

Toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio en Cuernavaca, Morelos, México

Toxoplasmosis outbreak in a private collection of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Cuernavaca, Morelos, Mexico

Adriana Méndez Bernal*** Ileana Martínez Ramos*
Bernardo Saucedo Garnica* José Ramírez Lezama*

Abstract

Toxoplasmosis is a disease of worldwide distribution that parasites the intestinal tract of wild and domestic cats. However, in New World monkeys it is considered an acute and fatal illness. The reason for its high susceptibility in this particular species is still unknown, but it has been theorized that their habitat and living conditions, in high trees, might be an important factor. Necropsy was performed on 5 squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), three males (adult) and two females (one of them gravid), with a clinical history of eye redness and presence of bloody serous foam in the nostrils. Gross examination of the lung showed non collapsed lobes, dark red parenchyma and irregular pale pink nodular areas. All five animals showed apparent hepatomegaly. Histological findings revealed an interstitial pneumonia with a prominent thickening of alveolar septae, and numerous foamy macrophages with intracytoplasmic basophilic structures 20- 25 μ m long, covered by a refringent wall and housing PAS positive basophilic structures that were approximately 8 μ m long (bradyzoites), which were identified as protozoal cysts. The liver showed multiple foci of periportal inflammatory cells and numerous parasitic cysts that were also observed in spleen and brain tissue. Immunohistochemical technique was performed on selected samples of brain, liver and lung tissue, which resulted positive for *Toxoplasma gondii* using antibodies of hyperimmune antiserum-caprine 6244 origin, in a 1:300 dilution. Samples of the same tissues were processed for transmission electron microscopy. Hepatocytes of the liver showed multiple intracytoplasmic vacuoles with parasitic structures consistent with tachyzoites, which were 3.6 μ m long and measured 2.3 μ m in diameter. They possessed a slightly wavy electron dense plasma membrane that exhibited a conoid in its anterior end, along with several electron dense micronemes. Ultrastructural features like the conoid and the location of micronemes allowed us to identify the parasite as *Toxoplasma gondii*. Clinical history, necropsy findings, microscopic examination, immunohistochemical analysis and electron microscopy of all five squirrel monkeys were consistent with a diagnosis of systemic toxoplasmosis. This report shows the high susceptibility of New World monkeys to become infected with this parasite. Therefore, toxoplasmosis should be considered among the differential diagnosis for diseases with non specific clinical signs in this particular species.

Key words: TOXOPLASMOSIS, SQUIRREL MONKEY, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, ELECTRON MICROSCOPY.

Resumen

La toxoplasmosis es una enfermedad de distribución mundial provocada por el protozoario *Toxoplasma gondii* cuyos huéspedes definitivos son los felinos y una gran diversidad de especies animales son los huéspedes intermediarios. En primates del Nuevo Mundo se caracteriza por ser una enfermedad aguda y de curso fatal. La razón de la alta susceptibilidad en estos animales hasta la fecha se desconoce y generalmente se ha asociado con sus hábitos arborícolas. Se realizó la necropsia de cinco monos ardilla (*Saimiri sciureus*), tres machos (adultos) y dos hembras (una de ellas gestante), con historia clínica de enrojecimiento de los ojos y salida de espuma serosanguinolenta por la nariz. Macroscópicamente, los cinco animales presentaron los lóbulos pulmonares no colapsados y el parénquima rojo oscuro con áreas rosa claro entremezclado que en ocasiones tenían aspecto nodular. El hígado de los cinco animales se apreció aumentado de tamaño y pálido en su totalidad. Microscópicamente se observó neumonía intersticial caracterizada por el engrosamiento de los septos alveolares y la presencia de numerosos macrófagos espumosos cuyo citoplasma contenía estructuras elongadas, basofílicas de 20-25 μ m de diámetro con pared refringente que a su vez

Recibido el 24 de junio de 2010 y aceptado el 10 de marzo de 2011.

* Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

** Unidad de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF. Correo electrónico: mvzadrimb@gmail.com

albergaban estructuras basófilas de 8 μm (bradizoitos) PAS positivas consistentes con quistes de protozoarios. El hígado presentó focos de infiltrado inflamatorio periportal, así como numerosos quistes de protozoarios, que también se apreciaron en bazo y cerebro. Se realizó inmunohistoquímica de secciones histológicas de pulmón, hígado y cerebro, las cuales fueron positivas para *Toxoplasma gondii* con el anticuerpo Hyperimmune antiserum-caprine, a una dilución de 1:300. Asimismo, muestras de estos mismos tejidos fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión, en las que el hígado exhibía en su citoplasma vacuolas parasitarias con estructuras correspondientes a taquizoitos que medían de 3.6 μm de largo por 2.3 μm de diámetro, con una membrana plasmática electrodensa, ligeramente ondulada, que en ocasiones exhibían en su extremo anterior el conoide, y por debajo de éste, escasos micronemas electrodensos. Las características ultraestructurales como el conoide, y la ubicación de los micronemas, son criterios primordiales que permiten identificar al parásito como *Toxoplasma gondii*. La historia clínica, los hallazgos a la necropsia, el estudio histopatológico, la inmunohistoquímica y microscopía electrónica de los cinco monos ardilla fueron consistentes con un cuadro de toxoplasmosis sistémica. Este informe demuestra la alta susceptibilidad que poseen los primates del Nuevo Mundo al ser infectados por este protozoario, por lo que se debe considerar entre los diagnósticos diferenciales para enfermedades de curso clínico no específico en estos animales.

Palabras clave: TOXOPLASMOSIS, MONO ARDILLA, INMUNOHISTOQUÍMICA, MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Introduction

The protozoon *Toxoplasma gondii* is a parasite with a worldwide distribution. It is a coccidian that infects the intestine of domestic and wild felines, which are definitive hosts. Anti-*Toxoplasma* antibodies have been frequently found in wild and captive felines, such as: lions, ocelots, lynx, cheetahs and panthers, and it has been reported in red and gray foxes, raccoons, red pandas, black bears, Kodiak bears and Polar bears, it has also been described in minx and ferrets especially in newborns.^{1,2} There are several studies on toxoplasmosis in New World monkeys, where it is reported that the disease is usually acute and fatal; the reason for their high susceptibility is unknown; however, it is associated with their arboreal habits that have isolated them during the course of evolution.¹⁻⁷

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite.³ The tachyzoite is the vegetative form with active proliferation, which is observed in acute, disseminated infections and can be found in blood, secretions and wide variety of tissues. The parasite has a characteristic crescent shape; it measures 4-8 $\times$ 2-4 micrometers long; it has a wide rounded end and a big central nucleus. This stage of the parasite only survives few hours in dead animal tissue. The bradyzoite is considered the latent state of *Toxoplasma*, it is found within the tissue cysts and it is present in infections that can be congenital or acquired, chronic or asymptomatic.^{2,8,9} The oocyst, which is eliminated in feline feces after ingestion of any of the three infective forms (tachyzoites, bradyzoites and oocysts), is the result of a sexual multiplication stage in its small intestine. The oocysts are highly resistant and can survive in the environment for several months, they sporulate two to four days after elimination and become infectious in a wide variety of hosts.^{10,12}

Two different cycles have been established: an enteroepithelial cycle that takes place in the small

Introducción

El protozoario *Toxoplasma gondii* es un parásito de distribución mundial, es una coccidia que parasita el intestino de felinos domésticos y silvestres, que son los huéspedes definitivos. Anticuerpos anti-*Toxoplasma* se han encontrado frecuentemente en felinos silvestres y en cautiverio, como leones, ocelotes, lince, cheetas y panteras, y se ha registrado en zorros rojos y grises, mapaches, pandas rojos, osos negros, osos Kodiak y osos Polares, además se han descrito en minks y hurones especialmente en neonatos.^{1,2} Existen diversos trabajos sobre toxoplasmosis en primates del Nuevo Mundo, en los cuales se informa que la enfermedad suele ser aguda y fatal; la razón de su alta susceptibilidad se desconoce; sin embargo, se asocia con sus hábitos arborícolas, que les ha proporcionado aislamiento durante el transcurso de la evolución.¹⁻⁷

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado.³ El taquizoito es la forma vegetativa con proliferación activa, que se observa en las infecciones agudas, diseminadas y puede hallarse en sangre, secreciones y una amplia variedad de tejidos. Tiene forma de media luna, mide 4-8 $\times$ 2-4 micrómetros; uno de sus extremos es más ancho y redondeado y posee un núcleo grande central. Esta fase del parásito sobrevive pocas horas en los tejidos de animales muertos. El bradizoito es considerado la forma en reposo de *Toxoplasma*, se encuentra dentro de los quistes tisulares y se halla presente en las infecciones tanto congénitas como adquiridas, crónicas o asintomáticas.^{2,8,9} El ooquiste, que se elimina en las heces de felinos después de la ingestión de cualquiera de las tres formas infectantes (taquizoitos, bradizoitos y ooquistes), es el resultado de una fase de multiplicación sexual en su intestino delgado. Los ooquistes son muy resistentes y pueden sobrevivir en el medio ambiente durante varios meses, esporulan dos a cuatro días después de la eliminación y se tornan infecciosos en una gran variedad de huéspedes.¹⁰⁻¹²

intestine of felines, with production of oocysts; and an extraintestinal cycle that involves bradyzoites and tachyzoites.

