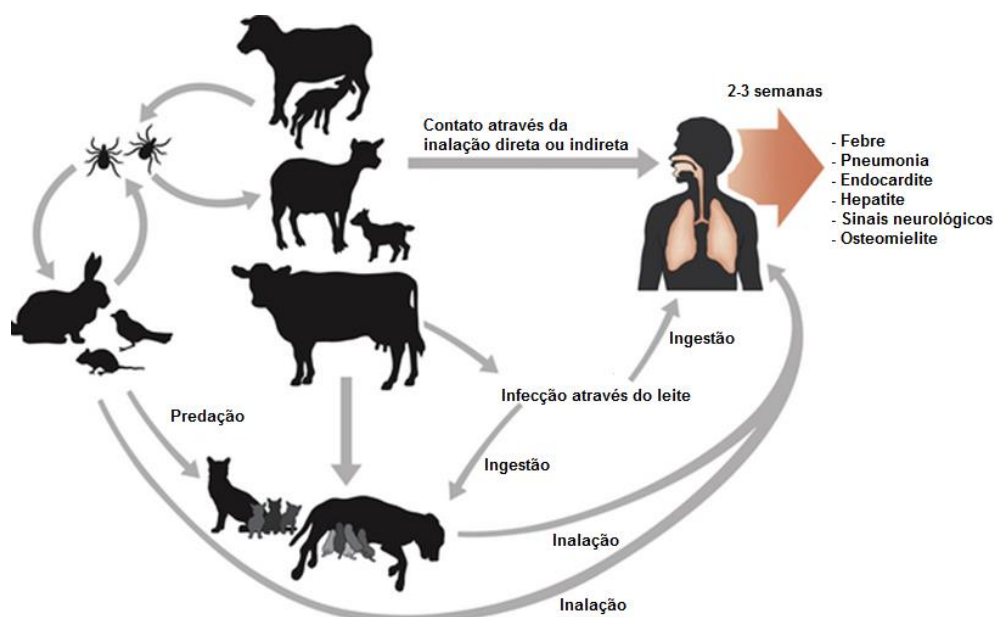
2.3.1 Transmissão

Mesmo sendo comumente mantida em ruminantes como bovinos, caprinos e ovinos, considerados os seus principais reservatórios, a bactéria não se limita somente a estes mamíferos, pois já foi encontrada em animais silvestres, cães, gatos domésticos, aves, artrópodes, em uma ampla rede de reservatórios vertebrados (MAURIN & RAOULT, 1999; ELDIN et al., 2017).

A transmissão para os seres humanos ocorre geralmente a partir da inalação de aerossóis contaminados provenientes da urina, fezes, leite, líquido amniótico, placenta, produtos de abortamento, lã ou menos comumente pela ingestão de leite cru de animais infectados (Figura 4) (CDC, 2013). A transmissão sexual de *C. burnetii* foi demonstrada experimentalmente em camundongos infectados, no entanto, este modo de transmissão ainda não foi totalmente estabelecido em seres humanos e animais selvagens (ELDIN et al., 2017; MANN et al., 1986, HONARMAND, 2012; MAURIN & RAOULT, 1999).

Estudos recentes têm demonstrado que as ovelhas liberam mais bactérias e por mais tempo em descargas vaginais do que cabras e podem manter as bactérias em gestações subsequentes (ARRICAU-BOUVERY & RODOLAKIS, 2005). *C. burnetii* também pode ser recuperada a partir do leite por até 32 meses. Cabras liberam *C. burnetii* nas fezes antes e depois do parto e a duração média de excreção é de 20 dias (ANGELAKIS & RAOULT, 2010), tornando o ciclo de manutenção da bactéria mais complexo.

Figura4- Rotas de transmissão de *Coxiella burnetii*.



Fonte: Sykes, J.E., Norris, J.M. Fastest Veterinary Medicine Insight Engine. 2016. Adaptada por Forneas, D.

2.3.2 Infecção em humanos: Febre Q

Em humanos a bactéria causa manifestações clínicas diversas e pouco específicas, o que pode justificar o seu desconhecimento e a reduzida ou mesmo a ausência de notificação. A gravidade do quadro irá depender da quantidade de partículas inaladas e/ou ingeridas (ANGELAKIS & RAOULT, 2010), bem como se o hospedeiro tem alguma

doença pré-existente ou algum quadro de imunossupressão em que a doença possa se agravar.

De uma forma geral, como a transmissão do agente na maior parte das vezes é por inalação, os sinais clínicos mais frequentes em seres humanos é um quadro respiratório caracterizado como uma pneumonia e uma doença influenza-like. Já os casos de contaminação via digestiva, associam-se, entre outras manifestações, com quadros de hepatite (ANGELAKIS & RAOULT, 2010). A infecção por *C. burnetii*, quando sintomática, se apresenta como uma doença febril autolimitada, pneumonia ou como hepatite granulomatosa, enquanto que na fase persistente (crônica) da doença a principal manifestação é a endocardite, embora uma miríade de sinais e sintomas possa ocorrer desde alterações hematológicas com trombocitose osteoarticulares simulando doenças reumatológicas, hematológicas, entre outras (ANGELAKIS et al., 2011; ROZENTAL et al., 2012; RAOULT, 2011; WILDMAN et al., 2002).

2.3.3 Infecção em animais: Coxielose

Na maioria das vezes a infecção por *C. burnetii* nos animais é assintomática e quando os sinais aparecem, são relacionados com distúrbios reprodutivos como abortos, partos prematuros, fetos natimortos, além de casos clínicos de pneumonia. Durante a fase aguda, *C. burnetii* pode ser encontrada no sangue, pulmões, baço e fígado dos animais, enquanto que durante a fase crônica a bactéria é liberada persistentemente nas fezes e na urina (ANGELAKIS & RAOULT, 2010). O aborto ocorre mais frequentemente no final da gestação, sem sinais clínicos específicos até que o aborto esteja prestes a acontecer, como observado com brucelose ou clamidiose, o que pode confundir o diagnóstico definitivo e na literatura são descritos diversos estudos com *C. burnetii* em animais (Quadro 1). Muitas vezes, o número de fêmeas que aborta no rebanho pode não ser suficiente para alertar e os casos clínicos humanos geralmente são os que possibilitam identificar, muitas vezes, a infecção do rebanho (MACÍAS-RIOSECO et al., 2019.; CRUZ et al., 2018; MAURIN & RAOULT, 1999.; HAZLETT et al., 2013; REICHEL et al., 2012.; ZARZA et al., 2021).

Quadro 1: Principais estudos sobre infecção por *Coxiella burnetti* em animais com distúrbio de reprodução publicados nas duas últimas décadas.

PAÍS	GRUPO DE ANIMAIS	AMOSTRA (TIPO)	MÉTODO DIAGNÓSTICO	NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS /NÚMERO TOTAL	REFERÊNCIA
Turquia	Ovelhas	Sangue	ELISA	19/ 72	MALAL, et al., 2021.
Caribe	Ovinos e bovinos	sangue	ELISA	35 / 133 – ovelhas 0 / 63 - bovinos	CONAN,. et al., 2020.
Uruguai	Bovinos	Placentas e fetos	Imuno-histoquímica e PCR	4/4–imuno-histoquímica 3/4 - PCR	MACÍAS-RIOSECO, et al, 2020.
Austrália	Cães e gatos	Soro, sangue, tecido reprodutivo e swab reprodutivo	IFI PCR	86/ 330 – cães - IFI 19/ 145 – gatos- IFI	MA, et al., 2020.
Brasil	Bovinos	soro	IFI	14/ 102	ZANATTO, et al., 2019.
Eslovênia	Ovinos e bovinos	sangue	PCR	14/ 150	KNAP, et al., 2019.
Portugal	Ovinos e cabras	leite	ELISA	8/ 78	CRUZ, et al., 2018.
Brasil	Cabras	Soro Placentas	ELISA PCR	172/ 312 2/23	OLIVEIRA, et al., 2018
Itália	Cães e gatos	Placentas, fetos natimortos	PCR	0/ 151	STEFANETTI, et al., 2018
Coréia do Sul	Bovino e ovino	Placentas, fetos natimortos	PCR Imuno-histoquímica	2/2 - PCR	LEE, et al., 2018
Suíça	Bovino	Soro, placenta, conteúdo abomasal	ELISA PCR	29/ 182- soro 28/242- placenta 7/57- conteúdoabomasal	VIDAL, et al., 2017
Argélia	Bovino	sangue	ELISA	6/ 360	DERDOUR, et al., 2017

PAÍS	GRUPO DE ANIMAIS	AMOSTRA (TIPO)	MÉTODO DIAGNÓSTICO	NÚMERO DE ANIMAIS POSITIVOS /NÚMERO TOTAL	REFERÊNCIA
Suíça	Ovinos e caprinos	Soro, placentas e conteúdo abomasal fetal	PCR ELISA	38/77- PCR 0/37	SCHNYDRIG, et al., 2017
Turquia	Ovinos	Soro	ELISA	69/ 521	KILIC, KALENDER, 2016
Irã	Bovinos, ovinos e caprinos	Soro	PCR	31/ 154	ABIRI., et al., 2016
Hungria	Ruminantes domésticos e selvagens	Placentas	PCR Imuno-histoquímica	33/111 – Ruminantes domésticos 2/91-Ruminantes silvestres	KREIZINGER, et al., 2015
Canadá	Ovelhas e cabras	Placentas, fetos natimortos	PCR	185 /259	HAZLETT, et al., 2013
Inglaterra e País de Gales	Ovelhas, Cabras, alpacas, suínos e bovinos	Cotilédones placentários	PCR	10/ 139	PRITCHARD, et al., 2011
Emirados Árabes	Gazela	Material de placenta, swab vaginal, sangue	PCR ELISA	5/ 20 15/ 20	LLOYD, et al., 2010
Espanha	Ovinos	Leite, sangue	PCR ELISA	34/154- leite 90/ 1011- ovelhas	GARCÍA-PÉREZ, et al., 2009
Turquia	Bovinos, ovinos e cabras	Sangue	ELISA	45/204 – bovinos 45/158- ovinos 10/100- cabras	CEYLAN, et al., 2009
Itália	Bovinos	Soro	ELISA	292/ 650	CABASSI, et al., 2006
Espanha	Ovinos	Placentas e tecidos fetais (pulmão, baço, rim, músculo cardíaco, fígado)	PCR	10/ 70- Placentas (14%) 32/ 194 (17%)	OPORTO, et al., 2006

2.3.4 Diagnóstico laboratorial

Uma vez que o diagnóstico clínico é difícil, devido à similaridade com uma série de doenças infecciosas ou não infecciosas, na maioria dos casos o diagnóstico de febre Q/coxielose é confirmado a partir dos testes sorológicos. Uma variedade de técnicas sorológicas está disponível, mas o teste de imunofluorescência indireta (IFI) tornou-se a técnica de referência (ANGELAKIS & RAOULT, 2010), um teste sorológico que permite a diferenciação de infecções de febre Q agudas (fase II) e crônicas/persistentes (fase I).

Quanto ao diagnóstico molecular, tem sido utilizada, entre outras técnicas, a PCR convencional, *nested* PCR ou PCR em tempo real (KLEE et al., 2006), um teste que possibilita a detecção do DNA de *C. burnetii*, viabilizando, assim, o diagnóstico de forma precoce (FOURNIER et al., 1998). Outras técnicas diagnósticas, como imunohistoquímica, também são utilizadas tanto para a investigação da infecção em amostras humanas quanto as de animais. A técnica de isolamento a partir da cultura de células deve ser evitada por ser uma técnica laboriosa, demorada e de elevado risco biológico, fato que exige um laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) (ANGELAKIS & RAOULT, 2010; MAURIN & RAOULT, 1999).

2.3.5 Tratamento

Diante das inúmeras controvérsias, mais pesquisas são necessárias para determinar a eficácia do tratamento de rebanhos inteiros ou animais individuais para prevenir ou controlar a liberação de *C. burnetii* e na prevenção de eventos adversos associados à gravidez com coxielose (ANGELAKIS & RAOULT, 2010; MAURIN & RAOULT, 1999).

Assim, preconiza-se que abortos sejam tratados em animais individuais para prevenir eventos adversos da gravidez, a via parenteral (duas injeções de oxitetraciclina a 20 mg / kg administrada com 20 dias de intervalo) no final da gestação pode ser útil, apesar dos dados escassos e inconclusivos. Além do mais, embora possa evitar abortos, o tratamento parenteral de cada animal não parece diminuir a disseminação do organismo em fluidos de nascimento ou mesmo mudar o status sorológico (ANGELAKIS & RAOULT, 2010).

O tratamento em seres humanos consiste na utilização de doxiciclina, considerado o antibiótico específico para tal doença. Em pacientes com a forma crônica/persistente, recomenda-se que seja administrada hidroxicloroquina associada à doxiciclina, com o acompanhamento da cinética de anticorpos IgG a partir dos testes sorológicos. Em casos de febre Q em que o paciente apresenta quadros de meningoencefalite, as fluoroquinolonas poderão ser utilizadas, pois estas ultrapassam a barreira hemato-encefálica, atingindo, assim, o líquido cefalorraquidiano (ANGELAKIS & RAOULT, 2010).

2.3.6 Medidas profiláticas e controle

Alguns cuidados devem ser tomados para evitar a disseminação da bactéria, como boa higienização do ambiente onde ocorrerem partos, assim como dos manipuladores desses produtos. O uso de equipamentos de proteção individual como máscaras apropriadas, luvas, jalecos adequados, diminui o risco de exposição do profissional impedindo a inalação de partículas do agente. A pasteurização, a 72°C durante 15 segundos, ou esterilização do leite de rebanhos infectados, é regularmente recomendada mesmo que a via oral não seja a principal via de transmissão da bactéria (ARRICAU-BOUVERY & RODOLAKIS, 2005). Por fim, recomenda-se que os novos animais, antes de serem introduzidos em uma fazenda ou criadouro, sejam mantidos em quarentena e submetidos a testes para a pesquisa de infecção por *C. burnetii*, de tal forma que animais soronegativos sejam incluídos no rebanho. Atualmente, não existe nenhuma vacina disponível no Brasil (ANGELAKIS & RAOULT, 2010).

2.3.7 *Coxiella burnetii* e primatas não humanos

O primeiro estudo em PNHs ocorreu durante a Operação Whitecoat, em 1955, com voluntários humanos, primatas, porquinhos da Índia (*Cavia porcellus*) e ratos (*Mus musculus*) que foram expostos a aerossóis de *C. burnetii* (ANDERSON, 2013). Ejercito et al. (1993), conseguiram encontrar evidência sorológica para *C. burnetii* em PNHs silvestres da espécie de *Macaca fuscata*, através do método de ELISA, sendo um dos poucos relatos existentes na literatura por evidência sorológica, sem experimentação animal.

Na literatura, os estudos que envolvem PNHs e *C.burnetii* estão relacionados em sua maioria, ao desenvolvimento de vacinas. Infecções experimentais por *C. burnetii* através da inalação corresponde a maior parte dos estudos (NELSON, 2021), considerando que estes animais representam um bom biomodelo para tal, principalmente da espécie *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*), utilizado para comprovar a eficácia de vacinas para *C. burnetii* (ELDIN et al., 2017.; GREGORY et al., 2019; METTERS et al., 2019). Estudos comprovam que esta espécie é o melhor biomodelo por conseguir expressar os sinais clínicos e alterações patológicas semelhantes às observadas na população humana, como febre, pneumonia, alterações hepáticas, além de conseguir manter anticorpos das duas fases da doença circulantes por até meses (BEWLEY et al.,2013.; GONDER et al., 1979; KISHIMOTO et al.,1981;WAAG et al., 2002; WAAG et al., 1999).

Um estudo realizado em 2019 avaliou a técnica de PCR em tempo real comparado a sorologia de PNHs, para acompanhar a eficácia da vacina nesses animais expostos em aerossóis de camundongos infectados, comprovando um método de detecção rápida e com boa especificidade (HOWE et al., 2009).

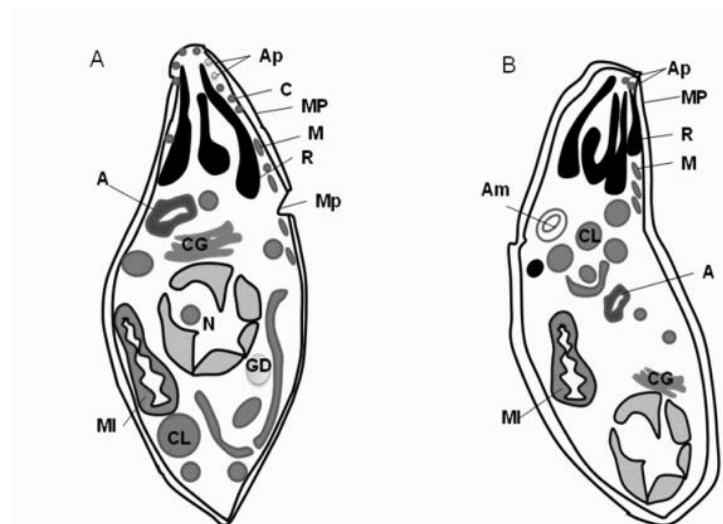
Por mais que existem diversos estudos sobre a vacina de *C. burnetii*, a infecção nos biomodelos (principalmente PNHs) se torna desafiador, devido ao modo de transmissão por aerossóis (GREGORY et al., 2019).

