

Detección de anticuerpos y factores de riesgo asociados con *Toxoplasma gondii* en animales silvestres en un parque zoológico

Detection of antibodies and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in wild animals in a zoo

Rosa Pinedo V.^{1,5}, Amanda Chávez V.¹, Karina Muñoz D.², Omar González-Viera³,
Eva Casas A.¹, Deisy Abad-Ameri¹, Eglinton Villacaqui A⁴

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en animales silvestres de los órdenes Carnivora, Primates, Perissodactyla, Cetartiodactyla y Rodentia en el zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas, Lima, Perú, así como identificar los factores de riesgo que intervienen en su presentación, estableciendo el rol que cumplen felinos domésticos (*Felis silvestris* f. *catus*) y roedores del género *Rattus* errantes y libres en el establecimiento en estudio en la transmisión del parásito. Se tomaron muestras de sangre de 332 animales (Carnivora: 75, Primates: 71, Perissodactyla: 32, Cetartiodactyla: 134, Rodentia: 20); así como a 41 felinos domésticos y 124 roedores del género *Rattus*. Además, muestras de cerebro, corazón, hígado y diafragma de los roedores *Rattus* spp para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico. Las muestras de suero fueron analizadas mediante hemaglutinación indirecta (1:64 - 1:2048), considerando como positivo a títulos $\geq 1/64$. Se determinó anticuerpos (IgG, IgM) mediante 2-Mercaptoetanol para determinar infecciones agudas y crónicas. En la evaluación de los factores de riesgo se consideraron las variables orden, sexo, tiempo en la institución (<5; 6-10; >10 años) y tipo de recinto (abierto y cerrado), evaluándose mediante análisis de regresión logística múltiple ajustado a Stepwise. La frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en animales silvestres en cautiverio fue de 77.1

¹Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Patronato del Parque de las Leyendas (PATPAL), Lima, Perú

³ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de California, Davis, Estados Unidos

⁴Laboratorio de Epidemiología Veterinaria y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

⁵ E-mail: rosita_vet99@gmail.com

Recibido: 22 de junio de 2018

Aceptado para publicación: 11 de febrero de 2019

$\pm 4.4\%$, con reactividad serológica principal de IgG (73.4%, casos crónicos) y fuerte respuesta serológica (1/2048) en el 53.9% de los animales. Los factores de riesgo asociados a la transmisión de *T. gondii* fueron el orden, animales con más de 10 años en la institución (OR: 4.18) y en recinto abierto (3.99) ($p < 0.05$). Los roedores y gatos que deambulan en el zoo exhibieron una baja (11.3 ± 6.0) y moderada (58.5 ± 15.2) frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, respectivamente. Se detectaron quistes tisulares en musculatura cardíaca y esquelética (diafragma) en los roedores (4%, 5/124), pero no se pudo demostrar la presencia de *T. gondii* mediante inmunohistoquímica.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*; animales silvestres; *Rattus* sp; *Felis silvestris* f. *catus*; anticuerpos

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in wild animals of the orders Carnivora, Primates, Perissodactyla, Cetartiodactyla and Rodentia in the zoo of the Patronato del Parque de las Leyendas, Lima, Peru, as well as to identify the risk factors associated to toxoplasmosis, establishing the role in the transmission of the parasite of domestic felines (*Felis silvestris* f. *catus*) and rodents of the genus *Rattus* running free in the zoo. Blood samples were taken from 332 animals (Carnivora: 75, Primates: 71, Perissodactyla: 32, Cetartiodactyla: 134, Rodentia: 20); as well as in 41 domestic felines and 124 rodents of the genus *Rattus*. In addition, samples of brain, heart, liver and diaphragm from the rodents for histopathological and immunohistochemical analysis. Serum samples were analysed by indirect hemagglutination (1:64 - 1:2048), considering as positive titres greater $\geq 1/64$. Antibodies (IgG, IgM) were determined by 2-Mercaptoethanol to determine acute and chronic infections. In the evaluation of the risk factors, the variables order, sex, time in the institution (<5, 6-10, >10 years) and type of enclosure (open and closed) were analysed by multiple logistic regression analysis adjusted to Stepwise. The frequency of anti-*T. gondii* antibodies in wild animals in captivity was $77.1 \pm 4.4\%$, with serological main reactivity of IgG (73.4%, chronic cases) and strong serological response (1/2048) in 53.9% of the animals. The risk factors associated with the transmission of *T. gondii* were the order, animals with more than 10 years in the zoo (OR: 4.18) and exhibited in open area (3.99) ($p < 0.05$). Rodents and cats that roam in the zoo had a low (11.3 ± 6.0) and moderate (58.5 ± 15.2) frequency of anti-*T. gondii* antibodies respectively. Tissue cysts were detected in cardiac and skeletal muscles (diaphragm) in rodents (4%, 5/124), but the presence of *T. gondii* could not be demonstrated by immunohistochemistry.

Key words: *Toxoplasma gondii*; wild animals; *Rattus* sp; *Felis silvestris* f. *catus*; antibodies

INTRODUCCIÓN

Los parques zoológicos son espacios de concentración de animales silvestres que cumplen un rol en la conservación de la biodiversidad,

además de ser centros de investigación y de educación para la población. La participación de la fauna silvestre como reservorios o portadores de zoonosis es de gran importancia, pues constituyen componentes vitales en el ciclo epidemiológico de

enfermedades que afectan a los seres humanos y animales domésticos (Acha y Szyfres 2003; Pavlin *et al.*, 2009, Cutler *et al.*, 2010). Algunos estudios han estimado que el 60% de los patógenos emergentes que afectan al hombre proceden de los animales y que más del 70% de estos tienen origen en la fauna silvestre (Cutler *et al.*, 2010).

Toxoplasma gondii se encuentra presente en todas las latitudes, tanto en poblaciones humanas como en más de 300 especies de mamíferos domésticos y silvestres y en cerca de 30 especies de aves de corral y silvestres. Es un agente patógeno de gran importancia médica y veterinaria, con consecuencias diversas y de intensidad variable en función de la especie, edad y estado inmunitario (Dubey y Jines, 2008; Dubey, 2010).

Los felinos (domésticos y silvestres) son los hospederos definitivos de *T. gondii*, eliminando ooquistes no esporulados al medio ambiente a través de las heces, los cuales luego de esporular constituyen la forma infectante para otras especies animales, así como para el mismo felino (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). La infección puede transmitirse, además, por quistes tisulares presentes en la carne de ratones, aves y herbívoros (Dubey, 2010).

En el Perú se han realizado varios estudios sobre prevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* en ovinos (44%), cerdos (33.6%), alpacas (44.5%), caninos (24%) y felinos (11%) (Gómez *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2012; Cerro *et al.*, 2014; Bernal *et al.*, 2015; Luyo *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios en animales silvestres son escasos; entre ellos, el trabajo realizado por Navarro *et al.* (2015) en carnívoros y el de Muñoz *et al.* (2005), quienes reportaron una alta prevalencia (90.3%) en primates en cautiverio de la especie *Cebus apella*.