The first cycle develops only in members of the Felidae family, while the second one can take place in any warm blooded animal.^{1,3,9,11,13} The cycle appears to be more active in felines when infestation occurs by bradyzoites ingestion, gastric juices can dissolve the cyst walls, but its action over bradyzoites is delayed, and they can survive approximately 6 hours. Each cyst can contain thousands of bradyzoites, which can increase the infection risks considerably. The extraintestinal cycle occurs in any species of mammal other than felines, and it occurs mainly through binary division. Infecting forms, released from bradyzoites or from oocysts, penetrate the lymphatic system and disseminate in blood through macrophages. This infection phase happens when multiplication intensifies, and the parasites penetrate a large quantity of cells that can be subsequently destroyed or phagocytosed.^{5,8,11-13}

There are several diagnostic techniques which are applied on live animals. Clinical pathology tests usually show severe leukopenia in serious cases. Hypoalbuminemia and hypoproteinemia can also be common in the acute stage of the disease. Tachyzoites in bodily fluids, pleural or peritoneal discharges are evident in cytology during the acute stage. It can be difficult to differentiate *Toxoplasma gondii* oocysts from other morphologically similar parasites in a stool sample, which is why the obtained material should be inoculated in mice so that ultimately leads to the development of characteristic lesions and isolation of *Toxoplasma*. This is a highly risky method because an infectious zoonotic agent is being handled. PCR tests are done to distinguish *Toxoplasma* oocysts from other protozoa with a similar morphology. Serological tests like ELISA for IgG and IgM, direct agglutination and indirect immunofluorescence are useful tools in the diagnosis of this disease.

Direct diagnostic techniques include: histopathological studies, where lesions such as interstitial pneumonia, necrotic hepatitis, lymphadenitis, among others, and protozoa cysts as well as tachyzoites.

Immunohistochemistry is used for detecting *Toxoplasma gondii* specific antigen. Electron microscopy is fundamental for identifying and differentiating the protozoa ultrastructure, as well as molecular techniques such as PCR (polymerase chain reaction) that constitute a sensitive and specific methodology that allows the identification of genic segments by selective amplification of particular DNA sequences, from blood, urine, cerebrospinal fluid, vitreous humor, amniotic fluid and tissues.^{1,3,5-7,14,15}

Se han establecido dos ciclos distintos; uno enteroepitelial en intestino delgado de los felinos, con producción de ooquistes; y un ciclo extraintestinal que involucra bradizoítos y taquizoítos.

El primer ciclo ocurre solamente en miembros de la familia *Felidae*, mientras que el segundo ocurre en cualquier animal de sangre caliente.^{1,3,9,11,13} El ciclo en los felinos parece ser más activo cuando la infestación ocurre por ingestión de bradizoítos, ya que los jugos gástricos disuelven la pared del quiste, pero se retarda su acción sobre los bradizoítos, los cuales alcanzan a sobrevivir más o menos 6 horas, y como cada quiste puede contener miles de bradizoítos, la posibilidad de infección es alta. El ciclo extraintestinal ocurre en cualquier especie de mamífero diferente de los felinos, y especialmente se trata de una multiplicación de tipo binario. Las formas infectantes, liberadas de los bradizoítos o de los ooquistes, penetran en principio en el sistema linfático y luego se diseminan en sangre dentro de los macrófagos. Esta fase de la infección es cuando la multiplicación se intensifica rápidamente, ocurre la invasión de gran cantidad de células de todo tipo, las cuales pueden ser destruidas o fagocitadas.^{5,8,11-13}

Existen diversas técnicas de diagnóstico que se aplican en animales vivos, como las pruebas de patología clínica, entre ellas el hemograma en el cual puede apreciarse leucopenia en los casos graves. Las pruebas bioquímicas revelan hypoalbuminemia e hipoproteinemia en la etapa aguda de la enfermedad. Por citología pueden observarse taquizoítos en líquidos corporales, en la etapa aguda, por ejemplo en los derrames pleurales y peritoneales. En el examen parasitológico de heces en félidos, los ooquistes de *Toxoplasma gondii* son similares morfológicamente a los de otros parásitos de esta misma familia, motivo por el cual debe inocularse el material sospechoso en ratones, en los cuales se producen lesiones características y se puede aislar el *Toxoplasma*. Este método es muy riesgoso por el manejo de un agente infeccioso zoonótico. Asimismo, se realiza examen de PCR para descartar que se trate de ooquistes con morfología similar a otros protozoarios. Por lo cual las pruebas serológicas son más eficientes en el diagnóstico de esta enfermedad, como son las pruebas de ELISA para IgG e IgM, la aglutinación directa e inmunofluorescencia indirecta.