2.4 *Toxoplasma gondii*

A primeira descrição sobre *T. gondii* ocorreu após o seu isolamento em roedores da espécie *Ctenodactylus gundii*, na África do Norte por Nicolle e Manceaux, em 1908 (NICOLLE & MANCEAUX, 1969). O primeiro caso de toxoplasmose humana descrito foi em 1913 por Castellani (PIZZI, 1997) enquanto que o primeiro relato em recém-nascido, decorrente da transmissão congênita, isto é, de transmissão vertical, ocorreu em 1939, nos Estados Unidos (SABIN, 1942).A origem do termo *Toxoplasma* se deu devido à sua forma taquizoíta (*toxon*= arco; *plasma* = vida). São protozoários do Filo Apicomplexa, no qual *Toxoplasma* é um membro dos coccídeos formadores de cistos (SIMÕES et al., 2015; BLADER et al., 2015).O protozoário *T. gondii* apresenta-se sob três formas: trofozoítos ou taquizoítos,bradizoítos e oocistos, cujas características são apresentadas abaixo:

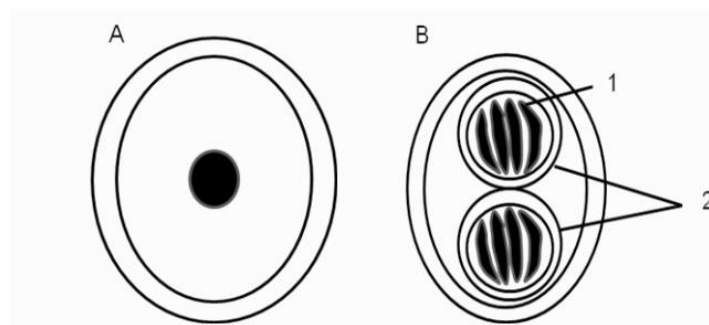
- (i) **Trofozoítos ou Taquizoítos.** Presentes durante o início da infecção, estas formas possuem um núcleo grande, com uma das extremidades mais afilada e outra mais arredondada, com capacidade de invadir qualquer célula dos hospedeiros, exceto hemácias (Figura 5.A).
- (ii) **Bradizoítos.** Presentes nos hospedeiros intermediários como cistos teciduais que se encontram nos músculos cardíacos, esqueléticos e no cérebro. Possuem a morfologia esférica no cérebro e mais prolongada no hospedeiro (Figura 5.B).
- (iii) **Oocistos.** Podem ser oocistos esporulados, contendo esporozoítos (A) e oocistos não esporulados eliminados pelos hospedeiros definitivos nas fezes (B), ou seja, dos felídeos domésticos ou silvestres (Figura 6).

Figura 5- Desenho esquemático da anatomia do *Toxoplasma gondii*.



A: Anatomia do taquizoíto; **B:** Anatomia do bradizoíto. **Ap:** Anel polar; **C:** Conoide; **M:** Micronema; **MP:** microporo; **R:** Roptrias; **GD:** Grânulos densos; **A:** Apicoplasto; **Mp:** Microporo; **MP:** Membrana Plasmática; **RE:** Retículo endoplasmático; **CG:** Complexo de Golgi; **N:** Núcleo; **MI:** Mitocôndria, **Am:** Amilopctina; **CL:** Corpo lipídico. Fonte: Simões et al., 2015.

Figura 6- Oocisto de *Toxoplasma gondii*.



1: Esporozóito; 2: Esporocisto. Fonte: Simões et al., 2015.

A epidemiologia da toxoplasmose é bem complexa, considerando que tem sido descrita em diversos países do mundo, com uma incidência maior em países subdesenvolvidos. No norte da África, tem sido descrita com frequência em Marrocos, Argélia, Tunísia, Líbia e Egito e um dos principais motivos para este achado são as festas culturais/ étnicas muçulmanas, nas quais o cordeiro usado durante o sacrifício é consumido malcozido (ROUATBI et al., 2018). Nos Estados Unidos, esta forma de transmissão ocorre com mais frequência a partir da ingestão de ostras, mexilhões e amêijoas crus (JONES et al., 2009). Locais onde predominam temperatura elevada e úmida, os oocistos conseguem ser mantidos mais viáveis do que em locais de clima seco e com baixas temperaturas (HALONEN et al., 2013).

Em 1927, foi descrito o primeiro caso de toxoplasmose no Brasil, com a identificação de um caso fatal em um recém-nascido com encefalite e coriorretinite. A necropsia demonstrou a presença de coccídeo no tecido nervoso central, além do acometimento de vários órgãos da criança. Posteriormente, o agente passou a receber denominações em cada espécie animal que era encontrada, mas com avanços nas pesquisas chegaram à conclusão de que se tratava de uma única espécie: *T. gondii*. Com o desenvolvimento de estudos foi possível compreender melhor a biologia do parasita, um agente infeccioso de vida intracelular obrigatória potencialmente detectada em diversas espécies de animais (AMENDOEIRA et al., 1999; FERGUSON, 2009).

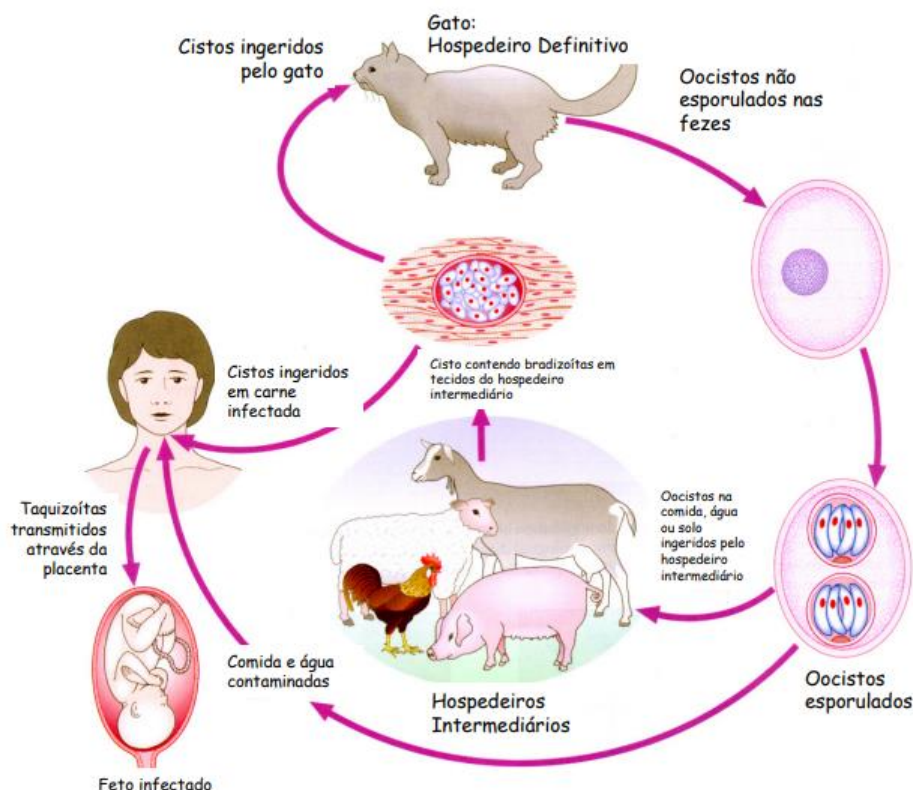
Com os avanços moleculares do agente, foi possível identificar três tipos de linhagens: I, II, III. No Brasil, estudos mostram que predominam os genótipos I e II, genótipos estes que estão relacionados com maior número de casos com acometimento ocular mais intenso em crianças e adultos. O genótipo III é descrito apenas na Europa e América (PORTELA et al., 2004).

2.4.1 Formas de transmissão

Toxoplasma gondii possui uma extensa rede de hospedeiros que podem ser infectados com este parasita. O agente já foi descrito em caninos, caprinos, aves, ovinos, bovinos, equinos, mas os felinos domésticos e silvestres correspondem aos hospedeiros definitivos. Estes se infectam a partir da ingestão de oocistos presentes em outros animais, como roedores e pássaros, passando a eliminar os oocistos não esporulados em torno de 15 dias (DUBEY, 2010; FIALHO et al., 2009; ROUATBI et al., 2018).

A população humana se infecta a partir da ingestão destes oocistos presentes em carne crua ou malpassada, água ou até mesmo pela mão contaminada com fezes, além da via de transmissão congênita, na qual a mãe passa o parasita para o feto, através da placenta, causando diversas alterações decorrentes da interação dos taquizoítas com os tecidos fetais (Figura 7). Em indivíduos imunossuprimidos e recém-nascidos os sinais e sintomas clínicos se tornam mais evidentes. Embora menos frequente, pode ocorrer também a transmissão através de transplantes de órgãos ou tecidos (BLADER et al., 2015; ROUATBI et al., 2018).

Figura7-Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*.



Os gatos se contaminam ingerindo os oocistos não esporulados que são eliminados nas suas fezes. A esporulação dos oocistos ocorre de um a cinco dias no ambiente, tornando-os infectantes. Os hospedeiros intermediários (pessoas e demais animais) após ingerirem água ou alimentação crua/malpassada contaminados com os oocistos, estes irão se transformar em taquizoítas (forma infectante). Após esta ingestão, estes migram para tecidos neurais e musculares, passando para sua forma bradizoíta dentro dos cistos teciduais. Fonte: Instituto de Ciências Biomédicas – USP, 2013.

2.4.2 Infecção em humanos

Estima-se que um terço da população humana mundial esteja infectada por *T. gondii*. As manifestações clínicas mais visíveis são observadas em imunossuprimidos que tipicamente resultam em conversão de bradizoítos de volta ao estágio de taquizoítos, como em crianças, idosos e pacientes com HIV. Quanto à infecção congênita, decorrente da infecção primária no início da gestação, pode resultar em morte fetal e abortamento (WANG et al., 2017). É preciso ressaltar que a possibilidade de transmissão do agente é mais alta no último semestre de gestação, ocasionando sério comprometimento físico e mental nas crianças sobreviventes. Dentre as manifestações clínicas, maior destaque para miocardite, doenças oculares como retinocoroidite, coroidite, encefalite, hidrocefalia e calcificações cerebrais (DUBEY, 2002.; ROUATBI et al., 2018).

2.4.3 Infecção nos animais

Nos animais, a infecção por *T.gondii* adquire importância não somente por serem considerados reservatórios para o homem, mas também por causarem danos aos animais domésticos e de interesse econômico. Geralmente, *T. gondii* está presente nesses animais associados a outras doenças, pois este parasita tem caráter oportunista. Nos pequenos ruminantes, suínos e roedores ocorre apenas o ciclo extra-intestinal com proliferação de taquizoítas nos órgãos que, com a resposta imune, desenvolvem-se os cistos teciduais (DUBEY, 2008; FIALHO et al., 2009).

Em relação à transmissão transplacentária, problemas reprodutivos podem ser observados como a infecção do feto, abortos, interrupção da gestação, além de fetos natimortos. Lesões placentárias constituem um dos achados mais descritos de toxoplasmose congênita nos animais (SIMÕES et al., 2015).

A infecção por *T. gondii* em felinos ocorre a partir do ciclo enteroepitelial e, desta forma, as manifestações clínicas são muito raras. Infecções transplacentárias podem causar distúrbios reprodutivos como abortos ou nascimento dos filhotes com sintomas/sinais que podem evoluir ao óbito. São raros os casos de gatos que apresentam anorexia, depressão e morte súbita, sendo os sinais mais evidentes em gatos filhotes (DUBEY, 2008; FIALHO et al., 2009).

Em caninos, as manifestações gastrointestinais, respiratórias e neuromusculares podem acometer estes animais, principalmente associados ao vírus da cinomose. A toxoplasmose ocular foi descrita em cães pela inoculação experimental. Além de estudos sugerirem que cães podem agir na transmissão mecânica de *T. gondii*, transportando oocistos esporulados nos pelos, se tornando um risco para contaminação do homem, a presença do parasita nos cães pode indicar a circulação do mesmo no ambiente (FIALHO et al., 2009; LINDSAY, 1997; SIMÕES et al., 2015).

Nos caprinos e ovinos a infecção ocorre grande parte pela ingestão dos oocistos presentes nas pastagens ou a partir de vetores mecânicos (SIMÕES et al., 2015). O diagnóstico sorológico utilizado varia muito, principalmente devido à região e à idade dos animais. Nas criações de caprinos e ovinos, a presença da infecção por *T. gondii* causa perdas econômicas por abortos, mortes neonatais e embrionárias, reabsorção e mumificação (FIALHO et al., 2009). No estudo realizado por Silva et al. (2003), foi

possível observar que criações intensivas de caprinos leiteiros apresentaram uma elevada prevalência de anticorpos anti-*T.gondii*, com taxas de 54,05%.

2.4.4 Diagnóstico laboratorial

Devido à complexidade da doença, existem diversos tipos de métodos laboratoriais disponíveis para detecção de *T. gondii*, com variada sensibilidade e especificidade, sendo necessário reconhecer o momento provável da infecção para melhor escolha do teste laboratorial, considerando a cinética da infecção.

O primeiro teste utilizado para detecção de *T. gondii* foi à reação de Sabin-Feldman, considerada padrão-ouro que garantia elevada especificidade e sensibilidade no teste. Atualmente, este teste é pouco usado por ser uma reação que utiliza o parasito vivo o que pode gerar grandes problemas relacionados à biossegurança (KASPER et al., 2009).

Os testes imunofluorescência indireta (IFI) e aglutinação modificada (MAT) ainda são utilizados rotineiramente no diagnóstico de *T.gondii*. O teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tem sido adotado pelos laboratórios de análises clínicas brasileiras, quando comparados entre si e com o teste padrão-ouro (Sabin-Feldman, 1948). Assim, as diferentes técnicas para detecção de IgM revelam sensibilidades relativas entre 90% e 100%, aproximadamente, e especificidades entre 75% e 95% (AMENDOEIRA & CAMILLO-COURA, 2010; KASPER et al., 2009).

Em casos de gestantes, o diagnóstico deve ser realizado logo na primeira consulta durante o pré-natal, a fim de detectar o mais rápido possível os casos de infecção aguda, com a avaliação de anticorpos da classe IgM e IgG. A ausência desses anticorpos significa que a mulher é suscetível e pode adquirir infecção enquanto que a presença de reatividade por IgG reflete uma infecção passada, não representando, assim, um risco na gestação, exceto se a mãe for imunossuprimida. As pacientes podem apresentar títulos de anticorpos da classe IgM residuais por até 18 meses após a primo-infecção (SIMÕES et al., 2015).

A RIFI é um teste sorológico que detecta anticorpos da classe IgG e IgM, utilizando lâminas contendo taquizoítos fixados. As amostras contendo anticorpos anti-*T. gondii* apresentarão reatividade, após contato com conjugado com fluoresceína, utilizando um microscópio de imunofluorescência. Alguns pontos críticos é a dificuldade em encontrar alguns conjugados para algumas espécies e pode haver possibilidades de

reação cruzada com fator reumatóide e anticorpos antinucleares (LIU et al., 2015). Além disso, a RIFI possui sensibilidade de 95% (JOBIM & SILVA, 2004), utilizado para inquérito sorológico e diagnóstico de infecção adquirida. Nos adultos e neonatos podem ocorrer resultados falso-positivos nos testes de IFI-IgM, uma vez que as amostras dos soros contenham fator reumatoide, responsável pela falsa reatividade. Assim, com o uso de um adsorvente para fator reumatoide disponível no comércio é possível eliminar resultados falso-positivos e somente amostras com anticorpos da classe IgM *anti-T.gondii* serão consideradas positivas (AMENDOEIRA & CAMILLO-COURA, 2010).

Quanto ao método de aglutinação modificada (MAT), amplamente utilizado pelos laboratórios de referência, os taquizoítos de *T. gondii* são fixados em formalina e adicionados em placas de microtitulação em forma de U. As amostras que forem reativas produzirão uma fina esteira/ tapete de aglutinação, enquanto as amostras negativas irão produzir um sedimento compacto de taquizoítos precipitados no fundo do poço. Resultados falso-negativos podem ocorrer durante estágios iniciais da toxoplasmose aguda. Os resultados podem diferir dependendo do conservante que for utilizado na reação. Assim, por exemplo, se a acetona for utilizada no lugar da formalina, é possível identificar anticorpo da classe IgG na infecção aguda, o que torna este procedimento muito útil no diagnóstico da toxoplasmose em pacientes imunossuprimidos. O MAT é simples e preciso, sendo conveniente tanto para diagnóstico laboratorial quanto para pesquisa epidemiológica (LIU et al., 2015).

Na técnica de ELISA, o marcador da reação imunológica detecta várias classes de anticorpos (IgM, IgG, IgA, IgE) e permite que os soros de vários pacientes sejam examinados de uma só vez, utilizando um equipamento chamado espectrofotômetro para realização da leitura, que na formação do complexo imune exibe uma reação colorida indicando se o teste foi positivo ou negativo. São utilizados extratos, fragmentos ou proteínas recombinantes do parasito fixados em poços das placas, para mensurar anticorpos com uma anti-imunoglobulina humana específica contra o isotipo de interesse (IgG, IgM, IgA). A técnica de ELISA possui algumas variações do teste original, como ELISA-IgM de captura, em que os anticorpos antinucleares e o fator reumatóide não interferem, o método de *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELISA) e o MEIA–*Microparticle Enzyme Immuno Assay* (AMENDOEIRA & CAMILLO-COURA, 2010; MARQUES et al., 2015).

O teste de avidéz IgG *anti-T. gondii* é extremamente importante no diagnóstico de gestantes, visto que é possível diferenciar a toxoplasmose aguda da toxoplasmose com alguns meses de evolução. Os títulos de anticorpos IgM aumentam rapidamente após infecção aguda, posteriormente declinam, podendo persistir por um ano ou mais na circulação, possibilitando que testes apresentem resultado falso-positivo para IgM (infecção aguda). Valores elevados de avidéz de IgG indicam infecção ocorrida em período superior de 12-16 semanas. O teste de avidéz clássico é realizado pelo teste de ELISA (AMENDOEIRA & CAMILLO-COURA, 2010; PENA & DISCACCIATI, 2013).

Atualmente, as técnicas moleculares estão sendo cada vez mais utilizadas. A PCR confere grande especificidade e sensibilidade no resultado principalmente na confirmação nas amostras de pacientes imunossuprimidos e a partir do líquido amniótico (GRANATO & JUNIOR, 2014), considerando, no entanto, as limitações quanto à idade gestacional das mães para confirmação da infecção por *T. gondii*. A PCR em tempo real consegue quantificar o DNA, fato que possibilita o acompanhamento do tratamento dos pacientes. As limitações maiores das técnicas moleculares é a padronização, principalmente dos *primers* para que a técnica possa ser utilizada mais comumente nas rotinas de investigação para toxoplasmose (AMENDOEIRA & CAMILLO-COURA, 2010; LIU et al., 2015; MARQUES et al., 2015).