Se han reportado frecuencias variables de *T. gondii* en zoológicos de varios países. En la República Checa, España y EEUU se han determinado seroprevalencias en carnívoros (47-90%), primates (22-46%), perisodáctilos (33%) y artiodáctilos (22-25%) (Gorman *et al.*, 1986; Sedlák y Bártoová, 2006; Sobrino *et al.*, 2007). Las frecuencias altas en carnívoros se deben probablemente a los hábitos de alimentación por consumo de carne infectada, habiéndose observado prevalencias de hasta 100%, aunque clínicamente inaparentes en animales de las familias Hyaenidae, Mustelidae, Ursidae y Viverridae del orden Carnivora (Sobrino *et al.*, 2007). Sin embargo, herbívoros como canguros, lémures y koalas, así como primates neotropicales suelen estar relacionados a mortandad aguda de curso fulminante (Acha y Szyfres, 2003; Epiphanyo *et al.*, 2003; De Camps *et al.*, 2008).

Diversos factores epidemiológicos juegan un papel importante en la transmisión de *T. gondii* en los animales silvestres en cautiverio. La infección puede ser mantenida por la presencia de roedores, palomas y felinos (Dubey, 2010). Por otro lado, diversos vectores (cucarachas, moscas coprófilas, gusanos de tierra, etc.) pueden actuar como hospederos de transporte de ooquistes fecales que son consumidos por algunas especies de animales silvestres, realizando una diseminación mecánica (Acha y Szyfres, 2003).

Por lo antes señalado, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en animales silvestres en cautiverio de los órdenes Carnivora, Primates, Perissodactyla, Cetartiodactyla y Rodentia, así como identificar los factores de riesgo que intervienen en su presentación, estableciendo el rol que cumplen los felinos domésticos (*Felis silvestris* f. *catus*) y roedores del género *Rattus* que deambulan en estado libre en el zoológico, en la transmisión del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del Estudio

El estudio se realizó en el Zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas, ubicado en el distrito de San Miguel, Lima, a 50 msnm, entre enero de 2014 y diciembre de 2015. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú. Los animales en estudio fueron tratados bajo normas y principios de guías internacionales basadas en principios para la investigación biomédica que involucra animales (Bankowski y Howard-Jones, 1986).

Animales Silvestres y Muestras

Se colectaron muestras de 332 animales distribuidas en 51 especies silvestres (Cuadros 1 y 2), que formaron parte del control sanitario rutinario del parque zoológico. Las especies pertenecían a cinco órdenes: Carnivora ($n=75$), Primates ($n=71$), Perissodactyla ($n=32$), Cetartiodactyla ($n=134$) y Rodentia ($n=20$). La contención de los animales se hizo con redes y/o sedación (xilacina y ketamina). Muestras de sangre fueron obtenidas a través de la punción de la vena braquial, yugular o femoral, usando vacutainers estériles. Las muestras fueron identificadas y trasladadas con refrigerantes al laboratorio para su procesamiento y análisis.

Felinos Domésticos y Muestras

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 41 felinos domésticos (*Felis silvestris f. catus*), que deambulaban en forma libre en el parque zoológico. Esos animales fueron capturados mediante el uso de trampas caseras tipo Tomahawk y fueron sometidos a control reproductivo (castración, ovariectomía), como parte del manejo sanitario del centro. Las muestras de sangre fueron

obtenidas mediante punción de la vena cefálica, previa anestesia con xilacina (1 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg).

Roedores y Muestras

Los roedores ($n=124$) fueron atrapados durante un periodo de 12 meses (marzo 2014 a marzo 2015), mediante el uso de trampas Tomahawk de captura viva (8x9x23 cm). Se colocaron 30 trampas en lugares estratégicos y debidamente identificadas mediante la utilización de un GPS, a distancia no mayor de cinco metros en forma radial y revisadas al día siguiente de su colocación. Los roedores fueron anestesiados mediante la inhalación de cloroformo e inyección de ketamina (100 mg/kg). La muestra de sangre se obtuvo mediante punción intracardiaca y los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital sódico.

Se registraron parámetros morfo-métricos para establecer la especie de roedor (longitud total, largo de cola, patas y orejas) además del sexo y peso. Para la edad, pesos mayores de 130 y 200 g en *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* son considerados como ejemplares adultos, respectivamente (Kataranovski *et al.*, 1994; Milazzo *et al.*, 2010). En la manipulación de los roedores se siguieron los estándares de bioseguridad y normas de procesamiento, según los protocolos del Centro de Enfermedades Infecciosas y Prevención de Atlanta (Mills *et al.*, 1998).

Anticuerpos Anti-*T. gondii*

Los anticuerpos contra *T. gondii* se determinaron mediante la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) con un «kit» comercial, siguiendo el protocolo del fabricante (Wiener Lab, 2008). Se hicieron diluciones de la muestra de 1:64 a 1:2048 en felinos y animales silvestres y hasta 1:4096 en roedores (*Rattus spp.*), considerándose como positivos los títulos iguales o mayores a 1/64. Reacciones positivas fueron consideradas en aquellos sueros que mostraron aglu-

Cuadro 1. Especies silvestres contempladas en el estudio (Parte I)

Orden / Familia	Especie	Nombre común	N.º	
Carnivora			75	
Ursidae	<i>Ursus americanus</i>	Oso negro	2	
	<i>Ursus arctos arctos</i>	Oso pardo	2	
	<i>Tremarctos ornatus</i>	Oso de anteojos	7	
	Felidae	<i>Panthera leo</i>	León	10
		<i>Leopardus colocolo</i>	Gato del Pajonal	7
		<i>Leopardus tigrinus</i>	Oncilla	6
		<i>Panthera onca</i>	Otorongo	9
		<i>Panthera tigris</i>	Tigre	3
		<i>Leopardus pardalis</i>	Tigrillo	2
		<i>Puma concolor</i>	Puma	3
	Mustelidae	<i>Leopardus wiedii</i>	Margay	1
		<i>Eira barbara</i>	Tayra	3
		<i>Pteronura brasiliensis</i>	Lobo de río / nutria gigante	1
	Canidae	<i>Lycalopex culpaeus</i>	Zorro andino	3
<i>Lycalopex griseus</i>		Zorro plateado	1	
<i>Canis lupus familiaris</i>		Perro Peruano sin Pelo	6	
Procyonidae	<i>Nasua nasua</i>	Coatí	4	
	<i>Potos flavus</i>	Chosna	5	
Primates			71	
Cebidae	<i>Cebus apella</i>	Mono machín negro	30	
	<i>Cebus albifrons</i>	Mono machín blanco	5	
Aotidae	<i>Aotus nancymaae</i>	Mono nocturno o musmuquí	7	
Pitheciidae	<i>Pithecia monachus</i>	Mono huapo negro	8	
Atelidae	<i>Lagothrix lagotricha</i>	Mono choro común	9	
	<i>Ateles chamek</i>	Mono maquisapa negro	4	
	<i>Ateles belzebuth</i>	Mono maquisapa cenizo	1	
Cercopithecidae	<i>Papio hamadryas</i>	Papión sagrado	4	
	<i>Macaca mulatta</i>	Macaco	1	
	<i>Chlorocebus aethiops</i>	Mono tota o verde	1	
Hominidae	<i>Pan troglodytes</i>	Chimpancé	1	

tinación del antígeno, caracterizada por la formación de una malla o de por lo menos 50% del área de la cavidad de la microplaca. La formación de botón compacto fue considerada como reacción negativa. En todos los ensayos se utilizaron controles positivos y

negativos. Además, en animales seropositivos se determinó la presencia de anticuerpos (IgG e IgM) mediante el uso del 2-Mercaptoetanol para dilucidar si el tipo de infección es aguda o crónica.