Las técnicas de diagnóstico directas incluyen: estudios histopatológicos, en los que se pueden observar lesiones como neumonía intersticial, hepatitis necrótica, linfadenitis, entre otras, y los quistes protozoarios así como taquizoítos.

La inmunohistoquímica se emplea para la detección de antígeno específico de *Toxoplasma gondii*. La microscopia electrónica es fundamental para la

Material and methods

Clinical record

Five squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), three males (adults) and two females (one of them pregnant) were submitted for *post mortem* studies to the Departamento de Patología of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Nacional Autónoma de México. The animals were part of a group of nine individuals, whose clinical record referred only sudden death with eye reddening and bloody foam discharge from the nose. Based on clinical signs and species, the main differential diagnoses considered were: viral disease (*Hantavirus*) and intoxication.

Necropsy

Post mortem studies of the five referred animals was performed and samples from lungs, liver, spleen, lymph node and brain were collected for histopathological study.

Results

In the five squirrel monkeys, findings at necropsy were similar, except for the severity of the lesions. At external inspection, all five animals showed good body condition, three of them poorly preserved and two of them well preserved (Figure 1). While making an incision in the thoracic cavity, lungs of four monkeys did not collapse and 80% of the surface was dark red with intermingled light pink areas that occasionally had nodular aspect. In all five animals a discrete liver enlargement was observed and 100% of the parenchyma was pale with a slightly increased lobulated pattern.



Figura 1. Inspección externa de los cinco monos ardilla, que presentaron buena condición corporal.

Figure 1. External inspection of the five squirrel monkeys that showed well preserved condition.

identificación y diferenciación de la ultraestructura del protozooario, así como el uso de técnicas moleculares como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que constituye una metodología sensible y específica que permite la identificación de segmentos génicos mediante la amplificación selectiva de secuencias de ADN particulares, a partir de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo, líquido amniótico y tejidos.^{1-3,5-7,14,15}

Material y métodos

Historia clínica

Fueron remitidos para el estudio *post mortem* al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, cinco monos ardilla (*Saimiri sciureus*), tres machos (adultos) y dos hembras (una de ellas gestante), que formaban parte de un grupo de nueve individuos, cuya historia clínica incluye únicamente muerte súbita con enrojecimiento de los ojos y salida de espuma sanguinolenta por la nariz. Con base en los signos y la especie, los principales diagnósticos diferenciales que se consideraron fueron: una enfermedad viral (*Hantavirus*) y una intoxicación.

Necropsia

Se llevó a cabo el estudio *post mortem* de los cinco animales referidos y se recolectaron muestras de pulmón, hígado, bazo, linfonodo y encéfalo para su estudio histopatológico.

Resultados

En los cinco monos ardilla, los hallazgos a la necropsia fueron similares, variando sólo el grado de severidad de las lesiones. A la inspección externa, los cinco animales presentaron buena condición corporal, tres de ellos en mal estado de conservación y dos en buen estado de conservación (Figura 1). Al incidir la cavidad torácica, los pulmones de cuatro de los monos no colapsaron y el 80% de la superficie era roja oscura con áreas rosa pálido entremezcladas, que en ocasiones tenían aspecto nodular. En los cinco animales se apreció discreto aumento en el tamaño del hígado y 100% del parénquima era pálido con el patrón lobulillar ligeramente incrementado.

Aspectos microscópicos

Los tejidos recolectados se conservaron en formalina amortiguada al 10%, fueron deshidratados e incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 4 a 5 μ m de grosor, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) y

Microscopic aspects

Collected tissues were fixed in buffered formaldehyde at 10%, they were dehydrated and included in paraffin. Cuts of 4 to 5 μm were stained with hematoxylin and eosin (H & E) and stained with the method of periodic acid-Schiff (PAS).

Various sections of pulmonary tissue were examined. Interstitial pneumonia was observed, characterized by thickening of alveolar septae by erythrocytes and inflammatory infiltrate consisting mainly on foamy macrophages, lymphocytes and plasma cell. Foamy macrophages filled the alveolar spaces and some of them showed rounded and elongated basophilic structures with a diameter ranging from 20 to 25 μm . The cysts were PAS positive and had a refringent wall, which contained numerous basophilic structures of 8 μm (bradyzoites). Abundant homogenous eosinophilic material compatible with edema was also observed (Figure 2).

The liver showed necrotic hepatitis, characterized by foci of cellular debris. Parasitic structures were observed at the periphery of the parenchyma. They were rounded or ovoid, basophilic, with a diameter that ranged from 20 to 25 μm , and contained numerous slightly basophilic structures of 8 μm (bradyzoites) consistent with protozoal cysts. There was also marked disassociation of hepatic chords and zones plagued with aggregates of degenerated neutrophils and lymphocytes close to the periportal areas (Figure 3, 4).