2.4.5 Tratamento

Em relação aos animais de companhia como cães e gatos, a droga de escolha é o cloridrato de clindamicina, administrado por via oral e/ou parenteral, sendo indicado no tratamento de fêmeas gestantes. Doses altas em gatos demonstraram toxicidade com efeitos colaterais como anorexia, vômitos e diarreia (NEGRI et al., 2008; FIALHO et al., 2009; GALVÃO et al., 2014). Associação de pirimetamina com a sulfadiazina foi descrita eficaz contra taquizoítos, mas não contra bradizoítos, porém é bastante tóxica em gatos (NEGRI et al., 2008). Em equinos, o Ponazuril que é um composto anticoccídio, foi comprovado efeito satisfatório no tratamento da toxoplasmose (GALVÃO et al., 2014).

As gestantes que forem confirmadas com toxoplasmose deverão receber o tratamento específico da mãe com pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico, sendo este último essencial devido ao fato da pirimetamina ser um inibidor da síntese de ácido fólico

e, portanto, ser uma droga tóxica para a medula óssea. Considerando o fato de infecções nas fases mais tardias da gestação ser a fase mais crítica para a ocorrência da transmissão materno-fetal, deve-se fazer uma grande investigação diagnóstica quanto à presença de infecção fetal pelo protozoário. Alguns estudos descrevem a clindamicina como segunda opção de fármaco para mulheres com reação à pirimetamina (AMENDOEIRA & CAMILLO-COURA, 2010; HALONEN & WEISS, 2013). O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza o tratamento gratuito na rede pública.

O tratamento da toxoplasmose aguda adquirida não é necessário na criança assintomática. Quando ocorre o desenvolvimento da coriorretinite toxoplásmica o tratamento é o mesmo, independentemente de ser reativação ou aquisição recente da doença. A duração da terapia, associada ou não com corticoterapia, é guiada por frequentes exames oftalmológicos (FIALHO et al., 2009; MCAULEY, 2008).

A combinação de fármacos relatados anteriormente descrita é eficaz contra taquizoítos, mas não contra os bradizoítos no homem. A droga de eleição no tratamento dos cães é a clindamicina, podendo ser administrada intramuscularmente (FIALHO et al., 2009; SIMÕES et al., 2015).

2.4.6 Medidas profiláticas e controle

Produtos de abortos dos animais devem ser removidos do ambiente com luvas e incinerados, evitando que sejam ingeridos por gatos e outros animais de criação. As caixas higiênicas dos gatos deverão ser limpas diariamente utilizando luvas e a pá, evitando contato com os oocistos esporulados. O controle populacional dos gatos também é importante, principalmente nos locais com criação de animais para produção, bem como a responsabilidade dos tutores com seus animais domésticos.

O cozimento adequado dos alimentos, principalmente carne, tem se mostrado eficaz. Saneamento básico, com o consumo de água devidamente filtrada e ingestão de leite pasteurizado, também reduzem o risco de adquirir toxoplasmose.

Considerando as diversas formas de contaminação, uma das medidas mais eficaz é a educação em saúde, mantendo a higiene alimentar principalmente em mulheres gestantes e pessoas com imunidade comprometida, considerando também que não haja contato com fezes de gatos sem luvas e nem ingestão de carne crua ou malpassada.

Durante o acompanhamento do pré-natal recomenda-se que as mulheres se submetam a testes sorológicos antes da gravidez e, pelo menos, trimestralmente durante a gestação.

Não existe vacina comercial ainda para toxoplasmose humana, apenas para ovinos (Toxovax®) para reduzir o aborto e é produzida com taquizoítos da cepa acistogênica S48.

2.4.7 *Toxoplasma gondii* e primatas não humanos

Os hábitos alimentares dos PNHs têm sido correlacionados com infecções por *T. gondii*, principalmente em primatas neotropicais por terem hábitos arborícolas e por não terem contato com os felídeos e os oocistos de *T. gondii* durante sua evolução, tornando-os, assim, mais sensíveis à infecção. Na literatura, encontramos casos de surtos descritos em PNHs tanto de vida livre quanto de cativeiro (CASAGRANDE et al., 2013; EIPHANIO et al., 2000).

A infecção por *T. gondii* e PNHs está na literatura em diversos países do mundo. Um estudo realizado na China conseguiu identificar, a partir da técnica de aglutinação modificada (MAT), 1,4% das espécies de *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) soropositivos provenientes do Centro de Primatologia em Guangxi (LI et al., 2010). Já na Espanha, utilizando a mesma técnica, foi detectada uma soroprevalência de 25,4% em PNHs provenientes de oito zoológicos. Neste estudo, em relação à cinética de anticorpos, os autores conseguiram avaliar que alguns animais apresentaram um aumento no seu título de anticorpos, como nos PNHs da espécie *Pan troglodytes*, enquanto que outros animais apresentaram decréscimo na titulação de anticorpos, inclusive com a identificação de animais previamente positivos que evoluíram com soronegatividade (CANO-TERRIZA, 2019).

Um surto de toxoplasmose em PNH identificado no Japão, em 2011, se iniciou a partir de um caso com *Saimiri* sp. mantido em cativeiro. O PNH apresentou um quadro clínico caracterizado por tosse e tremor, culminando com óbito 48 horas depois. O método de aglutinação em látex, que foi a técnica utilizada neste estudo, resultou em negativo. Um mês após, com a ocorrência de mais um óbito de um animal, sem sinais clínicos, toda colônia foi testada e apenas um animal apresentou anticorpos anti-toxoplasma e que posteriormente evoluiu com um quadro de depressão seguido por óbito. Dez meses após o primeiro caso confirmado, outro PNH desenvolveu um quadro de taquipneia, tremor,

vindo a óbito dois dias após o início dos sinais clínicos. A análise histopatológica demonstrou macroscopicamente alterações principalmente nos pulmões, incluindo edema pulmonar (NISHIMURA et al., 2019) e foi possível isolar *T. gondii* do tecido cerebral.

Quanto à situação epidemiológica da infecção em PNHs pelo parasita no Brasil, um estudo realizado numa colônia de PNHs no RJ, demonstrou uma prevalência de 7,2% (-IgG-*T. gondii*) dos animais estudados, *Samiri* sp. em quatro faixas etárias e em ambos os sexos (OLIVEIRA, 2020). Muito pouco ainda tem sido descrito, mas os relatos em São Paulo, Rio de Janeiro, Pará, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul confirmam a presença do parasita nas diferentes espécies de PNHs, incluindo em alguns, casos de óbitos (EPIPHANIO et al., 2000; VALENTINI et al., 2004; PIRES et al., 2012; CASAGRANDE et al., 2013; MINERVINO et al., 2017; LEITE et al., 2008).

Mais recentemente um surto causado por *T. gondii* em PNHs dos gêneros *Alouatta*, *Brachyteles*, *Cacajao*, *Plecturocebus* foi detectado no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro com grande repercussão por conta da elevada letalidade (LEMOS, Comunicação pessoal, 2020).

Diante da escassez na literatura científica no Brasil a respeito do tema exposto, tanto em relação à proteobactéria *C. burnetii* quanto ao protozoário *T. gondii*, justifica-se o desenvolvimento do presente estudo cujo desenvolvimento poderá aumentar o nosso conhecimento sobre os agentes infecciosos que potencialmente possam estar associados a distúrbios reprodutivos nos PNHs mantidos em cativeiro no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, da Fundação Oswaldo Cruz, considerando e grande número de casos sem etiologia definida.

3. OBJETIVO GERAL

Pesquisar a infecção por *Coxiella burnetii* e *Toxoplasma gondii* em amostras de PNH fêmeas com e sem históricos de abortos, mantidas em cativeiro no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* e anti-*T. gondii* em amostras de soro das fêmeas de PNHs mantidas em cativeiro no ICTB.

- Detectar a presença do *DNA* de *C. burnetii* em amostras de sangue de fêmeas de PNHs mantidas em cativeiro no ICTB
- Gerar produto informativo com os principais agentes causadores de distúrbios reprodutivos em animais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico descritivo seccional com o objetivo de verificar a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* e anti-*T. gondii* utilizando teste sorológico da reação RIFI e a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a pesquisa de *C. burnetii* em amostras de sangue de fêmeas de PNHs, com e sem histórico de distúrbios reprodutivos, mantidas em cativeiro no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB.

4.2 Considerações éticas

Este projeto está inserido na Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA -Fiocruz – licença LW 5/16(ANEXO A).

4.3 Local de estudo

As amostras dos soros das fêmeas de PNHs foram coletadas durante o ano de 2019, no cativeiro do ICTB, localizados na Fiocruz (Figura 8) na cidade do Rio de Janeiro.

O manejo dos PNHs ocorre todos os anos normalmente entre abril e setembro, examinando linfonodos, aferindo temperatura, pesagem, biometria (normalmente tamanho de mão aberta e fechada direita, pés fechados direito, tamanho da cauda, circunferência de crânio...) são avaliados, com subsequente coleta de sangue não somente

para soroteca, mas também para avaliação de alguma anormalidade identificada no momento do manejo dos animais.

Alimentação dos PNHs mantidos no cativeiro é à base de ração seca (fracionada em duas vezes ao dia, na parte da manhã e a tarde) e ração úmida (hortifruti) com banana, jiló, maçã, laranja, berinjela, cenoura, pepino, batata doce, melão, melancia, manga, entre outros, fracionada na parte da tarde.

Quanto às gaiolas, a sua divisão não tem parâmetros exatos de quantidade de animais em cada gaiola, são chamados de “multi-machos” e “multi-fêmeas”, assim como também em relação ao sexo, com exceção dos *Saimiri* sp. que possuem essa divisão parcial, contendo apenas um macho vasectomizado na gaiola das fêmeas, para ficar no seu ambiente familiar. Registra-se que a colônia dos *Saimiri* sp. já não tem reprodução em média há dois anos.

Em relação à ocorrência de distúrbio reprodutivo (Tabela 1), diante de algum caso de aborto na colônia, a primeira hipótese causal levantada é consanguinidade, e posteriormente, as causas infecciosas passam a ser investigadas. Os animais/ materiais de abortos são encaminhados para necropsia caso tenham alguma suspeita de doença infecciosa, ou então, são descartados como material biológico, armazenados no freezer para posteriormente serem incinerados.

Tabela 1- Número total de primatas não humanos da colônia do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICTB). Dados referentes a 2019.

Espécie	Total de animais	Total de fêmeas	Total de fêmeas em idade reprodutiva	Fêmeas com distúrbios reprodutivos	Fêmeas sem distúrbios reprodutivos
<i>Macaca mulatta</i>	429	247	221	37	184
<i>Macaca fascicularis</i>	56	36	33	3	30
<i>Saimiri</i> sp.	123	76	67	0	0
TOTAL	608	359	321	40	214

Figura 8: Campus da Fiocruz, Manguinhos, identificando o setor de primatologia. Fonte: Dirac-Fiocruz; ScPrim- Fiocruz/ RJ.



A: Mapa do Campus Fiocruz em Manguinhos, destacando a primatologia dentro do campus. **B:** Sistema de criação dos Primatas não humanos/biotério de criação e experimentação. **C:** Recintos para *Macaca mulata* (Rhesus) criados na Fiocruz. Fonte: Dirac-Fiocruz; ScPrim- Fiocruz/ RJ.

4.4 Metodologia laboratorial

As amostras de soros das fêmeas, incluídas no estudo foram coletadas por meio de punção da veia femoral utilizando uma agulha 12 x 8 mm, após os animais terem sido sedados com Cetamina 10% (10mg/kg) e Midazolam 5mg/ml (0,1mg/kg), durante o manejo no Serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim). Todas as amostras de soro, em um volume entre 5 e 10 ml, foram subsequentemente armazenadas no freezer -80°C, no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses (LHR)/Fiocruz- RJ, onde foram processadas em instalações de nível de biossegurança 2 (NB2), localizado no Pavilhão Hélio e Peggy Pereira/FIOCRUZ- RJ para a pesquisa de infecção por *C.burnetii* e no Pavilhão Carlos Chagas, para *T.gondii*.

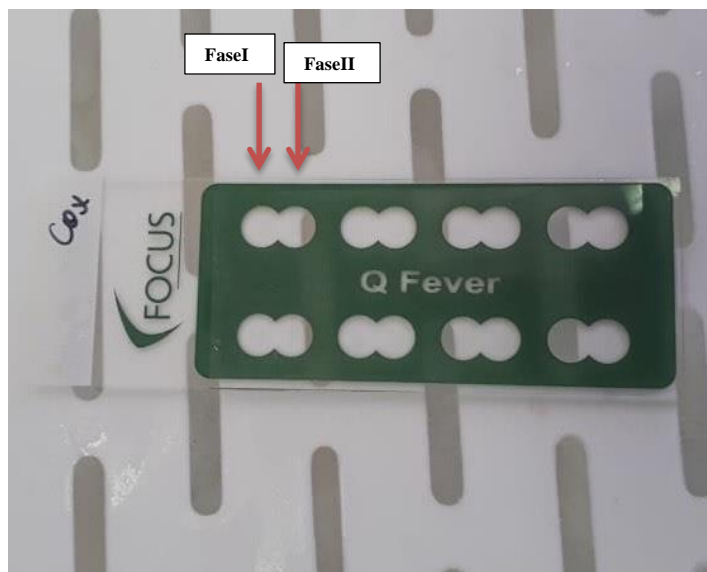
4.5 Teste sorológico

Todas as amostras de soro das fêmeas de PNHs, fornecidas pelo setor de primatologia (SCPrim), foram submetidas à reação de RIFI para a pesquisa de anticorpos anti-*C. burnetii* e anti-*T. gondii*. As análises para *C. burnetii* foram realizadas no LHR e para *T. gondii* no LabToxo (Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses), ambos localizados no campus da FIOCRUZ, no município do Rio de Janeiro.

4.5.1 Teste sorológico—*Coxiella burnetii*

A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*C. burnetii* foi realizada utilizando RIFI, de acordo com as recomendações do fabricante ScimedX[®] (Dover, NJ, USA), considerando como amostra reativa valores de titulação iguais ou superiores a 64. As lâminas de RIFI para febre Q contêm organismos purificados nas fases I e II distribuídos em dois microcírculos dispostos lado a lado dentro do poço da lâmina (Figura 9).

Figura9- Lâmina do teste comercial focus® utilizada para teste de imunofluorescência indireta para Febre Q com dois microcírculos dentro do poço contendo antígenos da fase I (microcírculos lado esquerdo) e fase II (microcírculos lado direito).



Fonte: Arquivo pessoal.

Com a RIFI foi realizado procedimento para a detecção de anticorpos IgG contra *C. burnetti* em amostras de soro. Para tal foram adicionados 30 μ L das amostras diluídas a 1:64 (diluição de triagem) no orifício da lâmina contendo antígeno *C. burnetti* fase I e fase II fixado, além dos controles positivos e negativos. Após incubação em câmara úmida, à temperatura aproximada de 37°C por 30 minutos, a lâmina foi lavada com tampão fosfato-salino (PBS) de lavagem (pH 9,0 \pm 0.2), com subsequente adição do anticorpo IgG anti-*monkey*(Bethyl®) e conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). A lâmina foi incubada novamente e, em sequência, após lavagem e aplicação de glicerina (pH 9,7 \pm 0.2) para montagem da lamínula, foi analisada em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 40x.

4.5.2 Teste sorológico “in house” – *Toxoplasma gondii*

4.5.2.1 Preparação do antígeno

O antígeno foi obtido do exsudato peritoneal de camundongos fêmeas, da linhagem *Swiss Webster*, com idade entre 25 e 30 dias. Estes animais são provenientes do ICTB- Fiocruz, que após serem infectados com a cepa RH de *T. gondii*, três ou quatro dias de infecção, foram submetidos à eutanásia. Em seguida, com a lavagem intraperitoneal nestes camundongos com 10 mL de solução tampão PBS estéril, foram retirados os taquizoítas. Este lavado foi inicialmente centrifugado a 1500 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos para a sedimentação de células e demais detritos em tubos de polipropileno de fundo cônico de 50 mL. Em seguida, o sobrenadante rico em taquizoítas foi transferido para um novo tubo de 50 mL e submetido a uma nova centrifugação de 4000 RPM por 10 minutos, para a concentração do parasito. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em formalina 2% para a inativação do parasito, por no mínimo 30 minutos e no máximo 24 horas. Após realização da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, onde a concentração de taquizoítas foi ajustada para a obtenção de cerca de 1×10^7 parasitos por mL, o antígeno foi armazenado em criotubos de 5mL para posterior sensibilização de lâminas.

4.5.2.2 Reação de imonofluorescência indireta

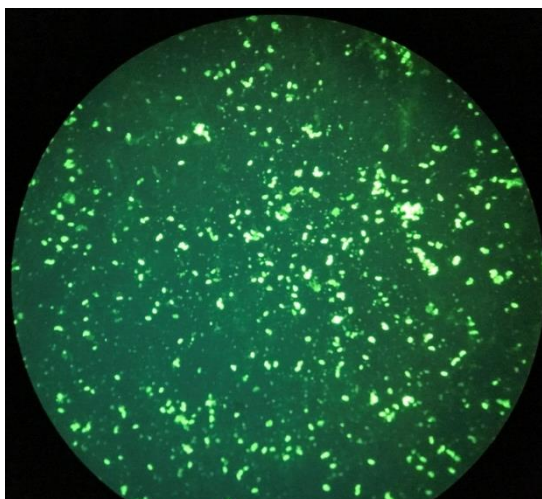
O antígeno preparado acima foi utilizado na sensibilização das lâminas de imonofluorescência limpas em solução de álcool éter. Em cada círculo/poço da lâmina foram colocados 10 μ L de antígeno, deixando-a secar em temperatura ambiente. A partir de uma placa com 96 poços foi realizada a confecção de um mapa de trabalho com a identificação das amostras a serem testadas e das amostras controles assim como todas as diluições.