Cuadro 2. Especies silvestres contempladas en el estudio (Parte II)

Orden / Familia	Especie	Nombre común	N.º
Cetartiodactyla			134
Bovidae	<i>Ovis aries</i>	Oveja	24
	<i>Ovis musimon</i>	Muflón	1
	<i>Capra hircus</i>	Cabra alpina	48
	<i>Bubalus arnee</i>	Búfalo de agua	3
Cervidae	<i>Hippocamelus antisensis</i>	Taruca	2
	<i>Odocoileus virginianus</i>	Venado cola blanca	30
Camelidae	<i>Vicugna vicugna</i>	Vicuña	6
	<i>Lama glama</i>	Llama	3
	<i>pacovicuña</i>	Pacovicuña	1
	<i>Vicugna pacos</i>	Alpaca	7
	<i>Lama guanicoe</i>	Guanaco	4
Tayassuidae	<i>Pecari tajacu</i>	Sajino	4
Giraffidae	<i>Giraffa camelopardalis</i>	Jirafa	1
Perissodactyla			32
Tapiridae	<i>Tapirus terrestris</i>	Tapir amazónico	15
Equidae	<i>Equus caballus</i>	Caballo	10
	<i>Equus grevyi</i>	Cebra de Grevy	4
	<i>Equus quagga</i>	Cebra de Grant	3
Rodentia			20
Dasyproctidae	<i>Dasyprocta punctata</i>	Añuje dorado	3
	<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	Añuje común	4
Caviidae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Ronsoco	2
	<i>Dolichotis patagonum</i>	Mara	9
Hystriidae	<i>Hystrix cristata</i>	Puerco espín africano	2

Análisis Histológico e Inmunohistoquímico en *Rattus* spp

Muestras de tejidos (cerebro, corazón, hígado y diafragma) de los roedores fueron fijadas en formalina tamponada al 10% durante 48 horas y posteriormente procesadas mediante métodos rutinarios para microscopía óptica para su tinción con Hematoxilina-Eosina (HE). Se realizaron cortes, que se colocaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina. Se utilizó la técnica de anticuerpo pri-

mario y polímero conjugado. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo comercial: antisuero hiperinmune caprino anti-*T. gondii*, a una dilución de 1:300 y un polímero conjugado como anticuerpo secundario de conejo anti-caprino IgG. Para revelar la reacción inmunológica se utilizó el reactivo comercial 3,3'-diaminobezidina tetrahydrochloride (DAB) para identificar estructuras con inmunopositividad a *T. gondii* (Lacave y Caballero, 2012).

Encuesta Epidemiológica

Por cada animal silvestre se aplicó una encuesta epidemiológica con información concerniente a la orden, especie, edad, sexo, alimentación, recinto de exhibición y tiempo en la institución. Asimismo, se obtuvo información concerniente a cada roedor (parámetros morfométricos, edad estimada, sexo y peso) y felino doméstico (edad, sexo).

Análisis de la Información

El análisis de los factores de riesgo en animales silvestres fue efectuado en dos etapas utilizando el análisis de regresión logística múltiple con el modelo de ajuste de Stepwise. En la primera, cada variable se cruzó con la variable dependiente (seroreactor positivo a *T. gondii*) donde se obtuvieron valores de Odds ratio (OR) crudos para cada variable de exposición. Aquellas que presentaron un valor de $p < 0.05$ por el test de Chi-cuadrado fueron incluidas en el análisis multivariado, utilizando la regresión logística múltiple (Hosmer y Lemeshow, 2000), para la definición de un modelo que mejor identificara los factores de riesgo, con un nivel de significancia de 5%. El ajuste del modelo final fue verificado con la prueba de Stepwise. Los análisis fueron realizados con el programa STATA v. 14. La asociación entre las variables epidemiológicas (orden [$n=5$], sexo, alimentación [herbívoro, omnívoro, carnívoro], tiempo en la institución [0-5, 6-10, >10] y recinto de exhibición [abierto, cerrado]) y seropositividad para *T. gondii* fue efectuada con el cálculo OR e intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

La frecuencia de *T. gondii* en roedores y gatos errantes fue expresada en porcentaje con su respectivo intervalo de confianza. La posible asociación entre las variables con el parasitismo fue analizada mediante la prueba de Chi cuadrado. Se utilizó estadística descriptiva para el estudio histopatológico en muestras de tejidos de roedores.

Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos del presente estudio contemplaron los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica y con las normas reglamentadas por el Comité de Ética para el Uso de Animales de Experimentación de la FMV-UNMSM (Expediente 2014-02).

RESULTADOS

La seroprevalencia de ocurrencia natural de infección por *T. gondii* en animales silvestres criados en cautiverio fue de $77.1 \pm 4.4\%$, siendo mayor de 70% en animales de las órdenes Carnívora, Primates, Cetartiodactyla y Rodentia y de 56% en animales del orden Perissodactyla, resultado que denota una amplia distribución del agente infeccioso (Cuadro 3). Asimismo, el 53.9% (138/224) de los animales presentaron serología positiva asociada a títulos serológicos elevados (1/2048) en todas las órdenes en estudio, a excepción de los Peryssodactyla, cuyo máximo título fue de 1/512. Además, el 73.4% (188/256) de animales seroreactores a *T. gondii* mostraron principalmente anticuerpos IgG, compatibles con casos crónicos y solo el 26.6% (68/256) fueron compatibles con casos agudos (IgM), como resultado del examen de HAI-mercaptopetanol (Cuadro 3).