In brain sections, the neuropil showed proliferation of glial cells and some of these cells surrounded neuronal bodies. Likewise, the neuropil exhibited rounded to oval basophilic structures of 20 to 25 μm in diameter, and contained numerous basophilic structures of 8 μm , consistent with protozoa cysts (Figure 5).

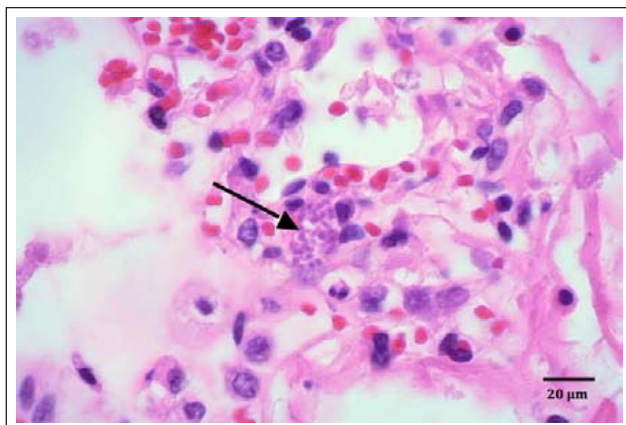


Figura 2. Quiste de *Toxoplasma gondii* en el citoplasma de una célula epitelial del pulmón (flecha). H & E. 40X.

Figure 2. *Toxoplasma gondii* cyst within the cytoplasm epithelial cell of the lung (arrow). H & E. 40X.

posteriormente con la tinción de histoquímica: ácido peryódico de Schiff (PAS: periodic acid-Schiff).

Se revisaron diferentes secciones de tejido pulmonar, en los que se observó neumonía intersticial, caracterizada por engrosamiento de los septos alveolares por infiltrado inflamatorio compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, así como por abundante cantidad de eritrocitos. En la luz de los alvéolos había macrófagos espumosos, algunos de ellos mostraron en el interior de su citoplasma estructuras redondas a elongadas, basofílicas de 20-25 μm de diámetro con pared refringente, que contenían numerosas estructuras basofílicas de 8 μm (bradizoítos), PAS positivas consistentes con quistes protozoarios, asimismo, se observó abundante material eosinofílico homogéneo compatible con edema (Figura 2).

El hígado presentó hepatitis necrótica, caracterizada por focos de restos celulares que en la periferia tenían estructuras redondas a ovaladas, basofílicas que medían de 20 a 25 μm de diámetro, y que contenían numerosas estructuras ligeramente basofílicas de 8 μm (bradizoítos) consistente con quistes protozoarios, así como disociación de los cordones hepáticos y zonas con infiltrado inflamatorio en la zona periportal compuesto por neutrófilos degenerados y en menor cantidad linfocitos (Figuras 3 y 4).

En las secciones de cerebro, el neuropilo mostró proliferación de células de la glía y algunas de estas células rodeaban cuerpos neuronales. Asimismo, el neuropilo exhibió estructuras redondas a ovaladas, basofílicas de 20 a 25 μm de diámetro, y que contenían numerosas estructuras basofílicas de 8 μm , consistente con quistes protozoarios (Figura 5).

En el bazo no se apreció población linfoide, pero sí numerosas estructuras parasitarias con características

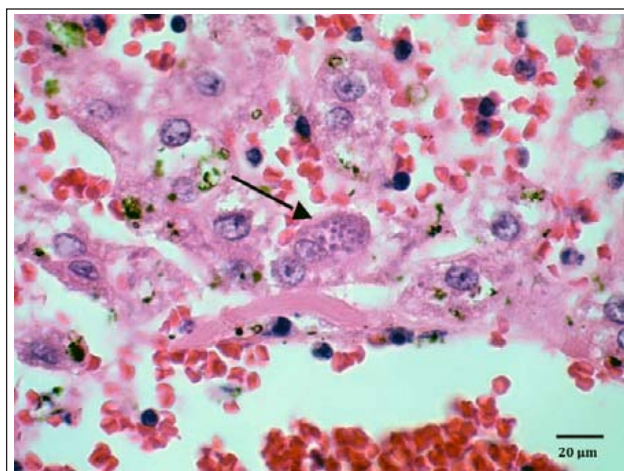


Figura 3. Quiste de *Toxoplasma gondii* en el citoplasma de un hepatocito (flecha). H & E. 100X.

Figure 3. *Toxoplasma gondii* cyst within the cytoplasm of a hepatocyte (arrow). H & E. 100X.