Os soros das fêmeas de primatas foram diluídos em PBS nas diluições de 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 e 1:4096. Em seguida, 10 μ L das diluições foram distribuídos nas áreas sensibilizadas das lâminas, colocadas em câmara úmida e levadas à estufa a 37° C por uma hora. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS, por cinco

minutos e secadas ao ar livre. Na sequência, colocou-se o conjugado anti-IgG *monkey* com fluoresceína (SIGMA®), na diluição de 1:75 (previamente titulado), em solução de azul de Evans, este é diluído em PBS 1X na concentração de 0,1 mg% e tem a função de gerar um maior contraste entre a lâmina e a fluoresceína, facilitando a observação da fluorescência. Depois, se colocou uma gota de glicerina tamponada (pH=9,4) e a lamínula. Após 20 minutos, foram levadas para serem examinadas em microscópio de imunofluorescência, com objetiva de 40x.

Na avaliação das amostras positivas, o resultado final da leitura foi definido pela reação da última diluição em que ainda havia fluorescência completa na borda dos taquizoítas, em pelo menos 50% deles (Figura 10). A ausência de fluorescência ou apenas na extremidade dos parasitos (reação polar) foi considerada como reação negativa.

Figura 10-Lâmina de Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) reativa para *T. gondii*.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.6 Reação em cadeia da polimerase

4.6.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA as amostras de soro foram submetidas ao processo de extração de DNA, utilizando o kit comercial (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen®). A técnica consiste em inserir 200 µL de soro em tubos 1,5 ml com 20µL de proteinase K (8mg/mL) misturados no agitador e subsequentemente foi adicionado um volume de

200µl de tampão AL seguindo para uma etapa de homogeneização no vortex por 15 segundos e posteriormente incubados a 56°C no banho-maria por 1 hora utilizando o equipamento Thermomix, Eppendorf®. Em seguida, as amostras foram aplicadas em colunas, utilizando tampões de lavagem e de eluição e, com a ação da força centrípeta através de uma centrífuga, ocorre extração do material genômico, tanto do animal quanto do agente etiológico pesquisado, em um volume final de 100 µL. O produto da extração foi armazenado no congelador -20°C até seu processamento.

4.6.2 Procedimento de PCR convencional

Quanto à análise molecular, todas as amostras foram submetidas à PCR convencional exclusivamente para a pesquisa de *C. burnetii*. Utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *IS1111*: QBT 1 e 2 para a PCR1 e N3/N4 para a PCR2 (MARES-GUIA et al., 2017; ROZENTAL et al., 2017.;HOOVER et al., 1992; WILLEMS et al., 1994).

Para realização da PCR, houve preparo de uma reação que continha 1x de Tampão PCR 10 x, 10 µM de cada “primer” (IDT/Prodinol, Belo Horizonte, MG, Brasil), 50 mM MgCl₂, 200 µM mistura de dNTP (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato) e 0,1U de Platinum Taq DNA polimerase. (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), finalizando com água livre de nuclease (Promega, Madison, WI, EUA). O volume final da PCR era de 25µl (4 µl DNA para a PCR1 e 2 µl DNA para PCR2). Toda reação foi preparada com controle positivo e negativo, para validação da PCR.

4.6.3 Eletroforese em gel de agarose

Os resultados da amplificação puderam ser observados através da eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com solução de GelRed® (Biotium, Hayward, CA, USA) e cobertos com solução de TBE 0,5x (Figura 11). O peso molecular *100bp DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi usado como marcador. Todas as amostras foram homogeneizadas com Blue Juice® antes da aplicação no gel. A corrida foi realizada na voltagem de 100V. Os produtos amplificados foram visualizados em transluminador sob a luz ultravioleta e registrados em sistema digital para documentação de gel (CarestreamGelLogic System).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas 152 fêmeas de PNHs do SCPrim/ Fiocruz, com a inclusão de fêmeas com diversas faixas etárias (jovem, subadulto e adulto), independentemente do histórico de distúrbio de reprodução, em especial, da presença de história de abortos. Do total, 76, 23 e 53 eram, respectivamente, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* e *Saimiri* sp., cujas amostras de soros foram submetidas à análise sorológica para *C. burnetii* e *T. gondii*, utilizando o teste de imunofluorescência indireta.

5.1 Resultado da análise sorológica e molecular para pesquisa de *C. burnetii*

Todas as 152 amostras testadas para a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* foram não reativas, assim como foi negativa a detecção do *DNA* bacteriano, um resultado muito favorável, já que os PNHs incluídos no presente estudo fazem parte de uma população mantida em colônia/cativeiro em uma instituição que fornece animal para experimentação. É preciso registrar que um resultado positivo, principalmente em relação à análise molecular, levaria a prejuízos imensuráveis, considerando que, em consonância com as medidas adotadas em diversos surtos identificados em rebanhos no mundo, a recomendação seria a eutanásia dos animais infectados (DELSING et al., 2008; SCHNEEBERGER, et al., 2014; WHELAN et al., 2011). Adicionalmente, na eventualidade de se identificar coxielose no setor de primatologia do ICTB, além dos riscos da transmissão para a população humana, especialmente os profissionais que mantêm contato mais próximo, a capacidade de manutenção do agente no ambiente e de sua dispersão poderiam gerar surtos como ocorrido na Holanda, durante o período de 2007 a 2008, quando mais de 4000 casos na população humana foram confirmados, com dezenas de óbitos e mais de 50 mil cabras submetidas à eutanásia (BONTJE et al., 2016; DIJKSTRA et al., 2012; WHELAN et al., 2011).

Ainda em relação à análise molecular, realizada exclusivamente para a pesquisa de infecção por *C. burnetii*, o resultado obtido, *C. burnetii*-PCR negativo, está em consonância com o observado nos escassos estudos na literatura, pois, até a presente data, a detecção molecular de *C. burnetii* em PNHs se encontra restrita a estudos experimentais

como agente (NELSON et al., 2021; ELDIN et al., 2017.; GREGORY et al., 2019; METTERS et al., 2019), considerando, no entanto, a completa falta de investigação/pesquisa desta bactéria ubíqua neste grupo de animais.

Dentro deste contexto, é preciso vigilância e monitoramento desta bactéria, um agente de seleção nível 2 /categoria B bioterrorismo, com a inclusão do controle sorológico de PNHs visto que tem sido identificado no RJ, causando febre Q e coxielose (LE MOS et al., 2011; ROZENTAL et al., 2012; MARES-GUIA et al., 2014). Além disso, conforme comentado previamente, *C. burnetii* possui uma forma *sporo-like* que se torna extremamente resistente no ambiente, com uma grande capacidade de dispersão e um amplo espectro de espécies de animais que podem ser infectados (ELDIN et al., 2017). Desta forma, mesmo diante de um resultado sorológico e molecular negativo para *C. burnetii*, é preciso alertar sobre a possibilidade de ocorrência da coxielose nos diversos grupos de animais, incluindo os PNHs, principalmente em decorrência da presença de distúrbios reprodutivos em regiões onde a ocorrência de casos confirmados de febre Q, como no Rio de Janeiro, vem sendo registrada nos últimos 15 anos. De fato, é preciso considerar que o agente somente será identificado, a partir do conhecimento do profissional que, diante de casos de distúrbios reprodutivos, levantará suspeição, possibilitando conseqüentemente a instituição de medidas que possam, o mais precocemente, controlar a transmissão deste agente entre animais e a população humana assim como a sua eliminação no ambiente:-

5.2 Resultado da análise sorológica para pesquisa de *T. gondii*

A partir da análise sorológica para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi possível identificar sete (07) amostras sororreativas: (i) duas da espécie de *Cynomolgus* - *M. fascicularis* (Tabela 2 e Figura 10), (ii) uma da espécie *Samiri* sp.e (iii) quatro da espécie *M. mulatta*, um resultado concordante com os descritos por Epiphanyo et al. (2000), Casagrande et al. (2013), Leite et al. (2008), Minervino et al. (2017), Pires et al. (2012), Valentini et al. (2004), que identificaram infecção por *T. gondii* em amostras de PNHs tanto de cativeiro quanto de vida livre.

As quatro fêmeas sororreativas da espécie *M. mulatta* (Rhesus) possuíam histórico de fetos natimortos. Duas fêmeas compartilhavam a mesma gaiola (6B), onde se encontrava uma fêmea com dois abortos em duas gestações e outra com histórico de um

aborto em quatro gestações, considerando uma colônia de 37 fêmeas desta espécie com histórico de distúrbios reprodutivos (Tabela 1). Em concordância com o estudo de Cano-Terriza, 2019 que correlacionou grande parte dos animais encontrados reativos para *T. gondii* com as fêmeas adultas, alertando para o maior risco de infecção congênita por *T. gondii* em PNH (CANO-TERRIZA, 2019), os resultados obtidos no presente estudo em que foram identificadas sete fêmeas sororreativas reforça este alerta e para a necessidade de incluir *T. gondii* na rotina do manejo de primatologia.

É preciso ressaltar que algumas fêmeas sororreativas não tinham qualquer histórico de distúrbio reprodutivo, um evento frequente já que a maioria dos animais infectados pelo protozoário apresenta a forma assintomática (CANO-TERRIZZA, 2019).

Tabela2-Amostras de fêmeas de primatas não humanos, do serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim) mantidas em cativeiro no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB). Reativas para *Toxoplasma gondii*.

Família	Espécie	Nº de amostras analisadas	Nº reativas <i>T. gondii</i>	Total de fêmeas em idade reprodutiva	Fêmeas com distúrbios reprodutivos	Fêmeas sem distúrbios reprodutivos
Cercopithecidae	<i>Macaca fascicularis</i> ¹	20	2	221	37	184
Cercopithecidae	<i>Macaca mulatta</i> ²	77	4	33	3	30
Cebidae	<i>Saimiri</i> sp. ¹	55	1	67	0	0
TOTAL		152	7	321	40	214

¹Adulto, sem histórico de distúrbio reprodutivo.

²Adulto, com histórico de distúrbio reprodutivo

Fonte: Produzida pelo autor.

A sororreatividade identificada nos animais da espécie *M. facicularis* e *M. mulatta* pode estar relacionada com alimentação, considerando que quanto maior o animal, maior é a quantidade de alimento que ele ingere. Este alimento, pode conter uma maior quantidade de oocistos de *T. gondii*, aumentando, assim, a possibilidade de infecção por este protozoário. Outro fato que precisa ser ressaltado é que não podemos descartar a presença de felídeos nas colônias, já que os mesmos podem eliminar suas fezes nos recintos contendo oocistos de *T. gondii*, contaminando, desta forma o ambiente. Este fato reforça a importância no treinamento dos tratadores, para evitar que ocorra contaminação cruzada assim como a necessidade de impedir o acesso dos gatos aos recintos dos PNHs (CASAGRANDE et al., 2013; CARNEIRO et al., 2014).

Quanto à análise molecular para a pesquisa de *T. gondii*, não foi possível a sua realização e, assim, faz-se necessário o desenvolvimento de mais estudos com base na análise molecular não somente em amostras das PNHs fêmeas, mas também nos produtos de concepção, do aborto e fetais que possibilitem, de forma robusta, confirmar a etiologia não apenas do protozoário *T. gondii*, mas também de qualquer outro agente infeccioso que possa estar associado a distúrbios de reprodução.

Em relação aos outros patógenos que podem ocasionar danos aos fetos de colônias ao ar livre, através da transmissão vertical, é necessário ressaltar a bactéria *Listeria monocytogenes*, cuja capacidade de atravessar a barreira placentária pode determinar abortos espontâneos, inflamações uterinas, sofrimento fetal, fetos natimortos, parto prematuro, infecção disseminada em neonatos, mesmo quando tratada com antibióticos (LAMOND & FREITAG, 2018; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2017; WOLFE et al., 2019).

Brucella sp é outro grupo de patógeno associado com distúrbio reprodutivo, considerando que estudos experimentais com este agente comprovam a ocorrência de abortos em PNHs. *Brucella papionis*, por exemplo, está associada a infecções em natimortos, ao infectar trofoblastos de PNHs, além de colonizar a placenta, tornando-se uma infecção de elevada gravidade (GARCÍA-MÉNDEZ et al., 2019). Estudos com PNHs com infecções experimentais por *Brucella* spp são encontrados, diferente da proteobactéria *C. burnetii*, mais frequentemente na literatura, principalmente por ser um excelente biomodelo para investigar desordens reprodutivas (HOLLAND et al., 1990; SILVA et al., 2011; RUSSELL-LODRIGUE et al., 2018).

Em relação ao gênero *Brucella*, Schlabritz-loutsevitch et al. (2009) descreveram, pela primeira vez, um novo isolado associado a morte neonatal de babuínos. Embora o isolado apresentasse características consistentes com qualquer espécie de *Brucella* previamente descrita, mais estudos ainda são necessários para uma melhor caracterização bacteriana.

Diante do exposto, de forma complementar e oportuna, mesmo que não estejam diretamente associados com distúrbios reprodutivos, é pertinente registrar a possibilidade de infecção por outros agentes infecciosos nos PNHs mantidos em colônias que podem ocasionar eventualmente distúrbios reprodutivos. Assim, temos a bactéria *Shigella* (LOUREIRO & CARVALHO, 1984), bactéria Gram-negativa associada com surto de gastroenterite hemorrágica e fungo causando surto de coccidioomicose (KOINSTINEN et al., 2018) em PNHs caracterizado por um quadro de dispnéia letárgica e outras alterações neurológicas.

Quanto aos agentes definidos como emergentes e reemergentes em PNHs, mantidos em ambientes experimentais, um levantamento realizado por Mansfield e Bailey (2010), foi possível identificar os seguintes agentes: *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias atípicas, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Clostridium piliforme*, *Bacillus anthracis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter* e *Bartonella quintana* (MANSFIELD & BAILEY, 2010).

Mais recentemente, na África, outro estudo mostrou que a estreita relação filogenética entre humanos e PNHs cria um grande potencial para epizootias e enzootias, considerando a possibilidade da transferência de agentes infecciosos da espécie humana para os PNHs como *Treponema* spp., *Mycobacterium* spp., *Acinetobacter* spp. e *Leptospira* spp (MEDKOUR et al., 2021).

Por fim, diante de distúrbios reprodutivos, diversas etiologias devem ser investigadas, principalmente às associadas com agentes infecciosos, tornando essencial um adequado monitoramento com o principal objetivo de evitar a perda ou comprometimento sanitário do animal. Esta preocupação deve permear todos os serviços que mantêm animais em cativeiro e no caso especificamente dos PNHs, que são utilizados nos projetos de pesquisas de importância para saúde pública e saúde animal, em decorrência, entre outros importantes fatores, por sua grande relevância genética e pela necessidade de gerar descendentes saudáveis que possibilitem a manutenção da colônia. Sendo assim, reforça-se o quanto é importante a exclusão de fatores infecciosos como

causa principal dessas fêmeas mantidas em cativeiro que apresentam desordens reprodutivas, principalmente se estas fêmeas se encontram em áreas onde existam casos humanos e de infecção em animais domésticos e silvestres por *C.burnetii* e *T.gondii*. No entanto, é preciso considerar outras possibilidades etiológicas, não somente as infecciosas, mas também as relacionadas com o manejo incorreto, consanguinidade e estresse.

6. PRODUTOS GERADOS

Considerando principalmente sobre a existência de diversos agentes, além da importância em sensibilizar os profissionais que executam atividade com PNHs, sobre os distúrbios de reprodução, pois existem diversos agentes zoonóticos associados a esses quadros, foram desenvolvidos dois produtos que seguem descritos abaixo:

6.1. O artigo submetido à publicação (APÊNDICE B)

Diante de um contexto geral, foi elaborado um artigo de revisão sobre agentes infecciosos e desordens reprodutivas em primatas não humanos usados como biomodelos na experimentação animal, este artigo já foi submetido à publicação para a Revista Brasileira de Reprodução Animal (RBRA).

6.2 Folheto (Folder) (APÊNDICE C)

Considerando a necessidade e a importância de divulgar e sensibilizar os profissionais que manipulam animais quanto aos distúrbios reprodutivos causados por agentes infecciosos em PNHs, foi desenvolvido um folder informativo com os principais agentes infecciosos de origem bacteriana: *C. burnetii*, *Brucella* sp. e *Mycoplasma* sp., além do protozoário, *T. gondii*. Assim, com o objetivo de auxiliar no controle dos

distúrbios reprodutivos e do estado sanitário dos PNHs mantidos no cativeiro do ICTB, neste folder são abordados os seguintes itens: a etiologia do agente, o mecanismo de transmissão, as manifestações clínicas no folder e as medidas preventivas.

7. CONCLUSÕES

- Embora não tenha sido possível detectar anticorpos anti- *C. burnetii* e o DNA nas amostras avaliadas dos PNHs, a inclusão na investigação deste agente na rotina de animais mantidos em cativeiro deve ser considerada na presença de distúrbios reprodutivos, diante da identificação de casos e surtos de febre Q assim como animais domésticos e silvestres infectados no estado do Rio de Janeiro;
- A identificação de PNHs sororreativos para *T. gondii*, sem histórico de abortos, sugere que o animal possa ser portador do parasito, sem manifestações clínicas, fato que pode interferir nos resultados de uma experimentação com PNH;
- Duas fêmeas da espécie *M. mulatta* que foram sororreativas para *T. gondii* e ambas tinham histórico de desordens reprodutivas, compartilhavam a mesma gaiola, fato que sugere ser este recinto a fonte de infecção, chamando atenção sobre a importância da higienização dos alimentos, bem como monitoramento da época reprodutiva destas fêmeas e a realização de exames preliminares antes da gestação;
- As quatro fêmeas que foram *T.gondii*-sororreativas tinham histórico de desordens reprodutivas, reforçando assim, a importância de se incluir o monitoramento destes animais, principalmente se compartilham o mesmo recinto, quanto à infecção por este parasita como o agente causador;
- A presença de PNHs com anticorpos anti-*T. gondii* pode estar relacionada com os hábitos alimentares destes animais, já que uma das fontes de infecção pode se dar pela alimentação crua;
- Os resultados obtidos apontam para a necessidade de sensibilizar os profissionais técnicos, que trabalham com PNHs, quanto à possibilidade de distúrbios reprodutivos estarem associados com infecção, principalmente com agentes como *T. gondii* e *C. burnetii*, agentes infecciosos que se mantêm no ambiente e acometem um grande número diverso de animais.