El análisis de regresión logística sin ajuste indicó que la variable sexo y alimentación no constituyeron factores de riesgo para la presentación de la parasitosis; sin embargo, hubo asociación estadística significativa ($p < 0.05$) con las variables orden, tiempo del animal en la institución y recinto de exhibición (Cuadro 4). El análisis de regresión logística múltiple ajustado a Stepwise (Cuadro 5) mostró que las variables independientes mantuvieron significancia ($p < 0.05$) estadística con algunos cambios en la magnitud de la asociación de los riesgos ajustados respecto

Cuadro 3. Comportamiento serológico anti-*T. gondii* en animales silvestres en cautiverio (Zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas), Lima, Perú (2014-2015)

Orden	Familia ¹	Titulación						Seropositivos / Total	Anticuerpo	
		1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048		IgM	IgG
Carnivora (76.0%)		6	7	6	10	4	24	57/75	38.0	66.7
	Ursidae	0	1	1	1	0	7	10/11	30	70
	Felidae	3	4	5	6	3	14	35/41	34.3	65.7
	Mustelidae	3	1	0	0	0	0	4/4	0	100
	Canidae	0	0	0	0	1	1	2/10	0	100
	Procyonidae	0	1	0	3	0	2	6/9	66.6	33.3
Primates (76.7%)		2	5	6	5	5	30	53/71	30.2	60.8
	Cebidae	0	3	4	2	2	21	32/35	9.4	90.6
	Aotidae	1	1	1	0	0	1	4/7	75	25
	Pitheciidae	1	0	0	1	2	2	6/17	66.7	33.3
	Atelidae	0	0	0	0	0	5	5/5	20	80
	Cercopithecidae	0	1	1	1	1	1	5/6	80	20
	Hominidae	0	0	0	1	0	0	1/1	100	0
Cetartiodactyla (82.1%)		6	3	8	11	8	74	110/134	23.6	76.4
	Bovidae	3	3	3	5	7	41	62/76	22.6	77.4
	Cervidae	2	0	4	4	0	19	29/32	17.2	82.8
	Camelidae	0	0	0	2	1	13	16/21	25	75
	Tayassuidae	1	0	1	0	0	0	2/4	100	0
	Giraffidae	0	0	0	0	0	1	1/1	100	0
Perissodactyla (56.2%)		5	6	2	5	0	0	18/32	5.6	94.4
	Tapiridae	1	1	0	4	0	0	6/15	16.7	83.3
	Equidae	4	5	2	1	0	0	12/17	0	100
Rodentia (90.0%)		2	1	1	4	0	10	18/20	33.3	66.7
	Dasyproctidae	1	0	1	2	0	1	5/7	60	40
	Caviidae	1	1	0	2	0	7	11/11	18.2	81.8
	Hystricidae	0	0	0	0	0	2	2/2	50	50
Total		21	22	23	35	17	138	256/332	26.6	73.4

¹ Ver las especies involucradas en los cuadros 1 y 2

de los riesgos crudos. Los órdenes Rodentia, Cetartiodactyla, Primates y Carnivora presentaron 8.77, 4.93, 3.60 y 2.61 veces más posibilidades de presentar anticuerpos contra *T. gondii*, respectivamente, que los animales del orden Perissodactyla. Asimismo, se encontró un incremento de la frecuencia

de *T. gondii* (72.5-88.6%) conforme se incrementa los años de permanencia en el centro en cautiverio (Cuadro 5), encontrándose que los animales con más de 10 años en la institución mostraron 4.18 veces más riesgo de infección que animales con permanencia de hasta 5 años ($p < 0.05$).

Cuadro 4. Factores de riesgo asociados a *Toxoplasma gondii* en animales silvestres en cautiverio (Zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas), Lima, Perú. Cálculo del Odds Ratio crudo (2014-2015)

Variables	N	Positivos =1/64	Frecuencia %	Odds ratio	IC 95%		Valor p
					Mínimo	Máximo	
Orden							
Perissodactyla	32	18	56.25	1			
Primates	71	53	74.65*	10.35	1.50	71.27	0.018
Carnivora	75	57	76.00	7.96	0.81	52.70	0.077
Cetartiodactyla	134	110	82.09*	7.41	2.69	20.38	0.000
Rodentia	20	18	90.00*	8.74	1.65	46.31	0.010
Sexo							
Machos	115	82	71.30	1			
Hembras	217	174	80.18	1.30	0.72	2.36	0.375
Tiempo en la institución							
0 a 5 años	182	132	72.53	1			
de 6 a 10	71	54	76.06	1.57	0.94	4.72	0.068
> 10 años	79	70	88.61*	4.89	2.44	16.12	0.000
Alimentación							
Herbívoro	200	156	78.00	1			
Omnívoro	86	64	74.42	0.19	0.050	1.37	0.11
Carnívoro	46	36	78.26	0.41	0.73	4.55	0.60
Exhibición							
Cerrado	32	18	56.25	1			
Abierto	300	238	79.33*	4.62	1.29	16.54	0.019
Total	332	256	77.1± 4.4				

* p<0.05

La seropositividad fue significativamente superior (p<0.05) en animales que eran mantenidos en recintos de exhibición abiertos (79.3%; Cuadro 4) en comparación aquellos que permanecían en recintos cerrados (56.25), mostrando OR: 3.99 (Cuadro 5).

La frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii* fue de 58.54% (24/41) en los gatos (*Felis silvestris* f. *catus*) y de 11.29% (14/124) en las ratas (Cuadros 6 y 7). Asimismo, la mayoría de los gatos expuestos a *T. gondii* evidenciaron la fase crónica de la infección

(IgG 95.8%, [23/24]) y el 66% (16/24) de gatos seropositivos mostraron títulos altos de anticuerpos (1/2048) (Cuadro 6).

No se observaron efectos significativos entre especie, sexo y edad de los roedores (*Rattus* spp) con la infección por *T. gondii* (Cuadro 7). Asimismo, el título más frecuente fue 1/64 (35.7%, [5/14]), seguido de 1/128 (28.57%, [4/14]) en los animales serorreac-tores, evidenciándose similar proporción de anticuerpos IgM (57.1% [8/14]) e IgG (42.9% [6/14%]) (Cuadro 8).

Cuadro 5. Factores de riesgo asociados a *Toxoplasma gondii* en animales silvestres en cautiverio, (Zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas), Lima, Perú. Cálculo de Odds Ratio ajustado¹ (2014-2015)

Variables	Odds Ratio	Intervalo de confianza 95%		Valor p
		Mínimo	Máximo	
Orden				
<i>Primates</i>	3.61	1.17	11.07	0.025
<i>Carnivora</i>	2.61	1.04	6.55	0.040
<i>Cetartiodactyla</i>	4.93	2.07	11.74	0.000
<i>Rodentia</i>	8.77	1.69	45.44	0.010
<i>Perissodactyla</i>	1			
Tiempo en la institución				
>10 años	4.18	1.84	9.48	0.001
≤5 años	1			
Exhibición (recinto)				
Abierto	3.99	1.37	11.6	0.011
Cerrado	1			

¹ Regresión logística múltiple ajustado a Stepwise

Cuadro 6. Frecuencia y respuesta serológica anti-*Toxoplasma gondii* en gatos (*Felis silvestris f. catus*) errantes libres en un Zoológico de Lima, Perú (2014-2015)

Sexo	Titulación						Seropositivos / Total	P% ±IC	Anticuerpo	
	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048			IgM	IgG
Hembras	0	1	1	0	0	5	7/15	46.67	14.3	85.7
Machos	1	2	1	2	0	11	17/26	65.38	0	100
Total	1	3	2	2	0	16	24/41	58.5±15.2	4.2	95.8

En la evaluación histopatológica e inmunohistoquímica se evidenciaron formas parasitarias quísticas (4%, [5/124]), principalmente en el diafragma, seguido del músculo estriado cardíaco de los roedores. Solo dos animales seroreactores positivos a *T. gondii*

con títulos de 1/4096 evidenciaron quistes tisulares 14.28% (2/14). Sin embargo, no se pudo demostrar la presencia de quistes de *T. gondii* mediante la técnica de inmunohistoquímica en los roedores que evidenciaron quistes tisulares.