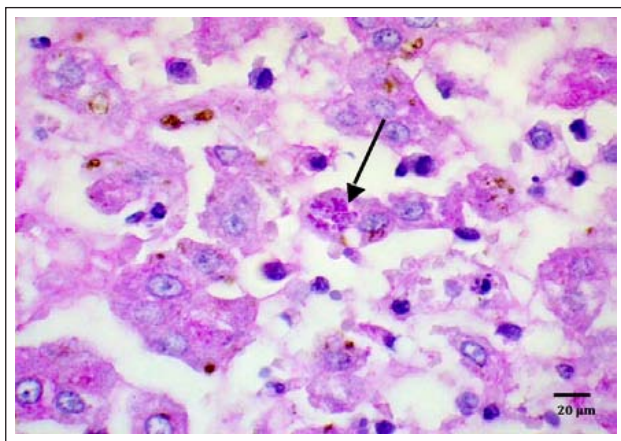


Figura 4. Quiste de *Toxoplasma gondii* PAS positivo en el citoplasma de un hepatocito (flecha). PAS. 40X.

Figure 4. *Toxoplasma gondii* cyst, PAS positive, within the cytoplasm of a hepatocyte (arrow). PAS. 40X.

In spleen, no lymphoid population was observed, but numerous parasitic structures with morphological features similar to the ones described in lung, liver and brain were found.

Immunohistochemical technique was used as an auxiliary test to prove the presence of *Toxoplasma gondii* antigen and electron microscopy for characteristic ultrastructural identification of the protozoon.

Immunohistochemistry

For this test, sections of lung, liver and brain fixed in formaldehyde at 10% were used, which were dehydrated and paraffin embedded. Afterwards, cuts of 4 μ m in thickness were done and then placed in slides covered with poli-L-lisine. As primary antibody, a commercial antibody was used: hyperimmune antiserum-caprine origin 6244,* at 1: 300 dilution and as secondary antibody biotin SP- conjugated AfinityPure rabbit anti-goat IgG (H+L).** In order to magnify the immunological reaction, avidin-biotin peroxidase complex (ABC) was used, using reactor package from ZYMED.***

Histological sections of lung, liver and brain were examined, in which multiple structures with immunopositivity to *Toxoplasma gondii*, in the interior of alveolar macrophages, as well as in cytoplasm of hepatocytes and the neuropil were observed (Figure 6,7).

Electron microscopy

From the tissues obtained from the *post mortem* study, which were fixed in formaldehyde at 10%, lung, liver and brain were recovered. These tissues were washed with cacodylate buffered solution, fixed with osmium tetroxide at 1% and washed in buffered

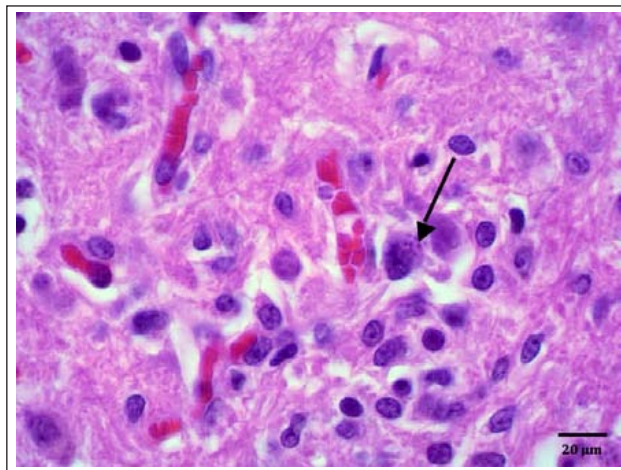


Figura 5. Áreas de gliosis en el neurópilo con quistes de *Toxoplasma gondii* (flecha). H & E. 40X.

Figure 5. Gliosis areas within the neuropil with *Toxoplasma gondii* cyst (arrow). H & E. 40X.

morfológicas similares a las descritas en pulmón, hígado y cerebro.

Como pruebas auxiliares se empleó la técnica de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia del antígeno de *Toxoplasma gondii*, y la microscopía electrónica para la identificación ultraestructural característica del protozoario.

Inmunohistoquímica

Para esta prueba se seleccionaron secciones de pulmón, hígado y cerebro fijadas en formalina al 10%, las cuales fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes de 4 μ m de grosor, que se colocaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo comercial: antisuero hiperinmune caprino origen 6244,* a una dilución de 1:300 y como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo biotin SP-conjugated AfinityPure rabbit anti-goat IgG (H+L).** Posteriormente, para magnificar la reacción inmunológica se utilizó el complejo avidina-biotina-peroxidasa (CAB) empleando el paquete de reactivos de ZYMED.***

Se revisaron secciones histológicas de pulmón, hígado y cerebro, en las que se observaron múltiples estructuras con inmunopositividad a *Toxoplasma gondii*, en el interior de los macrófagos alveolares, así como en el citoplasma de los hepatocitos y en el neurópilo (Figuras 6 y 7).

*VMRD, Inc. # de Catalogo 6244. Lote 111392, USA.