REFERÊNCIAS

ABIRI, Z.; KHALILI, M.; RAD, M.; SHARIFI, H. Detection of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of cattle and sheep using Polymerase Chain Reaction Assay in Mashhad City, Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, v.4, n. 1. 2016.

AL GARCÍA-PÉREZ, A.L.; ASTOBIZA, I.; BARANDIKA, J.F.; ATXAERANDIO, R.; HURTADO, A.; JUSTE, R.A. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *Journal of Dairy Science*, v.92, ed. 4, p.1581-1584, 2009.

AL-ADHROEY, A.H., MEHRASS, A.A.O.; AL-SHAMMAKH, A.A.; ALI, A.D.; AKABAT, M.Y.M.; AL-MEKHLAFI, H.M. Prevalence and predictors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women from Dhamar, Yemen. *BMC Infectious Diseases*, 2019.

ÁLVAREZ-ALONSO, R.; BARANDIKA, J.F.; RUIZ-FONS, F.; ORTEGA-ARAIZTEGI, I.; JADO, I.; HURTADO, A.; GARCÍA-PÉREZ, A.L. Stable levels of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy sheep flocks but changes in genotype distribution after a 10-year period in northern Spain. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2018.

AMENDOEIRA, M.R.R.; CAMILLO-COURA, L.F. A brief review on toxoplasmosis in pregnancy. *Scientia Medica*, v. 20, 2010.

AMENDOEIRA, M.R.R.; COSTA, T.; SPALDING, S.M. *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques*, v. 1, 1999.

ANDERSON, A.O. Operation Whitecoat 1954-73: Ethical use of human subjects in infectious disease research, 2013.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R. S. de. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. *E-Book*. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2020.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Emergence of Q fever. *Iranian Journal of Public Health*, v.40, n. 3, 2011.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Review Q fever. *Veterinary Microbiology*, v. 140, 2010.

ARRICAU-BOUVERY, N.; SOURIAU, A.; LECHOPIER, P.; RODOLAKIS, A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research*, v.34, n. 4, p. 423-433, 2003.

ARRICAU-BOUVERY, N.; RODOLAKIS, A. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Veterinary Research*, v. 36, 2005.

BARKER, E.N.; HELPS, C.R.; NEIMARK, H.; PETERS, I.R.; PETERS, W.; TASKER, S. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears. *Veterinary Microbiolog*, 2011.

BENTES, G.A.; GUIMARÃES, J.R.; VOLOTÃO, E.M.; FIALHO, A.M.; HOOPER, C.; GANIME, A.C.; GARDINALI, N.R.; LANZARINI, N.M.; SILVA, A.S.; PITCOVSKI, J.; LEITE, J.P.; PINTO, M.A. Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) as an experimental infection model for human group A Rotavirus. *Viruses*, v. 10, 2018.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 3. ed. New York: Springer, 2013. p. 392

BLADER, I.J.; COLEMAN, B.I.; CHEN, C.; GUBBELS, M.J. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annual Review of Microbiology*, 2015.

BONTJE, D.M.; BACKER, J.A.; HOGERWERF, L.; ROEST, H.I.J.; VAN ROERMUND, H.J.W. Analysis of Q fever in Dutch dairygoatherds and assessment of control measures by means of a transmission model. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 123, p. 71-89, 2016.

BRADY, A.G. Research techniques for the Squirrel Monkey (*Saimiri* sp.). *ILAR Journal*, v. 41, 2000.

BRANDÃO, H.; VALE, L.; CHRISTÓVÃO, D. Investigações sobre a febre Q em São Paulo. I. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, v.7, 1953.

CABASSI, C.S.; TADDEI, S.; DONOFRIO, G.; GHIDINI, F.; PIANCASTELLI, C.; FLAMMINI, C.F.; CAVIRANI, S. Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *New Microbiologica*, v.29, p. 211-214, 2006.

CANO-TERRIZA, D.; ALMERÍ, S.; CABALLERO-GÓMEZ, J.; DÍAZ-CAO, J.M.; JIMÉNEZ-RUIZ, S.; DUBEY, J.P.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive nonhuman primates in zoos in Spain. *Journal of Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 2019.

CARNEIRO, B.F.; MIRANDA, M.M.; SILVEIRANETO, O.J.; LINHARES, G.F.C.; ARAÚJO, L.B.M. Inquérito sorológico para *Toxoplasma gondii* em mamíferos neotropicals mantidos no centro de triagem de animais silvestres, Goiânia, Goiás. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 43, 2014.

- CARVALHO, L.G. *Macacos Cynomolgus (Macaca fascicularis) como modelo experimental para infecção com Vírus da Hepatite E (genótipo 3)*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)–Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.
- CASAGRANDE, R.A.; SILVA, T.C.E.; PESCADOR, C.A.; BORRELLI, V.; SOUZA JR, J.C.; SOUZA, E.R.; TRAVERSO, S.D. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, 2013.
- CEYLAN, E.; BERKTAS, M.; KELES, I.; AGAOGLU, Z. Seroprevalence of Q Fever in cattle and sheep in the East of Turkey. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.4, 3. ed., p. 114-121, 2009.
- CONAN, A.; BECKER, A.A.M.J.; ALAVA, V.; CHAPWANYA, A.; CARTER, J.; ROMAN, K.; GALLAGHER, C.A. Detection of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and cattle on a veterinary campus in St. Kitts: Implications for one health in the Caribbean region. *One Health*, v.10, 2020.
- CRUZ, R.; ESTEVES, F.; VASCONCELOS-NÓBREGA, C.; SANTOS, C.; FERREIRA, A. S.; MEGA, C.; COELHO, A. C.; VALA, H.; MESQUITA, J. R. Outbreaks of abortions by *Coxiella burnetii* in small ruminant flocks and a longitudinal serological approach on archived bulk tank milk suggest Q fever emergence in Central Portugal. *Transboundary and Emerging Diseases Transboundary and Emerging Diseases*, v. 4. p. 972-975, 2018.
- DELSING, C.E.; KULLBERG, B.J. Q fever in the Netherlands: a concise overview and implication of the largest ongoing outbreak. *The Netherlands Journal of medicine*, v. 66, p.365-367, 2008.
- DERDOUR, S.-Y.; HAFSI, F.; AZZAG, N.; TENNAH, S.; LAAMARI, A.; CHINA, B.; GHALMI, F. Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. *Journal of Veterinary Research*, v.61, n. 3, p. 337-343, 2007.
- DERRICK, H. Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Medical Journal of Australia*, v. 2, 1937.
- DIJKSTRA, F.; VAN DER HOEK, W.; WIJERS, N.; SCHIMMER, B.; RIETVELD, A.; WIJKMANS, C.J.; VELLEMA, P.; SCHNEEBERGER, P.M. The 2007–2010 Q fever epidemic in the Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 64, n. 1, p. 3-12, 2012.
- DIXON, A.F. Callitrichid mating systems: laboratory and field approaches to studies of monogamy and polyandry. In: Rylands AB (Ed.). *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology*, 1993.

- DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii* –The first 100 years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 56, 2008.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- DUBEY, J.P.; GAMBLE, H.R.; HILL, D.; SREEKUMAR, C.; ROMAND, S.; THUILLEZ, P. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *The Journal of Parasitology*, v. 88, 2002.
- DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, v.38, 2008.
- EJERCITO, C.L.; CAI, L.; HTWE, K. K.; TAKI, M.; INOSHIMA, Y.; KONDO, T.; KANO, C.; ABE, S.; SHIROTA, K. SUGIMOTO, T.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H.; MINAMOTO, N.; KINJO, T.; ISOGAI, E.; HIRAI, K. Serological Evidence of *Coxiella burnetii* Infection in Wild Animals in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 29, n.3, p. 481–484, 1993.
- ELDINI, C.; MÉLENOTTE, C.; MEDIANNIKOV, O.; CHIGO, E.; MILLION, M.; EDOUARD, S.; MEGE, J.-L.; MAURIN, M.; RAOULT, D. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: A Paradigm Change. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, 2017.
- EPIPHANIO, S.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FEDULLO, D. L.; CORREA, S. H. R.; CATÃO-DIAS, J.L. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2000.
- ESMAEILI, S.; MOBAREZ, A.M.; KHALILI, M.; MOSTAFAVI, E.; MORADNEJAD, P. Genetic evidence of *Coxiella burnetii* infection in acute febrile illnesses in Iran. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2019.
- ESTADOS UNIDOS. Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention). *Diagnosis and Management of Q Fever*. Atlanta, Geórgia: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention), v. 62, n.3, 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/qfever/index.html>. Acesso em: 15 de março de 2020.
- FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, 2009.
- FERREIRA, M.S.; GUTERRES, A.; ROZENTAL, T.; NOVAES, R.L.M.; VILAR, E.M.; OLIVEIRA, R.C.; FERNANDES, J.; FORNEAS, D.; JUNIOR, A.A.; BRANDÃO, M.L.; CORDEIRO, J.L.P.; DEL VALLE ALVAREZ, M.R.; ALTHOFF, S.L.; MORATELLI, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; SILVA, R.D.C.; LEMOS, E.R.S.

Coxiella and *Bartonella* spp. in bats (Chiroptera) captured in the Brazilian Atlantic Forest biome. *BMC Veterinary Research*, v.14, p. 279, 2018.

FIALHO, C.G.; TEIXEIRA, M. C., ARAÚJO, F.A.P. Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2009.

FOURNIER, P.E.; MARRIE, T.; RAOULT, D. Minireview Diagnosis of Q Fever. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, 1998.

GALVÃO, A.L.B.; VACONCELLOS, A.L. de.; NAVARRO, I.T.; BRESCIANI, K.D.S. Aspectos da toxoplasmose na clínica de pequenos animais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 393-409, 2014.

GARCÍA-MÉNDEZ, K.B.; HIELPOS, S.M.; SOLER-LLORENS, P.F.; ARECE-GORVEL, V.; HALE, C.; GORVEL, J.P.; O'CALLAGHAN, D.; KERIEL, A. Infection by *Brucella melitensis* or *Brucella papionismodifies essential physiological functions of human trophoblasts*. *Wiley*, v.21, 2019.

GONDER, J.C.; KISHIMOTO, R.A.; KASTELLO, M.D.; PEDERSEN JR, C.E.; Larson, E.W.; Cynomolgus Monkey Model for Experimental Q Fever Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v.139, n. 2, 1979.

GOODMAN, M.; PORTER, C.A.; CZELUSNIAK, J.; PAGE, S.L.; SCHNEIDER, H.; SHOSHANI, J., GROVES, C.P. Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.9, 1998.

GRANATO, C.F.H.; PAULINI JUNIOR, I.J. *Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014. p. 127-135. *E-Book*. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/p2r7v/pdf/souza-9788575415719-11.pdf>. Acesso em: 26 de maio de 2020.

GREGORY, A. E.; VAN SCHAİK, E. J.; RUSSEL-LODRIGUE, K. E.; FRATZKE, A. P.; SAMUEL, J.E. *Coxiella burnetii* Intratracheal Aerosol Infection Model in Mice, Guinea Pigs, and Nonhuman Primates. *Infection and Immunity*, v. 87, 2019.

GUIMARÃES, M.A.B.V. Reproduction of non-human primates. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 31, 2007.

GUMBER, S.; NASCIMENTO, F.S.; ROGERS, K.A.; BISHOP, H.S.; RIVERA, H.N.; XAYAVONG, M.V.; DEVARE, S.G.; SCHOCHETMAN, G.; AMANCHA, P.K.; QVARNSTROM, Y.; WILKINS, P.A.; VILLINGER, F. Experimental transfusion-induced *Babesia microti* infection: dynamics of parasitemia and immune responses in a rhesus macaque model. *Transfusion*, v. 56, 2016.

GYSIN, J.; HOMMEL, M.; SILVA, L. P. da. Experimental infection of the squirrel monkey *Saimiri sciureus* with *Plasmodium falciparum*. *Journal Parasitology*, 1980.

HALONEN, S.K.; WEISS, L.M. Toxoplasmosis. In: GARCIA, H. H.; TANOWITZ, H. B.; DEL BRUTTO, O. H. (Eds.). *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdã: Elsevier, v. 114, 2013. p. 125-145.

HARRIS, A.B; LOCKARD, J.S. *Macaca fascicularis*: Alternative Epileptic Model. *Life Sciences*, v. 25, 1979.

HAZLETT, M. J.; MCDOWALL, R.; DELAY, J.; STALKER, M.; MCEWEN, B.; VAN DREUMEL, T.; SPINATO, M.; BRINNINGTON, B.; SLAVIC, D.; CARMAN, S.; CAI, H. Y. A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* infection concurrently with other major pathogens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, p. 359-368, abr. 2013

HOLLAND, S.M.; TAYLOR, H.R.; GAYDOS, C.A.; KAPPUS, E.W.; QUINN, T.C. Experimental infection with *Chlamydia pneumoniae* in nonhuman primates. *Infection and Immunity Journal*, v. 58, p. 593-597, 1990.

HONARMAND, H. Review Article - Q fever: An Old but Still a Poorly Understood Disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2012, 2012.

HOOVER, T.; VODKIN, M.; WILLIAMS, J. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *Journal of bacteriology*, v. 174, 1992.

HOWE, G. B.; LOVELESS, B. M.; NORWOOD, D.; CRAW, P.; WAAG, D.; ENGLAND, M.; LOWE, J. R.; COURTNEY, B. C.; PITT, M. L.; KULESH, D. A. Real-time PCR for the early detection and quantification of *Coxiella burnetii* as an alternative to the murine bioassay. *Molecular and Cellular Probes*, v. 23, n. 3-4, p. 127-131, jun./ago. 2009.

ICTB, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <https://www.ictb.fiocruz.br/content/primatas-nao-humanos>. Acesso em: 04 de março de 2020.

JOBIM, E. M.; SILVA, J. E. P. da. Toxoplasmose, uma doença congênita. *Saúde*, Santa Maria, v. 3, n. 1-2, p. 50-56, 2004.

JONES, J.L.; DARGELAS, V.; ROBERT, J.; PRESS, C.; REMINGTON, J.S.; MONTROYA, J.G. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, v. 6, 2009.

KARAGUL, M.S.; MALAL, M.E.; AKAR, K. Investigation of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* Antibodies in Sheep in Düzce Region. *Journal of Duzce University Health Sciences Institute*, v. 9, n. 3, p. 106-109, 2019.

KASPER, D. C.; PRUSA, A. R.; HAYDE, M.; GERSTL, N.; POLLAK, A.; HERKNER, K. R.; REITER-REISACHER, R. Evaluation of the VitroECiQ immunodiagnostic system for detection of anti-toxoplasma immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies for confirmatory testing for acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, p. 164-167, 2009.

KILIC, A.; KALENDER, H. A study of the correlation between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortions in sheep in Eastern and Southeastern Turkey. *Journal Of Animal Research*, v.50, 3. ed., p. 401-405, 2016.

KISHIMOTO, R.A.; GONDER, J.C.; JOHNSON, J.W.; REYNOLDS, J.A.; LARSON, E.W. Evaluation of a killed phase I *Coxiella burnetii* vaccine in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory Animal Science*, 1981.

KLEE, S.R.; TYCZKA, J.; ELLERBROK, H.; FRANZ, T.; LINKE, S.; BALJER, G.; APPEL, B. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology*, 2006.

KNAP, N.; ŽELE, D.; BIŠKUP, U.G.; AVŠLIČ-ŽUPAN, T.; VENGUŠT, G. The prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks and animals in Slovenia. *BMC Veterinary Research*, v.15, p. 368, 2019.

KOISTINEN, K.; MULLANEY, L.; BELL, T.; ZAKI, S.; NALCA, A.; FRICK, O.; LIVINGSTON, V.; ROBINSON, C.G.; ESTEP, J.S.; BATEY, K.L.; DICKJR, E.J.; OWSTON, M.A. Coccidioidomycosis in Nonhuman Primates: Pathologic and Clinical Findings. *Veterinary Pathology*, v.55, p. 6, 2018.

KREIZINGER, Z.; SZEREDI, L.; BACSADI, Á.; NEMES, C.; SUGÁR, L.; VARGA, T.; GYURANECZ, M. Occurrence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydiales* species in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary, Central Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.27, n. 2, p. 206-210, 2015.

LAMOND, N.M.; FREITAG, N.E. Vertical Transmission of *Listeria monocytogenes*: Probing the Balance between Protection from Pathogens and Fetal Tolerance. *Pathogens*, v.7, n. 52, 2018.

LEE, K.-H.; LEE, H.-K.; BAEK, K. -H.; OEM, J. -G.; KIM, H. -Y.; KEULEN, L.; BYUN, J. -W.; SO, B. -J.; CHOI, E. -J. Abortion Caused by *Coxiella burnetii* in a Cow and Goat in Korea. *Journal of Veterinary Science & Technology*, v.09, n. 2, p. 516, 2018.

LEITE, T.N.B.; MAJA, T. de A.; OVANDO, T.M.; CANTADORI, D.T.; SCHIMIDT, L. R.; GUÉRCIO, A.C.; CVALCANTI, Á.; LOPES, F.M. R.; CUNHA, I.A.L. da; NAVARRO, I.T. Occurrence of infection *Leishmania* spp. And *Toxoplasma gondii* in monkeys (*Cebus apella*) from Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, 2008.