Cuadro 7. Frecuencia anti-*Toxoplasma gondii* en roedores (*Rattus* spp) errantes libres en un Zoológico de Lima, Perú (2014-2015)

	N°	Positivos	P % ±IC _{95%}	X ²	Valor de p
Especie					
<i>Rattus rattus</i>	46	6	13.04	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	78	8	10.26	0.22	0.636
Sexo					
Hembras	60	4	6.67	-	-
Machos	64	10	15.63	2.48	0.115
Edad					
Juvenil-subadulto	92	9	9.78	-	-
Adulto	32	5	15.63	0.81	0.368
Total (% ± IC)	124	14	11.29 ± 6.0		

Cuadro 8. Comportamiento serológico anti-*T. gondii* en roedores (*Rattus* spp) errantes libres en el Zoológico del Patronato del Parque de las Leyendas, Lima, Perú (2014-2015)

Variable	Titulación							Seropositivos / Total	Anticuerpo	
	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096		IgM	IgG
Especie										
<i>Rattus rattus</i>	6	7	6	10	4	24		57/75	38.0	66.7
<i>R. norvegicus</i>	3	1	0	0	0	0	2	6/46	83.3	16.7
Sexo										
Hembras	1	2	0	1	0	0	0	4/60	25	75
Machos	4	2	2	0	0	0	2	10/64	70	30
Edad										
Juvenil-subadulto	4	2	1	1	0	0	1	9/92	77.8	22.2
Adulto	1	2	1	0	0	0	1	5/32	20	80
Total	5	4	2	1	0	0	2	14/124	57.1	42.9

DISCUSIÓN

Los parques zoológicos constituyen un ecosistema artificial cerrado y pueden albergar una amplia diversidad de agentes infecciosos y constituir una fuente de diseminación de patógenos parasitarios para los ani-

males silvestres del propio zoológico, animales sinantrópicos, funcionarios y público visitante (Silva *et al.*, 2007).

El presente estudio reportó 77% de ocurrencia de anticuerpos para la infección por *T. gondii* en mamíferos de los cinco órdenes en estudio, indicando que la infección por este

patógeno es frecuente en ese establecimiento. La seroprevalencia encontrada es una de las mayores que ha sido reportada en comparación con seroprevalencias entre 24.0 y 53.3% reportadas en otros parques zoológicos del continente americano (Smith y Frenkel, 1995; De Camps *et al.*, 2008, Minervino *et al.*, 2010; Pimentel *et al.*, 2009; Alvarado Esquivel *et al.*, 2013) y entre 33.3 y 34.5% en zoológicos europeos (Sedlák y Bártová, 2006; Alerte, 2008; Tidy *et al.*, 2017).

La comparación entre seroprevalencias de *T. gondii* en parques zoológicos es compleja debido a la variedad de especies silvestres con diversos hábitos de comportamiento, número de especímenes evaluados, técnica de diagnóstico serológico, punto de corte, condiciones climáticas y de higiene a las que se exponen los animales, así como la ubicación geográfica de los parques zoológicos (Sedlák y Bártová 2006; De Camps *et al.*, 2008). En este sentido, Sedlák y Bártová (2006) reportaron en zoológicos de la República Checa y Eslovaquia seroprevalencias de 34.7% (193/596) en mamíferos silvestres, pudiendo la diferencia ser debida, además, al uso de una técnica de mayor especificidad, como es la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Existe controversia al señalar la dispersión del agente infeccioso en animales silvestres en su habitat natural versus en cautiverio como es el caso de zoológicos. Minervino *et al.* (2010) señala un mayor riesgo de exposición al agente en animales silvestres en cautiverio en comparación a los de vida libre, dado que los animales en los zoológicos tienen mayores posibilidades de estrés ante las altas densidades de animales y tipos de dieta, además de mayores grados de consanguinidad (Scott, 1988).

El título más frecuente en los animales silvestres seropositivos fue de 1/2048 (53.9%) y solo el 8.2% presentó el título más bajo (1/64). Información sobre los niveles de anticuerpos es escasa. Damriyasa *et al.* (2004) proponen que la detección de bajos títulos de anticuerpos en animales puede de-

berse a la presencia de reacciones cruzadas con otros parásitos Apicomplexa (*Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocysts*), o una disminución de anticuerpos específicos de *T. gondii* posterior a una infección primaria.

La mayoría de los anticuerpos anti-*T. gondii* fueron IgG (73.4%, [188/332]), cuya presencia indicaría exposición del parásito en algún momento de la vida del animal; desarrollando generalmente una fuerte respuesta inmune, que persistiría toda su vida (Dubey, 2010). Por otro lado, la toxoplasmosis crónica no siempre puede permanecer latente y más aún en animales silvestres en cautiverio, los cuales soportan situaciones de estrés por múltiples motivos. Todo ello llevaría a la reactivación del parásito, conllevando que quistes tisulares conteniendo miles de bradizoitos se interconviertan a taquizoitos y desarrollen parasitemia activa nuevamente (Dubey, 2010).

Se conoce muy poco sobre las manifestaciones clínicas y lesionales ocasionadas por *T. gondii* en animales silvestres. En el estudio no fue posible observar en forma rutinaria a los animales en busca de signos clínicos relacionados al agente infeccioso; sin embargo, la detección de IgM como marcador de infección aguda (26.6%, [68/256]), indica que pudieron haberse presentado. Los signos clínicos pueden ser inespecíficos (pirexia, alteraciones digestivas, anorexia, debilidad progresiva, pérdida de peso, letargia, etc.) y pasar desapercibidos o ser fatales en especies susceptibles como canguros (Bermúdez *et al.*, 2009), guepardos (Lloyd y Stidworthy, 2007), gato de Pallas (Basso *et al.*, 2005) y monos ardillas (Cedillo-Peláez *et al.*, 2011). Es de mencionar que en el establecimiento se presentó, durante el estudio, un caso de toxoplasmosis activo en *Hystrix cristata* (puerco espín africano) asociado a signos neurológicos. El diagnóstico fue confirmado por serología (IgM) de HAI y luego de un tratamiento a base de sulfametoxazol + trimetropin 30 mg/kg i.m. durante cinco semanas presentó la remisión de algunos signos clínicos (ceguera), aunque le quedaron algunas secuelas neurológicas.

Los valores más altos de frecuencia a *T. gondii* en el presente estudio se registraron en los órdenes Rodentia (90%), Carnivora (85%) y Cetartiodactyla (82%), seguida del orden Primate (76%). Estos resultados difieren de otros reportes que describen una mayor susceptibilidad del orden Carnivora por el consumo de carne, llegándose a reportar hasta frecuencias de 100% (Sobrino *et al.*, 2007). Es posible que en este caso, animales de los órdenes Rodentia y Cetartiodactyla hayan presentado mayores niveles que en el orden Carnivora debido a que la infección es mantenida por la contaminación ambiental, donde los felinos domésticos jugarían un papel importante en la diseminación de ooquistes.