**Jackson ImmunoResearch, Laboratorie Inc. Lote 68958, USA.

***ZYMED 95-6143. Lote 50481616, USA.

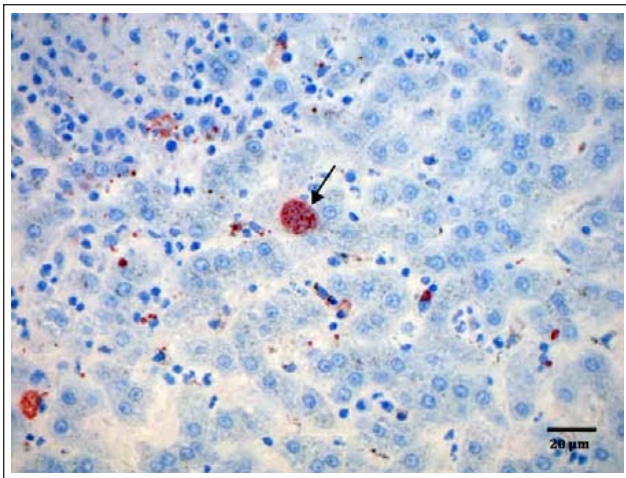


Figura 6. Immunopositivity to *Toxoplasma gondii* in the cytoplasm of a hepatocyte (arrow). Immunohistochemistry. 40X.

Figure 6. Immunopositivity to *Toxoplasma gondii* in the cytoplasm of a hepatocyte (arrow). Immunohistochemistry. 40X.

solution of cacodylate with pH of 7.2 at 0.1 M. Tissues were dehydrated with increasing concentrations of acetone, embedded in epoxy resins (Epon 812), and polymerized at 60°C for 24 hours. Later, semi-thin cuts were contrasted with toluidine blue. Next, thin cuts of 60 μm were performed, mounted in copper grating, contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed in an electron microscope.*

Ultrathin liver cuts were analyzed, in which hepatocytes showed parasitic vacuoles in the cytoplasm with structures consistent with tachyzoites in various stages of development. Observed tachyzoites had an approximate diameter of 3.6 μm by 2.3 μm. They possessed an electrodense slightly wavy plasmic membrane. In some tachyzoites the conoid was visible in the anterior end (Figure 8).

Scarce electrodense micronemes were found inside and below the conoid, as well as shortened highly electrodense rhoptries.

Anterior to the nucleus some dense granules were located, which were numerous at the anterior end. The nucleus, in the majority of structures, was central and showed moderate amount of heterochromatin and displaced to the periphery. In some tachyzoites, numerous electrolucid granules (apicoplast) randomly arranged in the cytoplasm were observed.

In ultrathin cuts of lung, alveolar epithelial cells showed in its cytoplasm bradyzoites that measured 2.6 μm in diameter and 3.2 μm long, with an electrodense and wavy plasmic membrane. The micronemes, localized at the anterior end of the parasite, were numerous and were absent at the posterior end. Likewise, they showed abundant dense granules and shortened electrodense rhoptries.

The ultrastructural features, like the conoid, the

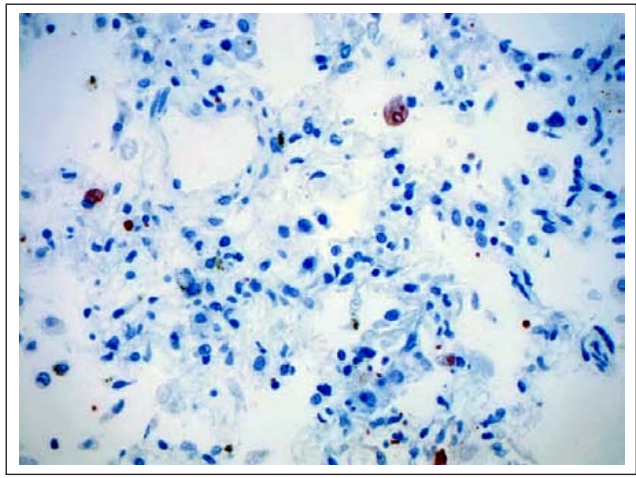


Figura 7. Immunopositivity to *Toxoplasma gondii* in the cytoplasm of an alveolar macrophage (arrow). Immunohistochemistry. 10X.

Figure 7. Immunopositivity to *Toxoplasma gondii* in the cytoplasm of an alveolar macrophage (arrow). Immunohistochemistry. 10X.