LEMOS, E.; ROZENTAL, T.; MARES-GUIA, M.; ALMEIDA, D.; MOREIRA, N.; SILVA, R.; BARREIRA, J.; LAMAS, C.; FAVASCHO, A.; DAMASCO, P. Q fever as a cause of fever of Unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Disease*, 2011.

LEON, L.A.A.; MARCHEVSKY, R.S.; GASPAR, A.M.C.; GARCIA, R.C.N.C.; ALMEIDA, A.J.; PELAJO-MACHADO, M.; CASTRO, T.X.; NASCIMENTO, J.P.; BROWN, K.E.; PINTO, M.A. Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: no evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v.111, 2016.

LI, H. L.; YAN, C.; LI, J.; AI, L.; ZHOU, D. H.; YUAN, Z. G.; LIN, R. Q.; ZHAO, G. H.; ZHU, X. Q. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Bred Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) in China. *The Journal of Parasitology*, v.96, 2010.

LINDSAY, D.S. Feline toxoplasmosis and the importance of the *T. gondii* oocyst. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, v. 19, 1997.

LIU, Q.; WANG, Z.D.; HUANG, S.Y.; ZHU, X.Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 2015.

LLOYD, C.; STIDWORTHY, M.F.; ULRICH, W. *Coxiella burnetii* abortion in captive Dama gazelle (*Gazella dama*) in the United Arab Emirates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.41, n.1, p. 83-89, 2010.

LOREIRO, E.C.B.; CARVALHO, R.A. Surto de shigelose entre primatas não humanos mantidos em cativeiro. *Revista Latino-americana de microbiologia*, v.26, p. 305-308, 1984.

MA, G.C.; NORRIS, J.M.; MATHEWS, K. O.; CHANDRA, S.; Å LAPETA, J.; BOSWARD, K.L.; WARD, M.P. New insights on the epidemiology of *Coxiella burnetii* in pet dogs and cats from New South Wales, Australia. *Acta Tropica*, v.205, 2020.

MACÍAS-RIOSECO, M.; RIET-CORREA, F.; MILLER, M.M.; SONDEGROTH, K.; FRAGA, M.; SILVEIRA, C.; UZAL, F.A.; GIANNITTI, F. Bovine abortion caused by *Coxiella burnetii*: report of a cluster of cases in Uruguay and review of the literature. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 4, p. 634-639, 2019.

MACÍAS-RIOSECO, M.; SILVEIRA, C.; FRAGA, M.; CASAUX, L.; CABRERA, A.; FRANCIA, M.E.; ROBELLO, C.; MAYA, L.; ZARANTONELLI, L.; SUANES, A.; COLINA, R.; BUSCHIAZZO, A.; GIANNITTI, F.; RIET-CORREA, F. Causes of abortion in dairy cows in Uruguay. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.40, n. 5, p. 325-332, 2020.

MADARIAGA, M.; REZAI, K.; TRENHOLME, G.; WEINSTEIN, R. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infectious Diseases*, v. 3, 2003.

MAGOURAS, I.; HUNNINGHAUS, J.; SCHERRER, S.; WITTENBRINK, M.M.; HAMBURGER, A.; STÄRK, K.D.C.; SCHÜPBACH-REGUL, G. *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017.

MALAL, M.E.; KARAGÜL, M.S.; ATEŞOĞLU, A.; AKAR, K. Investigation of Q fever seroprevalence in cattle in turkey. *Journal Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, v.7, n.1, p. 98-102, 2021.

MANN, J.; DOUGLAS, J.; INGLIS, J.; LEITCH, A. Q fever: person to person transmission within a family. *Thorax*, v. 41, 1986.

MANSFIELD, K.; BAILEY, C. Emerging and Reemerging Infectious Diseases of Nonhuman Primates in the Laboratory Setting. *Veterinary Pathology*, v.47, p. 462-481, 2010.

MARES-GUIA, M. *Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro: um estudo sorológico e molecular em amostras humanas, de animais vertebrados e de artrópodes em área de ocorrência de caso*. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

MARES-GUIA, M.; GUTERRES, A.; ROZENTAL, T.; FERREIRA, M.; LEMOS, E. Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017

MARES-GUIA, M.; ROZENTAL, T.; GUTERRES, A.; GOMES, R.; ALMEIDA, D.; MOREIRA, N.; BARREIRA, J.; LEMOS, E.; FAVACHO, A.; SANTANA, A. Molecular identification of the agent of Q fever – *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, 2014.

MARQUES, B.A.; ANDRADE, G.M.Q.; NEVES, S.P.F.; PEREIRA, F.H.; TALIM, M.C.T. Revisão sistemática dos métodos sorológicos utilizados em gestantes nos programas de triagem diagnóstica pré-natal da toxoplasmose. *Revista Médica de Minas de Minas Gerais*, v. 25, 2015.

MATTISON, J.A.; VAUGHAN, K.L. An overview of nonhuman primates in aging research. *Experimental Gerontology*, 2016.

MAURIN, M.; RAOULT, D. Q Fever. *Clinical Microbiology*, v.12, 1999.

MCAULEY, J.B. Toxoplasmosis in Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v.27, 2008.

- MACCAUL, T.; WILLIAMS, J. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal Bacteriology*, v.147, 1981.
- MEDKOUR, H.; AMONA, I.; AKIANA, J.; LAIDOUDI, Y.; DAVOUST, B.; BITAM, I.; LAFRI, I.; LEVASSEUR, A.; DIATTA, G.; SOKHNA, C.; HERNANDEZ-AGUILAR, R.A.; BARCIELA, A.; GORSANE, S.; BANGA-MBOKO, H.; RAOULT, D.; FENOLLAR, F.; MEDIANNIKOV, O. Bacterial Infections in Humans and Nonhuman Primates from Africa: Expanding the Knowledge. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v, 94, p. 227-248, jun. 2021.
- METTERS, G.; NORVILLE, I.H.; TITBALL, R.W.; HEMSLEY, C.M. From cell culture to cynomolgus macaque: infection models show lineage-specific virulence potential of *Coxiella burnetii*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 1419-1430, ago. 2019.
- MINERVINO, A. H. H.; CASSINELLI, A. B. M.; SOUZA, A.J. S. de; ALVES, M.M.; SOARES, M. do C.P.; FERREIRA, D. A. C.; PEREIRA, W. L. A.; GENNARI, S.M. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive non-human primates in the Amazon region, Brazil. *Journal of Medical Primatology*, v. 46, n. 6, p.343-346, dez. 2017.
- MURRAY, J.; HAZLETT, M.J.; MCDOWALL, R.; DELAY, J.; STALKER, M.; MCEWEN, B.; DREUMEL, T. V.; SPINATO, M.; BINNINGTON, B.; SLAVIC, D.; CARMAN, S.; CAI, H.Y. A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydomphila abortus* infection concurrently with other major pathogens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.3, p. 359-368, 2013.
- NEGRI, D. D.; CIRILO, M. B.; SALVARANI, R. S.; NEVES, M. F. Toxoplasmose em cães e gatos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, ano 6, n. 11, 2008.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondii. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, v. 147, 1969.
- NIELSEN, S.Y.; HJØLLUND, N.H.; ANDERSEN, A.-M.N.; HENRIKSEN, T.B.; KANTSØ, B.; KROGFELT, K.A.; MØLBAK, K. Presence of Antibodies Against *Coxiella burnetii* and Risk of Spontaneous Abortion: A Nested Case-Control Study. *PLoS ONE*, v.7, cap. 2, 2012.
- NISHIMOTO-KAKIUCHI, A.; NETSU, S.; OKABAYASHI, S.; TANIGUCHI, K.; TANIMURA, H.; KATO, A.; SUZUKI, M.; SANKAI, T.; KONNO, R. Spontaneous endometriosis in cynomolgus monkeys as a clinically relevant experimental model. *Human Reproduction*, 2018.

NISHIMURA, M.; GOYAMA, T.; TOMIKAWA, S.; FEREIG, R.M.; EL-ALFY, E.N.; NAGAMUNE, K.; KOBAYASHI, Y.; NISHIKAWA, Y. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. *Parasitology International*, v.68, 2019.

OLIVEIRA, C.A. *Estudo de fatores de risco para a infecção por Toxoplasma gondii em primatas não humanos neotropicais Saimiri spp. no ICTB, Fiocruz, RJ, Brasil.* 2020. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

OLIVEIRA, G.M.S.; SIMÕES, J.M.; SCHAER, R.E.; FREIRE, S.M.; NASCIMENTO, R.J.M.; PINHEIRO, A.M.C.M.; CARVALHO, S.M.S.; MARIANO, A.P.M.; CARVALHO, R.C.; MUNHOZ, A.D. Frequency and Factors Associated With Toxoplasma Gondii Infection in Pregnant Women and Their Pets in Ilhéus, Bahia, Brazil. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.52, 2019.

OLIVEIRA, J.M.B.; ROZENTAL, T.; LEMOS, E.R.S.; FORNEAS, D.; ORTEGA-MORA, L.M.; PORTO, W.J.N.; FONSECA OLIVEIRA, A.A.; MOTA, R.A. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta Tropica*, v.183, p. 19-22, jul. 2018.

OLIVEIRA, J.M.B. de; ROZENTAL, T.; Lemos, E.R.S. de; FORNEAS, D.; ORTEGA-MORA, L.M.; PORTO, W.J.N.; Oliveira, A.A. da F.; MOTA, R.A. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta Trop*, v. 183, p. 19-22, 2018.

Oporto, B.; BARANDIKA, J. F.; HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; GARCÍA-PÉREZ, A. L. Incidence of Ovine Abortion by *Coxiella burnetii* in Northern Spain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1078, n. 1, p. 498-501, 2006.

OSUNA, C.E.; WHITNEY, J.B. Nonhuman Primate Models of Zika Virus Infection, Immunity, and Therapeutic Development. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, p.928-934, 2017. Suplemento 10.

PENA, L.T.; DISCACCIATI, M.G. Importância do teste de avidéz da imunoglobulina G (IgG) anti-*Toxoplasma gondii* no diagnóstico da toxoplasmose em gestantes. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 72, 2013.

PHILIP, C. Observations on experimental of Q fever. *The Journal of Parasitology*, v.34, 1948.

PIRES, J.S.; RIBEIRO, C.T.; FILHO, P.R.C.; PISSINATTI, A.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Infection by *Toxoplasma gondii* in Neotropical non-human primates. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, 2012.

PIZZI, H.L. *Toxoplasmosis*. 1. ed. Buenos Aires: Rhône Poulenc Rorer Argentina, 1997.

PORTELA, R.W.D.; BETHONY, J.; COSTA, M.I.; GAZZINELLI, A.; VITOR, R.W.A.; HERMETO, F.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, R.T. A Multihousehold Study Reveals a Positive Correlation between Age, Severity of Ocular Toxoplasmosis, and Levels of Glycoinositolphospholipid-Specific Immunoglobulin A. *Journal Infectious Diseases*, v.190, 2004.

PORTO, B.; BARANDIKA, J.; HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; GARCÍA-PEREZ, A.; PRITCHARD, G.C.; SMITH, R.P.; ERRINGTON, J.; HANNON, S.; JONES, R.M.; MEARNNS, R. Prevalence of *Coxiella burnetii* in livestock abortion material using PCR. *Veterinary Record*, v.169, n. 15, p. 391, 2011.

QUIJADA, S.G.; TERÁN, B.M.; MURIAS, P.S.; ANITUA, A.A.; CERMEÑO, J.L.B.; FRÍAS, A.B. Q fever and spontaneous abortion. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n.6, p. 533-538, 2012.

RAMALHO, A.; GUERRA, R.; MONGRUEL, A.; VIDOTTO, O.; LUCENA, R.; GUERRA, M.; VIEIRA, T.; VIEIRA, R. Mycoplasma sp. em macaco-prego-dourado (*Sapajus flavius*) do Estado da Paraíba. *Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública*, v.3, p. 40-43, 2016.

REICHEL, R.; MEARNNS, R.; BRUNTON, L.; JONES, R.; HORIZAN, M.; VIPOND, R.; VINCENT, G.; EVANS, S. Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. *Research in Veterinary Science*, v. 93, p. 1217-1224, 2012.

ROBAJ, A.; KRT, B.; AVBERŠEK, J.; OCEPEK, M.; KALAVESHI, A.; JAKUPI, X.; PLLANA, D.; SYLEJMANI, D.; ALISHANI, M.; RAMADANI, N.; HAMIDI, A. Infectious Abortions in Small Ruminants: Challenges for Diagnosis and Public Health. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, v.21, n. 6, p. 475-477, 2021.

RODRIGUES, R.C. *Ciclo reprodutivo de Macacos-prego (Cebus libidinosus) em cativeiro: Aspectos comportamentais e hormonais*. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

ROEST, H.I.J.; BOSSERS, A.; VAN ZIJDERVELD, F.G.; REBEL, J.M.L. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Veterinary Quarterly*, v.33, n. 3, p.148-160, 2013.

ROUATBI, M.; AMAIRIA, S.; AMDOUNI, Y.; BOUSSAADOUN, M.A.; AYADI, O.; AL-HOSARY, A.A.T.; REKIK, M.; ABDALLAH, R.B.; AOUN, K.; DARGHOUTH, M.A.; WIELAND, B.; GHARBI, M. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in North Africa: a review. *Parasite*, v.26, 2019.

ROUSSET, E.; BERRI, M.; DURAND, B.; DUFOUR, P.; PRIGENT, M.; DELCROIX, T.; RODOLAKIS, A. *Coxiella burnetii* Shedding Routes and Antibody Response after Outbreaks of Q Fever-Induced Abortion in Dairy Goat Herds. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n. 2, p. 428-433, 2009.

ROZENTAL, T.; MASCARENHAS, L.F.; ROZENBAUM, R.; GOMES, R.; MATTOS, G.S.; MAGNO, C.C.; ALMEIDA, D.N.; ROSSI, M.I.D.; FAVACHO, A.R. M.; LEMOS, E.R.S. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2012.

ROZENTAL, T.; FERREIRA, M.; GUTERRES, A.; MARES-GUIA, M.; TEIXEIRA, B.; GONÇALVES, J.; BONVICINO, C.; D'ANDREA, P.; LEMOS, E. Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil: Bartonella and Coxiella infections. *Acta Tropica*, v.168, 2017.

RUSSELL-LODRIGUE, K.E.; KILLEEN, S.Z.; FICHT, T.A.; ROY, C.J. Mucosal bacterial dissemination in a rhesus macaque model of experimental brucellosis. *Journal of Medical Primatology*, 2017.

SABIN, A.B. Toxoplasmosis: recently recognized disease. *Advances in Pediatrics*, 1942.

SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.E.; WHATMORE, A.M.; QUANCE, C.R.; KOYLASS, M.S.; CUMMINS, L.B.; DICK JR, E.J.; SNIDER, C.L.; CAPPELLI, D.; EBERSOLE, J.L.; NATHANIELSZ, P.W.; HUBBARD, G.B. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. *Journal of medical primatology*, 2008.

SCHNEEBERGER, P.M.; WINTENBERGER, C.; VAN DER HOEK, W.; STAHL, J.P. Q fever in the Netherlands - 2007-2010: what we learned from the largest outbreak ever. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v.44, p. 339-353, 2014.

SCHNYDRIG, P.; VIDAL, S.; BRODARD, E.; FREY, C.; POSTHAUS, H.; PERRETEN, V.; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Bacterial, fungal, parasitological and pathological analyses of abortions in small ruminants from 2012-2016. *Journal Schweiz Arch Tierheilkd*, v.159, n.12, p. 647-656, 2017.

SELIM, A.; ABDELRAHMAN, A.; THIÉRY, R.; SIDI-BOUMEDINE, K. Molecular Typing of *Coxiella Burnetii* From Sheep in Egypt. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 67, 2019.

SEO, M.-G.; OUH, I.-O.; LEE, S.-H.; KIM, J.-W.; RHEE, M. -H.; KWON, O.-D.; KIM, T.-H.; KWAK, D. Prevalence of *Coxiella burnetii* in cattle at South Korean national breeding stock farms. *PLoS One*, 2017.

SESHADRI, R.; PAULSEN, I.; EISEN, J.; READ, T.; NELSON, K.; NELSON, W.; WARD, N.; TETTELIN, H.; DAVIDSEN, T.; BEANAN, M.; DEBOY, R.; DAUGHERTY, S.; BRINKAC, L.; MADUPU, R.; DODSON, R.; KHOURI, H.; LEE,

K.; CARTY, H.; SCANLAN, D.; HEINZEN, R.; THOMPSON, H.; SAMUEL, J.; FRASER, C.; HEIDELBERG, J. Complete genome sequence of the Q fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v.100, 2003.

SHAPIRO, A.J.; NORRIS, J.M.; BOSWARD, K.L.; HELLER, J. Q Fever (*Coxiella burnetii*) Knowledge and Attitudes of Australian Cat Breeders and Their Husbandry Practices. *Zoonoses and Public Health*, v.64, n. 4, p. 252-261, 2017.

SILVA, A.V.; CUNHA, E.L.P.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; MOTA, R.A.; LANGONI, H. Sheep and goat toxoplasmosis: seroepidemiological study in two regions in the State of Pernambuco, Brazil. *Ciência Rural*, v. 33, 2003.

SILVA, T.M.A.; COSTA, E.A.; PAIXÃO, T.A.; TSOLIS, R.M.; SANTOS, R.L. Laboratory Animal Models for Brucellosis Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2011, p. 1-9, 2011.

SIMÕES, L.; FAVARON, P.; ANUNCIÇÃO, A.; MIGLINO, M.A. *Toxoplasma gondii* and pregnancy: Toxoplasmosis characteristics, clinical signs, diagnosis and the importance of the disease in public health – Review. *Revista Científica de medicina veterinária*, 2015.

SOUZA, E.A.R.; CASTRO, E.M.S.; OLIVEIRA, G.M.B.; AZEVEDO, S.S.; PEIXOTO, R.M.; LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C. Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v.27, p. 514-520, n.4, 2018.