Los Perissodactyla registraron la frecuencia más baja (56%), lo cual podría ser explicado por el nivel de resistencia a la infección por *T. gondii* en equinos, lo que conlleva a la ausencia de signos clínicos en dichos animales (Al-Khalidi y Dubey, 1979; Silva, 2005; Dubey y Jones 2008; García-Bocanegra *et al.*, 2012).

La seroprevalencia de *T. gondii* en animales silvestres en cautiverio se ve influenciada por el tipo de recinto de exhibición de los animales. Aquellos en instalaciones abiertas o al aire libre presentaron 3.99 veces mayor probabilidad de presentar anticuerpos a *T. gondii* que aquellos en recintos cerrados, coincidiendo con el estudio de De Camps *et al.* (2008) en EEUU. La diferencia encontrada entre ambos tipos de recintos puede deberse a la facilidad con la que se puede producir el contacto con gatos y roedores en el zoológico en las instalaciones al aire libre, aumentando la probabilidad de ingestión de ooquistes y quistes tisulares.

El sexo no estuvo asociado a la seroprevalencia de *T. gondii*, tal y como lo reportó Lopes *et al.* (2011) en el norte de Portugal y Silva *et al.* (2007) en Brasil. Sin embargo, Miller *et al.* (2002) señalaron que mamíferos machos en vida libre son más propensos a la infección debido a que recorren

largas distancias para establecer y defender su territorio, teniendo, por lo tanto, mayores posibilidades de exposición al agente infeccioso.

La alta frecuencia de anticuerpos de anti-*T. gondii* en gatos errantes o asilvestrados que viven en el parque zoológico (58.5%) representa una alarmante situación y refuerza la importancia de estos animales en la epidemiología del parásito. Considerando el potencial de *T. gondii* en infecciones experimentales, se puede deducir que un gato asilvestrado en el parque zoológico puede excretar entre 20 a 150 millones de ooquistes durante su vida (Dubey, 1995). No se encontró estudios en este tipo de gatos para su comparación con los hallazgos en este trabajo; sin embargo, Silva *et al.* (2002) y Troncoso *et al.* (2015) señalan que gatos de la calle presentan altas seroprevalencias (27-52%) debido a un mayor riesgo de exposición por infección a través de ooquistes o de la ingestión de quistes tisulares de pájaros o roedores. Trabajos en gatos de Lima Metropolitana muestran una seroprevalencia inferior (11%) mediante la técnica de HAI (Cerro *et al.*, 2014).

Se podría postular que los leones, oncillas, otorongos, tigres, tigrillos, pumas y gatos de pajonal también podrían servir como hospederos definitivos y excretadores de ooquistes. El papel de felinos silvestres en la transmisión del parásito es incierto a diferencia de lo claramente establecido para felinos domésticos. La capacidad potencial de felinos silvestre para albergar a *T. gondii* ha sido demostrada en felinos en cautiverio en California, EEUU, donde 9 de 12 especies tuvieron anticuerpos anti-*T. gondii* (Riemann *et al.*, 1975). Estudios más recientes en Brasil mostraron tasas de prevalencia entre 52.8 y 66.7% (Silva *et al.*, 2007; André *et al.*, 2010; Ullmann *et al.*, 2010). Asimismo, se han realizado infecciones experimentales para determinar la excreción de ooquistes a través de las heces en jaguares (*Puma yagouaroundi*), ocelotes (*Felis pardalis*), linceos (*Lynx rufus*) y guepardos (*Acinonyx*

jubatus) (Mucker *et al.*, 2006). Sin embargo, el papel de estos felinos en la consiguiente contaminación ambiental es menos significativa que la del gato doméstico errante asilvestrado (Weiss y Kim, 2007).

Un factor importante para la infección con *T. gondii* fue el tiempo de exposición en cautiverio, encontrando un OR de 4.18 para el grupo expuesto mayor a 10 años en comparación a los otros. Los animales se encuentran en contacto continuo con el parásito, manteniendo una inmunidad activa y detectable a edades avanzadas (Dubey y Jones, 2008; Richomme *et al.*, 2010).

Los hábitos de alimentación no fueron un factor significativo para la ocurrencia de infección por *T. gondii*. Tanto herbívoros, carnívoros y omnívoros presentaron similares frecuencias en contraste a otros estudios que muestran mayores prevalencias en carnívoros (Smith y Frenkel, 1995; Dărăbus *et al.*, 2011). A pesar de que los carnívoros podrían ser más vulnerables debido a una dieta basada en carne fresca producto de la saca por sobrepoblación de ovejas, cabras, búfalos y sajinos del mismo parque zoológico, las cuales albergarían un alto número de quistes tisulares viables. La elevada seroprevalencia en los herbívoros del presente estudio sugiere que estos se exponen principalmente al parásito a través de la ingestión de ooquistes, provenientes de gatos errantes o a través de vectores mecánicos (ropa de los cuidadores, botas, equipo de limpieza, etc.), invertebrados o por roedores, además de aves capaces de moverse libremente en los ambientes (Hill y Dubey, 2002; Spencer *et al.*, 2004).

Los roedores (*Rattus* spp y *Mus musculus*) juegan un papel importante en el ciclo de vida de *T. gondii*, y constituyen la fuente principal de infección para gatos domésticos y silvestres. Sin embargo, la frecuencia en *Rattus* spp (11.29%) no se correlacionó con la tasa de frecuencia en gatos domésticos errantes (58.54%) en el parque zoológico. Estos resultados indicarían que las ratas podrían no ser la fuente principal de infec-

ción para los gatos, existiendo otro grupo alternativo de infección como ardillas, ratones y aves no evaluados en el presente trabajo. Se debe considerar asimismo, que las investigaciones en roedores (*Rattus* spp) han sido limitadas, y donde se muestra su baja positividad (Pellizzaro *et al.*, 2017).

Si bien se ha demostrado la persistencia del agente en varias especies silvestres, falta dilucidar la estructura genética de las cepas clonales implicadas en la población expuesta. Existe información sobre el aislamiento de *T. gondii* en fauna silvestre proveniente principalmente de América del Norte, pero también de Brasil (Yai *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2011; Cañón-Franco *et al.*, 2013; Vitalino *et al.*, 2014).

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede realizarse por métodos biológicos, serológicos, histológicos y moleculares, cada una con diferente sensibilidad, especificidad y blanco antigénico (Dubey *et al.*, 1995; Lind *et al.*, 1997). En el presente estudio se utilizó la técnica serológica de hemaglutinación indirecta, con un punto de corte ≥ 64 , prueba más accesible en el país, la cual se basa en la propiedad de los anticuerpos anti-*T. gondii* de producir aglutinación en la presencia de eritrocitos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito (Wiener Lab, 2008). Sin embargo, se requiere considerar las posibles reacciones cruzadas con otros Apicomplexos (*Neospora*, *Sarcocystis*) formadores de quistes tisulares que pertenecen a la misma familia (Sarcocystidae) y, por consiguiente, originar falsos positivos (Nishikawa *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

- Se detectó una alta frecuencia (77.11 ± 4.41 %) de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en animales silvestres en cautiverio de los órdenes Carnivora, Primates, Cetartiodactyla y Rodentia, con reactividad serológica mayormente

de IgG (73.4%, casos crónicos) y fuerte respuesta serológica (1/2048) en el 53.9% de los animales.