SOUZA, I.V.; KUGELMEIER, T.; ANDRADE, M.; BENEDICTO, H. Aspectos morfológicos do útero de Macaco Rhesus (*Macaca mulatta* – zimmermann, 1780) em fêmeas nulíparas, primíparas e pluríparas. *RESBCAL- Revista de Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório*, v.4, 2016.

SOUZA RIBEIRO MIONI, M.; RIBEIRO, B.L.D.; PERES, M.G.; TEIXEIRA, W.S.R.; PELÍCIA, V.C.; MOTTA, R.G.; LABRUNA, M.B., RIBEIRO, M.G.; SIDI-BOUMEDINE, K.; MEGID, J. Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption. *Zoonoses and Public Health*. Hoboken: Wiley, v. 66, n. 6, p. 695-700, 2019.

SPRINGER, M.S.; MEREDITH, R.W.; GATESESY, J.; EMERLING, C.A.; PARK, J.; RABOSKY, D.L.; STADLER, T.; STEINER, C.; RYDER, O.A.; JANECKA, J.E.; FISHER, C.A.; MURPHY, W.J. Macroevolutionary Dynamics and Historical Biogeography of Primate Diversification Inferred from a Species Supermatrix. *Plosone*, v. 7, 2012.

STEFANETTI, V.; COMPAGNONE, A.; SORDINI, C.; PASSAMONTI, F.; RAMPACCI, E.; MOSCATI, L.; MARENZONI, M.L. Retrospective biomolecular investigation of *Coxiella burnetii* and *Leptospira* spp. DNA in cases of abortion, stillbirth

and neonatal mortality in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 33, n.4, p. 122-125, 2018.

STEIN, A.; LEPIDI, H.; MEGE, J. L.; MARRIE, T. J.; RAOULT, D. Repeated Pregnancies in BALB/c Mice Infected with *Coxiella burnetii* Cause Disseminated Infection, Resulting in Stillbirth and Endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*, v.181, n. 1, p. 188–194, 2000.

STEIN, A.; RAOULT, D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, 1992.

STOKER, M.G.; MARMION, B. P. The spread of Q fever from animals to man; the natural history of a rickettsial disease. *Bull World Health Organ*, v. 13, 1955.

VALENTINI, E.J.G.; CAPRARA, A.; SOUZA, S.L.P.; MATTARAIA, V.G.M.; GENNARI, S.M.; RODRIGUES, U.P.; FRANCISCO, F.M.; SOARES, R.M. Investigação sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* em colônia de macacos da espécie *Macaca mulatta*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.71, 2004.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KRYPTOTOU, E.; SCORTTI, M. Listeria Placental Infection. *BioJournal Homepage*, v. 8, n. 3, 2017.

VIDAL, S.; KEGLER, K.; GREUB, G.; AEBY, S.; BOREL, N.; DAGLEISH, M. P.; RODRIGUEZ-CAMPOS, S. Neglected zoonotic agents in cattle abortion: tackling the difficult to grow bacteria. *BMC Veterinary Research*, v.13, n. 1, p. 373, 2017.

WAAG, D.M.; BYRNE, R.; ESTEP, J.; GIBBS, P.; PITT, M.L.M.; BANFIELD, C.M. Evaluation of *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) and Rhesus (*Macaca mulatta*) Monkeys as Experimental Models of Acute Q Fever after Aerosol Exposure to Phase-I *Coxiella burnetii*. *Laboratory Animal Science*, v.49, 1999.

WAAG, D.M.; ENGLAND, M.J.; TAMMARIELLO, R.F.; BYRNE, W.R.; GIBBS, P.; BANFIELD, C.M.; PITT, M.L.M. Comparative efficacy and immunogenicity of Q fever chloroform:methanol residue (CMR) and phase I cellular (Q-Vax) vaccines in cynomolgus monkeys challenged by aerosol. *Journal & Books*, v. 20, 2002.

WANG, Z.-D.; LIU, H.-H.; MA, Z.-X.; MA, H.-Y.; LI, Z.-Y.; YANG, Z.-B.; ZHU, X.-Q.; XU, B.; WEI, F.; LIU, Q. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.

WEISBURG, W.; DOBSON, M.; SAMUEL, J.; DASCH, G.; MALLAVIA, L.; BACA, O.; MANDELCO, L.; SECHREST, J. E.; WEISS, E.; WOESE, C. R. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *Journal Bacteriology*, v.171, 1989.

WHELAN, J.; SCHIMMER, B.; SCHNEEBERGER, P.M.; MEEKELINKAMP, J.; VAN DER HOEK, W.; VAN BEEST HOLLE, M.R.-D.R.; IJFF, A.Q

Fever among Culling Workers, the Netherlands, 2009–2010.
Emerging Infectious Diseases Journal, v.17, n. 9, 2011.

WILDMAN, M.; SMITH, E.G.; GROVES, J.; BEATTIE, J.M.; CAUL, E.O.; AYRES, J.G. Chronic fatigue following infection by *Coxiella burnetii* (Q fever): ten-year follow-up of the 1989 UK outbreak cohort. *The Quarterly Journal of Medicine*, v.95, 2002.

WILLEMS, H.; THIELE, D.; FRÖLICH-RITTER, R.; KRAUSS, H. Detection of *Coxiella burnetii* in Cow's Milk using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 41, n. 1-10, p. 580-58, jan./dez. 1994.

WOLFE, B.; KERR, A.R.; MEJIA, A.; SIMMONS, H.A.; CZUPRYNSKI, C.J.; GOLOS, T.G. Sequelae of Fetal Infection in a Non-human Primate Model of Listeriosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.

ZANATTO, D.C.S.; GATTO, I.R.H.; LABRUNA, M.B.; JUSI, M.M.G.; SAMARA, S.I.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. *Coxiella burnetii* associada ao BVDV (Vírus da Diarréia Viral Bovina), BoHV (Herpesvírus Bovino), *Leptospira* spp., *Neosporacanthium*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma vivax* em distúrbios reprodutivos em bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.28, n. 2, p. 245-257, 2019.

ZANATTO, D. C. S.; DUARTE, J.M.B.; LABRUNA, M.B.; TASSO, J.B.; CALCHI, A.C.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in neotropical free-living cervids in South America. *Acta Tropica*, v.197, 2019.

ZARZA, S. M.; MEZOUAR, S.; MEGE, J.-L. From *Coxiella burnetii* Infection to Pregnancy Complications: Key Role of the Immune Response of Placental Cells. *Pathogens*, v. 10, p 627, 2021.

ZEMAN, D.H.; KIRKBRIDE, C.A.; LESLIE-STEEN, P.; DUIMSTRA, J.R. Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.1, p. 178-180, 1989.

ANEXO A

Licença para utilização das amostras dos Primatas Não humanos da colônia do ICTB.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice-presidência de Pesquisa e
 Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-5/16

Certificamos que o protocolo (P-5/14.5), intitulado "CRIAÇÃO, PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NO CENTRO DE CRIAÇÃO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO/ICECAL PARA ATENDER AOS PROGRAMAS E PROJETOS DESENVOLVIDOS NA FIOCRUZ" sob a responsabilidade de **CARLA DE FREITAS CAMPOS** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Informamos que todos os animais encaminhados para experimento devem ser testados previamente para tuberculose e os proponentes deverão informar imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz o surgimento de animais positivos para a doença.

Esta licença tem validade até 29/02/2020 e inclui o uso total de:

Macaca mulatta

- 163 machos
- 335 fêmeas

Macaca fascicularis

- 19 machos.
- 39 fêmeas.

Saimiri sciureus

- 91 machos.
- 145 fêmeas.

Saimiri ustus

- 10 machos.
- 04 fêmeas.


Etelcia M. Molinaro
 Vice - Coordenadora
 CEUA/FIOCRUZ
 SIAPE 0483096

Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de 2016.

ANEXO B

Escopo do artigo submetido para publicação na RBRA, em junho de 2021, seguido da confirmação via e-mail da submissão do artigo.

Infectious agents and reproductive disorders in non-human primates used as biomodels in animal experimentation

Agentes infecciosos e desordens reprodutivas em primatas não humanos usados como biomodelos na experimentação animal

Danielle Forneas¹; Tatiana Rozental¹, Fábio Alves², Marco A.P. Horta³, Elba R.S. Lemos¹.

¹Laboratory of Hantaviruses and Rickettsiosis, FIOCRUZ, Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Sala B115, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, Brazil.

²Institute of Science, Technology and Biomodels (ICTB/Fiocruz). Nonhuman Primate Breeding Service (SCPrim).

³Platform Coordinator NB3 of the Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

RESUMO

Os distúrbios reprodutivos em primatas não humanos podem estar associados com uma série de fatores, em particular com doenças infecciosas. A revisão de literatura aqui apresentada teve como objetivo identificar patógenos que podem causar distúrbios reprodutivos em primatas não humanos, em particular, nos modelos experimentais usados para pesquisas biomédicas. Embora não esteja totalmente claro até que ponto patógenos como *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma* spp. possam causar distúrbios reprodutivos semelhantes em primatas não humanos, como observado na população humana e de outros grupos de animais, concluímos que seria altamente recomendável testar para infecção por estes agentes infecciosos todos os primatas não humanos mantidos em cativeiro com histórico de distúrbios reprodutivos.

Palavras-chave: primatas, distúrbios reprodutivos, bactérias, protozoários.

ABSTRACT

*Reproductive disorders in non-human primates can be caused by a range of factors, in particular by infectious diseases. The literature review presented here aimed to identify the principal pathogens that can cause reproductive disorders in nonhuman primates, in particular, in the experimental models used for biomedical research. Although it is still largely unclear to what extent the pathogens as *Coxiella burnetii*,*

Brucella spp., Toxoplasma gondii, and Mycoplasma spp. can cause similar reproductive disorders in nonhuman primates, as observed in the human population and other animal group, we concluded that it would be strongly recommended to test for infection by these infectious agents all captive nonhuman primates with a history of reproductive disorders.

Keywords: *primates, reproductive disorders, bacteria, protozoa.*

Introduction

Non-human primates are closely-related to humans, and present a number of behavioral, anatomical, and physiological similarities. New World Monkeys (NWMs), infraorder Platyrrhini, can be distinguished from Old World Monkeys (OWMs), infraorder Catarrhini, primarily by their more widely-spaced nostrils. The NWMs are generally smaller than OWMs, have less opposable thumbs, lack ischial callosities and cheek pouches, and have three, rather than two premolars in each tooth row (Rylands, AB, Mittermeier, RA, 2009). All NWMs are also strictly arboreal, and are thus restricted to forested habitats in Central and South America (Andrade, AP, SC Oliveira, 2002).

Given their genetic similarities with humans, these primates are widely-used as biomodels for animal experimentation, in particular vaccine validation tests. Some platyrrhine species are more suitable for specific types of tests, given their response to certain infectious agents. Marmosets (*Callithrix*), for example, are widely used to test leishmaniasis, while capuchins (*Cebus* and *Sapajus*) are included frequently in research in neurosciences, dentistry, and in particular, the behavioral sciences (Verderane, M.P.; Izar, P., 2019). Squirrel monkeys (*Saimiri*) are a model for research on malaria (drugs and vaccines), and metabolic and cardiovascular diseases (Andrade, A. P., 2017). Recent studies have also shown that nonhuman primates provide an excellent model for the study of a number of different strains of human tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* (Scanga, C.A. and Flynn, J.L., 2014; Peña, J.C. and Ho, W.-Z., 2016).

Predisposing factors for reproductive disorders in nonhuman primates

A number of factors, including both infectious and non-infectious agents, are associated with reproductive disorders in primates. Factors such as reproductive age, birth interval, primiparity, obesity, genetic traits (inbreeding), management stress, and a lack of well-being can influence the frequency of miscarriage, although infections with microorganisms are by far the most important cause of these disorders (Souza, et al, 2016). The infectious agents that be associated with reproductive disorders in non-human primates are *Brucella* sp., *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma* spp., and *Toxoplasma gondii*.

Material and method

The following databases were used to search for articles in English and Portuguese language from January 1979 to December 2019: PubMed, Google Scholar e Scielo. The following search terms were used: animal experimentation, non-human primate, infectious agents and reproductive disorders. Abstracts were reviewed and relevant articles that met the inclusion criteria – only articles on infectious agents in non-human primate in the context of animal experimentation - were selected to review in full.

Results

In total, 39 studies were identified and selected to review in full. Thus, due to the reduced number of studies on reproductive disorders caused by infectious agents in non-human primates as experimental animals, the results of selected articles with brief considerations about the infectious agent are presented below.

Brucella spp.

Non-human primates are used as biomodels for testing *Brucella* in a number of different countries. Russell-Lodrigue, et al (2017) infected Rhesus macaques (*Macaca mulata*) with *Brucella melitensis* by the inhalation of small particles. This is the first report of the experimental infection of non-human primates with *Brucella*, which spread to a number of different tissues. Mense et al (2004) conducted a similar study in Rhesus macaques, which were infected experimentally with *B. melitensis*, and presented pathologic alterations similar to those observed in human brucellosis. Yingst et al (2010) also confirmed that the Rhesus macaque is a good model of human brucellosis in an experimental study with *B. suis*, finding the bacteria or their DNA in samples extracted from different tissues, including this of the liver, spleen, and bone marrow (Yingst, et al, 2010).

The Gram-negative bacteria of the genus *Brucella* are facultative intracellular microorganisms responsible for human brucellosis, a zoonosis transmitted through aerosol inhalation when in direct or indirect contact with infected animals, mainly goats, sheep, and cattle with reproductive disorders (abortion, and premature births), or their secretions. These bacteria are considered to be a potential bioterrorism threat by the United States Center for Disease Control and Prevention. *B. melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, and *Brucella canis* are the species most often responsible for the spread of disease in human populations. Each of these species tends to be associated with a certain type of domestic animal, that is, *B. abortus* is found more frequently in cattle, *B. melitensis* in sheep and goats, *B. suis* in pigs, and *B. canis* in dogs (Khan, A.U., et al, 2019).

Brucella is an important group of infectious agents associated with reproductive disorders in animals, in particular cattle and other small ruminants raised in areas that lack effective public health and veterinary care programs. Transmission may occur through the ingestion of raw or unpasteurized dairy products or contaminated milk, the contact of mucosae and skin abrasions with contaminated material, and the inhalation of aerosols or dust containing bacterial particles. Schlabritz-Loutsevitch et al (2008) identified a new type of naturally-acquired *Brucella* in stillborn baboon (*Papio hamadryas*) fetuses using a Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Baboons in the study colony had been serum-reactive 45 years previously (Schlabritz-Loutsevitch, N.E.; 2008).

Toxoplasma gondii

Little is known of *Toxoplasma gondii* infection in captive primates. In China, Li, et al, (2010) took serum samples from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) kept in captivity at the primatology centers in Guangxi Zhuang and Guangdong for a modified agglutination test, which showed that five (1.4%) animals had antibodies for *T. gondii*. In a similar study covering the period between 2002 and 2018, Cano-Terriza, D. (2019) identified a high seroprevalence (45.5%) in 33 species of nonhuman primates from eight zoos in Spain. In this study, the highest prevalence was recorded in adult female great apes (family Hominidae). Additional serum samples were also analyzed prospectively in this study, and in some cases, the samples of animals that had tested positive presented a significant, gradual decline in their antibody titers, while other animals that had previously tested negative subsequently presented positive samples, as observed in *Pan troglodytes*. No evidence of clinical signs of infection by *T. gondii* was found in any of the non-human primates, however. In fact, although higher rates of *T. gondii* infection were recorded in adult females in this study, which implies an increased risk of congenital toxoplasmosis, reproductive disorders such as miscarriage, stillbirth or congenital disorders could not be linked systematically to *T. gondii* infection (Cano-Terriza, D., 2019).

Data on *T. gondii* infections in nonhuman primates in Brazil are scarce, although Minervino et al (2017) reported a seroprevalence of 49.2% in monkeys kept at the National Primate Center in Pará state, including platyrrhines and the catarrhine vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*). This study was based on the use of parasites fixed in formalin as the antigen for a modified agglutination assay. In the state of Mato Grosso do Sul, Leite, et al (2008) detected anti-*T. gondii* antibodies in 28.7% of the captive tufted capuchins (*Sapajus apella*) kept at the Wild Animal Rehabilitation Center in Campo Grande, using indirect immunofluorescence assay, and in 30.8% of these animals, when tested using modified agglutination. This high rate of infection was linked to the ingestion of *T. gondii* oocysts contained in the captive diet, in particular, raw meat, and the predation of small animals, such as birds and rats, by these monkeys.

Santos et al (2017) recorded a fatal case of acute systemic toxoplasmosis in a wild adult female southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from the Brazilian state of São Paulo. This animal had a history of eating raw meat and contact with cats in the vicinity of the forest it inhabited. The necropsy and immunohistochemical analyses indicated acute hemorrhagic fibrin bronchopneumonia. The PCR testing returned positive results for the lung, liver, spleen, heart, skeletal muscle, and whole blood, and identified a new genotype not been previously described in primates (Santos, et al, 2017).

Toxoplasma gondii has been reported in a number of different primate species in captivity, mainly in animals kept in zoos. In São Paulo, Brazil, Epiphanio, S. et al (2000) identified *T. gondii* through immunohistochemical analyses of a number of platyrrhine primates that had died in captivity, possibly as a result of feeding on *Tenebrio* larvae or crickets, or through the dispersal of oocysts in the environment.

Toxoplasma gondii is the coccid protozoan that causes toxoplasmosis, which is a zoonosis of considerable importance in both human and animal health. The principal hosts of this protozoan are felines. Human toxoplasmosis is transmitted typically through the ingestion of oocysts in animal tissue or contact with oocysts in the environment. Vertical transmission of tachyzoites through the placenta can occur in mothers infected with *T. gondii*, provoking miscarriages, stillbirths, and congenital toxoplasmosis. Up to now, no studies have confirmed that this protozoan causes reproductive disorders in nonhuman primates, but this does seem likely, given their genetic similarities with humans (Oliveira, G.M.S. et al. 2019; Salvo, A.R. Di., et al, 2019).

Mycoplasmas spp.

Moller et al (1978) described an experiment in which *Mycoplasma hominis* was isolated from a human patient with acute salpingitis and inoculated into the uterine tubes of female vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). This study obtained promising results in the tests for inflammation in the female genital organ. Novy, M.J, et al (2009) also studied *M. hominis*, extracted postpartum from a human placenta in a patient that had developed a fever. This isolate was inoculated in pregnant female Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and the fetus samples were PCR positive for *M. hominis*, a similar result identified by Moller et al (1978). *Mycoplasma hominis* is a major cause of fetal inflammation, and also causes premature births and non-fetal pneumonia in nonhuman primates, and these findings provide important insights for the prophylaxis or treatment of these disorders, and their eventual prevention.

A number of new species have been described in naturally-infected nonhuman primates, including *Candidatus Mycoplasma aoti*, detected in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) and *Candidatus Mycoplasma mahaemomacaque*, which was recorded in *Macaca fascicularis* in the United States (Baker, et al, 2011; Neimark, et al, 2001). In addition, *Candidatus Mycoplasma mahaemominutum* was found in *Saimiri sciureus* in Guyana (Neimark, et al, 2002) and *Candidatus Mycoplasma mahaemomacaque* was detected in *Macaca fuscata* in Japan (Sashida, et al, 2014).

With advances in molecular techniques, PCR has been used increasingly to identify *M. fermentans* in biological samples, allowing this bacterium to be associated with systemic infections, as seen in non-human primates (Lo, SC, et al, 1993; Wang, RY-H, et al, 1992).

In the Brazilian state of Santa Catarina, Santos, et al (2013) detected hemotropic *Mycoplasma* in free-ranging black howler monkeys (*Alouatta caraya*) using molecular techniques. More recently, Melo et al (2019) detected the presence of the DNA of *Mycoplasma* sp. in the serum of captive howlers (*Alouatta* spp.). These samples were assigned to two phylogenetic groups – *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma suis* – which should be taken into consideration during any further epidemiological investigation.

The genus *Mycoplasma* encompasses a group of uncultivable intracellular pleomorphic Gram negative bacteria that lack a cell wall, have a small genome, and an ample diversity of species and animal hosts (Groebel et al., 2009). Although *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* are associated with human diseases, the majority of *Mycoplasma* species have been described in cattle, goats, and sheep, in which they cause hemolytic anemia after attaching themselves to the surface of the erythrocytes. Most *Mycoplasma* species are highly contagious and a number of species have already been described in nonhuman primates, primarily in animal experimentation studies. Since the 1970s, in fact, non-human primates have been used as the principal animal biomodel for experimental research into reproductive disorders in women in many regions around the world (Moller, et al.; 1978; Messick, J.B. 2004; Novy, M.J, et al, 2009).

Coxiella burnetii

Studies of *Coxiella burnetii* involving non-human primates are related primarily to the development of vaccines, with primates being considered excellent biomodel for this research. The cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) is the most widely-used primate model for research on *C. burnetii* vaccines, and is considered to be the most appropriate biomodel, considering the similarity of its clinical signs and pathological changes to those observed in humans, such as fever and pneumonia, as well

as its capacity to maintain antibodies from both phases of the disease circulating for up to months (Gonder, J.C.; et al, 1979; Waag, D.M. et al, 2002; Waag, D.M.; et al, 1999.; Kishimoto, R.A. et al 1981.; Gregory, A.E. et al, 2019.; Metters, G. et al, 2019). Up to now, however, the publications referring to *C. burnetii* in non-human primates have been restricted to experimental research on vaccines, and no studies have linked *C. burnetii* specifically to a reproductive disorder in these primates.

One of the agents that are most associated with reproductive disorders in animals is the proteobacterium *C. burnetii*, an intracellular Gram-negative spore-forming bacterium that is known to infect an ample range of animals, including humans. This short and pleomorphic rod bacterium, which is stained using the Gimenez method, is causative agent of Q fever in humans and coxiellosis in animals. This bacterium is transmitted from animal to animal via the inhalation of dust or droplets containing spore-like particles of infected feces, urine, milk, and placentas or other uterine tissue. Ticks may also transmit *C. burnetii* to a number of wild and domestic animal species, but not to humans. A single *C. burnetii* spore-like particle can cause an infection.

Conclusion

Given their considerable genetic similarities with humans, non-human primates are important biomodels for the experimental infection of a number of infectious agents. In particular, infection by *Brucella* spp., *T. gondii*, *C. burnetii*, and *Mycoplasma* spp. should be considered in non-human primates that have a history of miscarriage, stillbirth or other reproductive disorders, in particular those kept in captivity, although it is still largely unclear to what extent these pathogens cause similar reproductive disorders in human and nonhuman primates. Clearly, more systematic studies are needed to establish causal relationships between the pathogens and their potential disorders, but in the meantime, it would be strongly recommended to test all captive nonhuman primates with a history of reproductive disorders for infection by these infectious agents.

Acknowledgements

We thank everyone who participated in this bibliographical review and search for scientific articles.

Reference

Verderane MP, Izar P. Maternal carestyles in primates: considering a New World species. *Psicologia USP. Universidade Estadual de São Paulo.* V:30. 1-1.2019.

Andrade AP, Oliveira RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

Andrade AP. Técnicas e Procedimentos experimentais em animais de laboratório. Mestrado Profissional em Ciência em Animais de laboratório/MPCAL. Notas de aula. 1-28.2017.

Rosenberger AL, Hartwig WC. New World Monkeys. *Encyclopedia of Life Sciences.* 1-10.2013.

Rylands AB, Mittermeier RA. The diversity of the New World primates (Platyrrhini): an annotated taxonomy. In: Garber P.A.; Estrada A.; Bicca-Marques J.C.; Heymann E.W.; Strier K.B. (Eds). *South American primates: comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation.* Springer. 23-54.2009.

Souza IV, Kugelmeier T, Andrade M, Benedicto H. Aspectos morfológicos do útero de Macaco Rhesus (*Macaca mulatta* – zimmermann, 1780) em fêmeas nulíparas, primíparas e pluríparas. *RESBCAL-Revista de Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório.* V.4. N.1. São Paulo, 2016.

Gonder JC, Kishimoto RA, Castello MD, Pedersen CE, JR Larson EW. Cynomolgus Monkey Model for Experimental Q Fever Infection. *The Journal of Infectious Diseases.* V.139, Issue.2, Pages 191–196. February 1979.

Waag DM, Byrne R, Estep J, Gibbs P, Pitt, MLM, Banfield CM. Evaluation of *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) and Rhesus (*Macaca mulatta*) Monkeys as Experimental Models of Acute Q Fever after Aerosol Exposure to Phase-I *Coxiella burnetii*. *Laboratory Animal Science*. V.49, N.6, December 1999.

Waag DM, England MJ, Tammariello RF, Byrne WR, Gibbs P, Banfield CM, Pitt MLM. Comparative efficacy and immunogenicity of Q fever chloroform:methanol residue (CMR) and phase I cellular (Q-Vax) vaccines in cynomolgus monkeys challenged by aerosol. *Journal & Books*. V.20, issue 19-20, P.2623-2634, June 2002.

Kishimoto RA, Gonder JC, Johnson JW, Reynolds JA, Larson EW. Evaluation of a killed phase I *Coxiella burnetii* vaccine in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory Animal Science*. Feb 1981.

Epiphany S, Guimarães MABV, Fedullo DL, Correa SHR, Catão-Dias J.L. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2000.

Cano-Terriza D, Almería S, Caballero-Gómez J, Díaz-Cao JM, Jiménez-Ruiz S, Dubey JP, García-Bocanegra, I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive non-human primates in zoos in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2019.

Minervino AHH, Cassinelli ABM, Souza AJS, de Alves M.M, Soares, M dCP, Ferreira DAC, Pereira WLA, Gennari SM. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive non-human primates in the Amazon region, Brazil. Wiley. 2017.

Leite TNB, Maja TDEA, Ovando TM, Cantador IDT, Schimidt LR, Guércio AC, Cavalcanti Á, Lopes FMR, Cunha IAL DA, Navarro IT. Occurrence of infection *Leishmania* spp. and *Toxoplasma gondii* in monkeys (*Cebus apella*) from Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, 2008.

Santos SV, Pena HFJ, Gomes MT, Teixeira RHF, Kanamura CT, Diaz-Delgado J, Gennari SM, Catão-Dias JL. Fatal toxoplasmosis in a southern muriqui (*Brachyteles arachnoides*) from São Paulo state, Brazil: Pathological, immunohistochemical, and molecular characterization. Wiley. 2017.

Li HL, Yan C, Li J, Ai L, Zhou DH, Yuan ZG, Lin RQ, Zhao GH, Zhu XQ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in bred cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) in China. *The Journal of Parasitology*. Vol. 96, 2010.

Schlambritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, Jr EJD, Snider CL, Cappelli D, Ebersole JL, Nathanielsz PW, Hubbard GB. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report. *Journal of medical primatology*. 2008.

Russell-Lodrigue K.E, Killeen SZ, Ficht TA, Roy CJ. Mucosal bacterial dissemination in a rhesus macaque model of experimental brucellosis. Wiley. 2017.

Mense M.G, Borschel RH, Wilhelmsen CL, Pitt ML, Hoover DL. Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Veterinary Research*. 2004.

Yingst SL, Huzella LM, Chuvala L, Wolcott M. A rhesus macaque (*Macaca mulatta*) model of aerosol-exposure brucellosis (*Brucella suis*): pathology and diagnostic implications. *Journal of Medical Microbiology*. 2010.

Moller BR, Freundt EA, Black FT, Frederiksen P. Experimental Infection of the Genital Tract of Female Grivet Monkeys by *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity*. 1978.

Novy MJ, Duffy L, Axthelm MK, Sadowsky DW, Witkin SS, Gravett MG, Cassell GH, Waites KB. Ureaplasma parvum or *Mycoplasma hominis* as Sole Pathogens Cause Chorioamnionitis, Preterm Delivery, and Fetal Pneumonia in Rhesus Macaques. *Reproductive Sciences*. Vol. 16. 2009.

Santos LC, Cubilla MP, Moraes WD, Cubas ZS, Oliveira MJ, Estrada M, Leutenegger CM, Sykes JE, Lindsay LL, Marcondes M, Filho IRB, Biondo AW. Hemotropic *Mycoplasma* in a Free-ranging Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. V:49. 2013.

Lo S-C, Wear DJ, Shih JWK, Wang RYH, Newton PB, Rodriguez JF. Fatal Systemic Infections of Nonhuman Primates by *Mycoplasma fermentans* (Incognitos Strain). *Clinical Infectious Diseases*. 1993.

Wang R-Y-H, Hu WS, Dawson MS, Shih J-W-K, Lo S-C. Selective Detection of *Mycoplasma fermentans* by Polymerase Chain Reaction and by Using a Nucleotide Sequence within the Insertion Sequence-Like Element. *Journal of Clinical Microbiology*. V:30. 1992.

Baker EN, Helps CR, Neimark H, Peter IR, Tasher S. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears. *Veterinary Microbiology*. 2011.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001.

Neimark H, Barnaud A, Gounon P, Michel JC. Contamin, H.; The putative *haemobartonella* that influences *Plasmodium falciparum* parasitemia in squirrel monkey is a haemotrophic *Mycoplasma*. *Microbes and Infection*. 2002.

Sashida H, Suzuki Y, Rokuhara S, Nagai K, Harasawa R. Molecular demonstration of hemotropic mycoplasmas in wild Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014.

Gregory AE, Van Schaik EJ, Russell-Lodrigue KE, Fratzke AP, Samuel JE. *Coxiella burnetii* Intratracheal Aerosol Infection Model in Mice, Guinea Pigs, and Nonhuman Primates. *Infection and Immunity*. V:87. 2019.

Metters G, Norville IH, Titball RW, Hemsley CM. From cell culture to cynomolgus macaque: infection models show lineage-specific virulence potential of *Coxiella burnetii*. *Journal of Medical Microbiology*. 2019.

Salvo ARDi, Chomel BB. Zoonoses and potential zoonoses of bears. Wiley. 2019.

Oliveira GMS, Simões JM, Schaer RE, Freire SM, Nascimento RJM, Pinheiro AMC de Melo, Carvalho SMS, Mariano APM, Carvalho RC, Munhoz

AD. Frequency and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women and their pets in Ilhéus, Bahia, Brazil. Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. V:52. 2019.

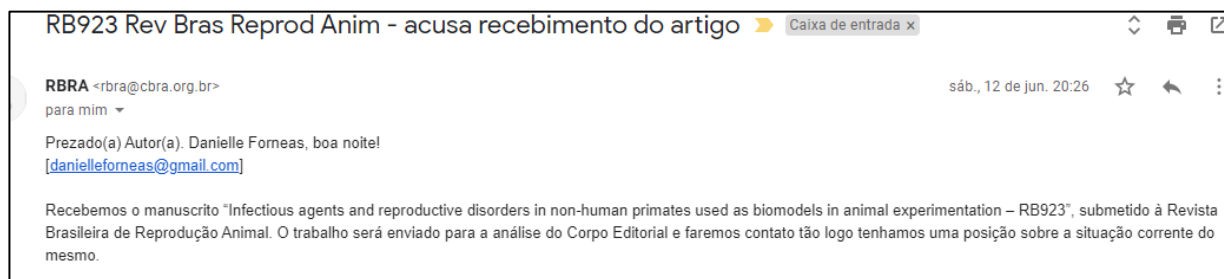
Khan AU, Shell WS, Melzer F, Sayour AE, Ramadan ES, Elschner MC, Moawad AA, Roesler U, Neubauer H, El-Adawy H. Identification, Genotyping and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Brucella* spp. Isolated from Livestock in Egypt. Microorganisms. 2019.

Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M., Ziegler, U., Hoelzle, L. *Mycoplasma suis* invades porcine. Infection and Immunity. 2009.

Messick JB. Hemotropic mycoplasmas (*hemoplasmas*): a review and new insights into pathogenic potential. Veterinary Clinical Pathology. V:33. 2004.

Scanga CA, Flynn JL. Modeling Tuberculosis in Nonhuman Primates. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2014.

Peña JC, Ho W.-Z. Non-Human Primate Models of Tuberculosis. Microbiology Spectrum. 2016.



ANEXO C

Folder informativo sobre agentes correlacionados em causar distúrbios reprodutivos em animais. Fonte: Arquivo pessoal.



**AGENTES
CORRELACIONADOS
COM DISTÚRBIOS
REPRODUTIVOS EM
ANIMAIS**

Coxiella burnetii

- O agente:**
É uma bactéria causadora da febre Q em humanos e coxielose em animais. Esta bactéria pode infectar diversos animais, mas principalmente ruminantes, como ovelhas, cabras e bovinos.
- Transmissão**
A transmissão em humanos ocorre pela inalação de partículas contendo a bactéria, ou ingestão de alimentos contaminados. Nos animais, mais frequentemente pela predação de animais infectados e pelo parasitismo dos carrapatos.
- Manifestações clínicas**
Nos animais distúrbios reprodutivos especialmente abortos e natimortos. Já em humanos, amplo espectro clínico, como febre, pneumonia, endocardite, entre outras manifestações clínicas.
- Medidas profiláticas**
Não manipular produtos de abortos sem luvas e máscaras, ingerir alimentos pasteurizados, e tratar os animais doentes.

Toxoplasma gondii

- O agente:**
É um protozoário causador da toxoplasmose e que pode infectar diversas espécies de animais, mas os gatos e outros felinos são os principais hospedeiros.
- Transmissão**
A transmissão tanto para o homem quanto para outros animais pode ser pela ingestão de água ou alimentos contaminados com os oocistos no meio ambiente e cistos nos tecidos de animais infectados, além da transmissão congênita.
- Manifestações clínicas**
Quadro de febre com aumento de gânglios. Geralmente autolimitada, mas há casos graves com alteração pulmonar, cardíaca do sistema nervoso além de ocular e congênita (grávidas infectadas).
- Medidas profiláticas**
Higiene alimentar, não ingerir alimentos crus ou não pasteurizados e maior vigilância com gestantes.

Brucella sp.

- O agente:**
É um grupo de bactérias gram-negativas cujos reservatórios são os bovinos, caprinos, ovinos, suínos e cães.
- Transmissão**
A transmissão ocorre pelo contato com animais doentes (pele, sangue, urina, fêtos abortados, placenta), pela ingestão de leite cru e seus derivados provenientes de animais contaminados e pela inalação de partículas dispersas no ar.
- Manifestações clínicas**
No homem causa febre, sudorese, calafrios, fraqueza, cansaço, perda de peso, dores, além de abortos em gestantes. Importante agente causador de distúrbios reprodutivos na pecuária leiteira e queda na produção de leite.
- Medidas profiláticas**
Não ingerir alimentos crus ou não pasteurizados, descarte dos rebanhos contaminados e vacinação profilática.

Mycoplasma sp.

- O agente:**
É um grupo de pequenas bactérias que causam doença no homem e nos animais. A espécie *Mycoplasma pneumoniae* está associada à pneumonia e *M. hominis* a distúrbios reprodutivos.
- Transmissão**
A transmissão ocorre pelo contato com excreções e secreções, além de transmissão por artrópode nos animais.
- Sinais clínicos**
Nos animais, principalmente de produção, ocorre pleuropneumonia, poliartrite, mastite, salpingite bem como históricos de abortos. Em humanos os sinais mais comuns são: vaginose bacteriana, doença inflamatória pélvica, febre pós-aborto, febre pós-parto.
- Medidas profiláticas**
Medidas básicas de higiene, em especial na ordenha, além de controle de artrópodes. Atenção quanto à infecção nas gestantes.

PATROCINADORES








Endereços na Internet:
Fiocruz: www.fiocruz.br
ICTB: www.ictb.fiocruz.br
IOC: www.ioc.fiocruz.br
Ensino do ICTB:
<http://ensino.ictb.fiocruz.br>

Elaboração: Danielle Fornes
Revisão e Aprovação: Drª Elba Lemos