- Los factores de riesgo asociados a la transmisión de *T. gondii* para animales de los órdenes Carnivora, Primates, Cetartiodactyla y Rodentia fueron de OR: 2.6, 3.6, 4.9 y 8.7, respectivamente. Asimismo, animales con más de 10 años en el establecimiento (OR: 4.18) y mantenidos en recintos de exhibición abiertos (3.99) ($p < 0.05$).
- Roedores (*Rattus* spp) y gatos (*Felis silvestris* f. *catus*) errantes libres que deambulan en el centro en cautiverio exhibieron una baja (11.29 ± 6) y moderada (58.54 ± 15.2) frecuencia de anticuerpos anti-*T. gondii*, respectivamente.
- Se detectaron quistes tisulares en musculatura cardíaca y esquelética (diafragma) en el 4% (5/124) de los roedores evaluados; sin embargo, no se pudo demostrar la presencia de *T. gondii* mediante inmunohistoquímica.

LITERATURA CITADA

1. **Acha PN, Szyfres B. 2003.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y animales. 3^a ed. Vol III. Washington, EEUU: OPS. 312 p.
2. **Alerte VM. 2008.** Prévalence de *Toxoplasma gondii* sur les animaux d'un parc zoologique (Amneville): séroprévalence et isolement du parasite. Tesis Doctoral. Versailles, Francia: Université Paul-Sabatier de Toulouse. 131 p.
3. **Al-Khalidi NW, Dubey JP. 1979.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in horses. *J Parasitol* 65: 331-334.
4. **Alvarado-Esquivel C, Gayosso-Dominguez EA, Villena I, Dubey JP. 2013.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in captive mammals in three Zoos in Mexico City, Mexico. *J Zoo Wildlife Med* 44: 803-806. doi: 10.1638/2013-0032.1
5. **André MR, Adania CH, Teixeira RH, Silva KF, Jusi MM, Machado ST, et al. 2010.** Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *J Parasitol* 96: 1007-1009. doi: 10.1645/GE-2502.1
6. **Bankowski Z, Howard-Jones N. 1986.** International guiding principles for biomedical research involving animals (1985). Geneva: WHO. 28 p.
7. **Basso W, Edelhofer R, Zenker W, Möstl K, Küber-Heiss A, Prosl H. 2005.** Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. *Parasitology* 130: 293-299. doi: 10.1017/S0031182004006584
8. **Bermúdez R, Failde LD, Losada AP, Nieto JM, Quiroga MI. 2009.** Toxoplasmosis in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Spain. *Vet Parasitol* 160: 155-158. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.082
9. **Bernal D, Suárez, Huanca W, Chávez A. 2015.** Prevalencia de toxoplasmosis ovina en dos localidades de Puno, Perú *Rev Inv Vet Perú* 26: 291-295. doi: 10.15381/rivep.v26i2.11002
10. **García-Bocanegra I, Cabezón O, Arenas-Montes A, Carbonero A, Dubey JP, Perea A, Almería S. 2012.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in equids from Southern Spain. *Parasitol Int* 61: 421-424. doi: 10.1016/j.parint.2012.02.003
11. **Cañón-Franco WA, Araújo FA, López-Orozco N, Jardim MM, Keid LB, Dalla-Rosa C. 2013.** *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Vet Parasitol* 197: 462-469. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.019
12. **Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. 2011.** Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet Parasitol* 180: 368-371. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.012

13. **Cerro L, Rubio A, Pinedo R, Mendes-de-Almeida F, Brener B, Labarthe N. 2014.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*, Linnaeus 1758) living in Lima, Peru. *Rev Bras Parasitol* V 23: 90-93. doi: 10.1590/S1984-29612014013
14. **Cordero del Campillo M, Rojo FD, Martínez AR, Sánchez MC, Hernández S, Navarrete I, et al. 1999.** *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw Hill. 968 p.
15. **Cutler SJ, Fooks AR, Van der Poel WHM. 2010.** Public Health threat of new, reemerging and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis* 16:1-7. doi: 10.3201/eid1601.081467
16. **Damriyasa IM, Bauer C, Edelhofer R, Failing K, Lind P, Petersen E, Schares G, et al. 2004.** Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp and *Neospora caninum* in sows. *Vet Parasitol* 126: 271-286. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.016
17. **Dărăbus G, Afrenie M, Olariu RT, Ilie M, Balint A, Hotea 2011.** Epidemiological remarks on *Toxoplasma gondii* infection in Timisoara Zoo. *Sci Parasitol* 12: 33-37.
18. **De Camps S, Dubey JP, Saville WJA. 2008.** Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the Midwestern United States. *J Parasitol* 94: 648-653. doi: 10.1645/GE-1453.1
19. **Dubey JP 1995.** Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol* 81: 410-415. doi:10.2307/3283823
20. **Dubey JP, Jones JL. 2008.** *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 38: 1257-1278. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.00
21. **Dubey JP. 2010.** *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press. 313 p.
22. **Epiphanio S, Sinhorini IL, Catão-Dias, JL. 2003.** Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. *J Comp Pathol* 129: 196-204. doi: 10.1016/S0021-9975(03)00035-5
23. **Gómez O, Chávez A, Casas E, Serrano E. 2003.** Determinación de la seroprevalencia de toxoplasmosis en alpacas y llamas en la estación experimental INIA-Puno. *Rev Inv Vet Perú* 14 (Suppl 1): 49-53. doi: 10.15381/rivep.v14i1.1717
24. **Gorman TR, Rivoros V, Alcaino HA, Salas DR, Thiermann ER. 1986.** Helminthiasis and toxoplasmosis among exotic mammals at the Santiago National Zoo. *J Am Vet Med Assoc* 189: 1068-1070.
25. **Hill D, Dubey JP. 2002.** *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8: 634-640. 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x
26. **Hosmer D, Lemeshow S. 2000.** *Applied logistic regression*. New York: John Wiley. 375 p.
27. **Kataranovski D, Dataranovski M, Savic I, Cakic P, Soldatovic B, Matic R. 1994.** Morphometric and biochemical parameters as age indicators in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berk, 1769). *Acta Vet* 44: 371-378.
28. **Lacave IM, Caballero TG 2012.** *Atlas de inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales*. Díaz de Santos. 448 p.
29. **Lind P, Haugegaard J, Wingstrand A, Henriksen SA. 1997.** The time course of specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 71: 1-15.
30. **Lloyd C, Stidworthy MF. 2007.** Acute disseminated toxoplasmosis in a juvenile cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wildlife Med* 38: 475-478. doi: 10.1638/2007-0016.1
31. **Lopes AP, Sargo R, Rodrigues M, Cardoso L. 2011.** High seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in

- wild animals from Portugal. Parasitol Res 108: 1163-1169. doi: 10.1007/s00436-010-2158-6
32. **Luyo C, Pinedo R, Chávez A, Casas E. 2017.** Factores asociados a la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en cerdos de granjas tecnificadas y no tecnificadas de Lima, Perú. Rev Inv Vet Perú 28: 141-149. doi: 10.15381/rivep.v28i1.12930
 33. **Milazzo C, Cagnin M, Di Bella C, Geraci F, Ribas A. 2010.** Helminth fauna of commensal rodents, *Mus musculus* (Linnaeus, 1758) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia, Muridae) in Sicily (Italy). Rev Ibero-Latinoam Parasitol 69: 194-198.
 34. **Miller MA, Gardner IA, Kreuder C, Paradies DM, Worcester KR, Jessup DA, Dodd E, et al. 2002.** Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). Int J Parasitol 32: 997-1006. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00069-3
 35. **Mills J, Childs J, Ksiazek T, Peters CJ, Velleca WM. 1998.** Métodos para trapeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudio virológico. Washington, USA: Organización Panamericana de la Salud. 64 p. [Internet]. Disponible en: http://www.paho.org/spanish/HCP/HCT/hct_98104.pdf
 36. **Minervino AH, Soares HS, Barreto-Junior RA, Neves KA, Pena HF, Ortolani EL, Dubey JP, et al. 2010.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. J Zoo Wildlife Med 41: 572-574. doi: 10.1638/2010-0046.1
 37. **Mucker EM, Dubey JP, Lovallo MJ, Humphreys JG. 2006.** Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Pennsylvania bobcat (*Lynx rufus rufus*). J Wildlife Dis 42: 188-191. doi: 10.7589/0090-3558-42.1.188
 38. **Muñoz E, Chávez A, Casas E, Suárez F, Gavidia C, Muñoz K, Gutiérrez F. 2005.** Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en monos *Cebus apella* criados en cautiverio. Rev Inv Vet Peru 16: 163-168. doi: 10.15381/rivep.v16i2.1565
 39. **Navarro D, Chávez A, Pinedo R, Muñoz K. 2015.** Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en mamíferos del orden Carnivora y Primates mantenidos en cautiverio. Rev Inv Vet Perú 26: 497-508. doi: 10.15381/rivep.v26i3.11175
 40. **Nishikawa Y, Claveria FG, Fujisaki K, Nagasawa H. 2002.** Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. J Vet Med Sci 64: 161-164.
 41. **Pavlin BI, Schloegel LM, Daszak P. 2009.** Risk of importing zoonotic diseases through wildlife trades, United States. Emerg Infect Dis 15: 1721-1726. doi: 10.3201/eid1511.090419
 42. **Pellizzaro MI, Conrado FO, Martins CM, Joaquim SF, Ferreira F, Langoni H, Biondo AW. 2017.** Serosurvey of *Leptospira* spp and *Toxoplasma gondii* in rats captured from two zoos in Southern Brazil. Rev Soc Bras Med Tro 50: 857-860. doi: 10.1590/0037-8682-0138-2017.
 43. **Pena HF, Marvulo MF, Horta MC, Silva MA, Silva JC, Siqueira DB, Lima PA, et al. 2011.** Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. Vet Parasitol 175: 377-381. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.015
 44. **Pimentel JS, Gennari MS, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos AS, Morais, ZM, Silva JCR, et al. 2009.** Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens

- neotropicais do zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesqui Vet Brasil* 29: 1009-1014. doi: 10.1590/S0100-736X2009001200010.
45. **Richomme C, Afonso E, Tolon V, Ducrot C, Halos L, Alliot A, Perret C, et al. 2010.** Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean island. *Epidemiol Infect* 138: 1257-1266. doi: 10.1017/S09502688-10000117
 46. **Riemann HP, Behymer DE, Fowler ME, Schulz T, Lock A, Orthoefer JG, Silverman S, et al. 1975.** Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in captive exotic mammals. *J Am Vet Med Assoc* 165: 798-800.
 47. **Ruiz N, Casas E, Suarez F, Díaz D, Fernández V. 2012.** Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en canes con signos clínicos de afección neuromuscular. *Rev Inv Vet Peru* 23: 441-447.
 48. **Scott M. 1988.** The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation. *Conservation Biology* 2: 40-56. doi: 10.1111/j.1523-1739.1988.tb00334.x
 49. **Sedlák K, Bartová E. 2006.** Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet Parasitol* 136(Suppl 3-4): 223-231. doi: 10.1016/j.vetpar.-2005.11.021
 50. **Silva JC, Gennari SM, Ragozo AM, Amajones VR, Magnabosco C, Yui LE, Ferreira-Neto JS, et al. 2002.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. *J Parasitol* 8: 419-420. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0419:POTGAI]2.0.CO;2
 51. **Silva JC, Marvulo MFV, Días RA, Ferreira F, Amaku M, Adania CH, Ferreira-Neto JS. 2007.** Risk factors associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Prev Vet Med* 78: 286-295. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.10.013
 52. **Silva RA. 2005.** Antibodies to toxoplasmosis in horses from Pantanal, Brazil. *Vet Zootec* 12: 20-25
 53. **Smith DD, Frenkel JK. 1995.** Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and East Central Kansas biologic and ecologic considerations of transmission. *J Wildlife Dis* 31: 15-21. doi: 10.7589/0090-3558-31.1.15
 54. **Sobrinho R, Cabezon O, Millan J, Pabon M, Arnald MC, Luco DF, et al. 2007.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 148: 187-192. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.038
 55. **Spencer JA, Joiner KS, Hilton CD, Dubey JP, Toivio-Kinnucan M, Minc JK, Blagburn BL. 2004.** Disseminated toxoplasmosis in a captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *J Parasitol* 90: 904-906. doi: 10.1645 / GE-249R
 56. **Tidy A, Fangueiro S, Jitender P, Dubey, Cardoso L, Lopes AP. 2017.** Seroepidemiology and risk assessment of *Toxoplasma gondii* infection in captive wild birds and mammals in two zoos in the North of Portugal. *Vet Parasitol* 235: 47-52. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.01.004
 57. **Troncoso IE, Uribe PA, Arrué KC, Valenzuela AA, Wiethuchter C. 2015.** Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en gatos (*Felis catus*, Linnaeus 1758) residentes en San Carlos, Chile. *Rev Med Vet* 29: 23-31. doi: 10.19052/mv.3443
 58. **Ullmann LS, Da Silva RC, De Moraes W, Cubas ZS, dos Santos LC, Hoffmann JL, Moreira N, et al. 2010.** Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern Brazil. *Vet Parasitol* 172:144-146. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.013
 59. **Vitaliano SN, Soares HS, Pena HFJ, Dubey JP; Gennari SM. 2014.** Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. *J Zoo Wildl Med* 45:197-199. doi: 10.1638/2013-0179R.1

60. **Weiss LM, Kim K. 2007.** *Toxoplasma gondii* – The model apicomplexan: perspectives and methods. London, UK: Academic Press. 1085 p.
61. **Wiener Lab. 2008.** Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI), para la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*. Argentina [Internet]. Disponible en: http://www.wiener-lab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6395_toxotest_hai_sp.pdf
62. **Yai LE, Ragozo AM, Soares RM, Pena HF, Su C, Gennari SM. 2009.** Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Vet Parasitol* 162: 332-333. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.03.007