Microscopía electrónica

De los tejidos obtenidos del estudio *post mortem* se recuperó pulmón, hígado y cerebro, los cuales estaban fijados en formalina al 10%. Estos tejidos se lavaron con solución amortiguada de cacodilatos y posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% y se lavaron con solución amortiguada de cacodilatos con pH de 7.2 a 0.1 M. Posteriormente, se deshidrataron con concentraciones ascendentes de acetona y se incluyeron en resinas epóxicas (Epón 812) y se polimerizaron a 60°C por 24 horas. Después, se realizaron cortes semifinos de cada uno de los órganos y se montaron en laminillas, las cuales fueron contrastadas con azul de toluidina. A continuación se realizaron cortes finos de 60 μm montados en rejillas de cobre y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico.*

Se revisaron cortes ultrafinos de hígado, cuyos hepatocitos exhibían en su citoplasma vacuolas parasitarias con estructuras correspondientes a taquizoitos en varios estadios de maduración. Los taquizoitos observados medían de 3.6 μm de largo por 2.3 μm de diámetro, con una membrana plasmática electrodensa, ligeramente ondulada, que en algunos taquizoitos presentaban en su extremo anterior el conoide (Figura 8).

Asimismo, en el interior y por debajo del conoide se apreciaron escasos micronemas electrodensos, así como roptrías acortadas muy electrodensas.

Anterior al núcleo se ubicaban algunos gránulos densos, los cuales eran más numerosos en el extremo anterior. El núcleo, en la mayoría de las estructuras,

*Zeiss EM 900.



Figura 8. Fotomicrografía electrónica de transmisión del interior de una vacuola parasitaria en una célula hepática. Muestra numerosos taquizoítos con gránulos electrodensos de amilopectina (*), al centro de la imagen se observa un conoide (recuadro). Técnica de contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Aumento 12 000X.

Figure 8. Transmission electron microscopy photomicrographs of a parasitic vacuole within a liver cell. Shows numerous tachyzoites with electrodense granules of amilopectine (*); at the center of the image, a conoid is observed (box). Contrast technique with uranyl acetate and lead citrate. Magnification 12 000X.

miconemes location and the dense granules, are primary criteria that allow identifying the parasite as *Toxoplasma gondii*. There were no parasitic structures observed in nervous tissue sections.

Discusion

Sudden death clinical record, findings at necropsy, histopathological study, the immunohistochemistry and electron microscopy of the five squirrel monkeys were consistent with a systemic toxoplasmosis.

The reasons for the high susceptibility of these primates has not been established; however, some studies report that these animals do not develop an effective cellular (T cells) response.³ Due to the intracellular nature of *Toxoplasma gondii*, the immune cellular response is considered important to battle the parasite.^{3,5,11}

It has been suggested that among the possible contagious routes for the New World monkeys there is contamination of food with cat feces or through vectors, such as cockroaches and other arthropods.^{3,15}

era central y presentaba la heterocromatina normal y desplazada hacia la periferia. En algunos taquizoítos se observaron numerosos gránulos electrolúcidos (apicoplastos) dispuestos al azar en el citoplasma.

En los cortes ultrafinos de pulmón, las células epiteliales alveolares exhibían en su citoplasma bradizoítos que medían 2.6 μm de diámetro y 3.2 μm de largo, con una membrana plasmática electrodensa y ondulada. Los micronemas, localizados en la parte anterior del parásito, eran numerosos y estaban ausentes en la parte posterior. Asimismo, presentaron abundantes gránulos densos y roptrias acortadas y electrodensas.

Las características ultraestructurales, como el conoide, la ubicación de los micronemas y los gránulos densos, son criterios primordiales que permiten identificar al parásito como *Toxoplasma gondii*. En las secciones de tejido nervioso no se observaron estructuras parasitarias.

Discusión

La historia clínica de muerte súbita, los hallazgos a la necropsia, el estudio histopatológico, la inmunohistoquímica y microscopía electrónica de los cinco monos ardilla fueron consistentes con un cuadro de toxoplasmosis sistémica.

Las razones de la alta susceptibilidad de estos primates no han sido establecidas, sin embargo, en algunos estudios refieren que estos animales no desarrollan una respuesta celular (células T) efectiva.³ Debido a la naturaleza intracelular de *Toxoplasma gondii*, la respuesta inmune celular se considera importante para combatir el parásito.^{3,5,11}

Se ha sugerido que entre las posibles vías de contagio de los primates del Nuevo Mundo se encuentra la contaminación de los alimentos con heces de gatos o bien a través de vectores como cucarachas y otros artrópodos.^{3,15}

Los hallazgos histopatológicos como las lesiones en pulmón (neumonía intersticial), hígado (hepatitis necrótica) y la presencia de quistes de protozoarios PAS positivos en linfonodos y encéfalo, son similares a las lesiones registradas por Epiphanyo *et al.*,³ en un estudio recapitulativo en 33 primates del Nuevo Mundo.^{1,5,7,9,11,13,15}

Con respecto a la inmunohistoquímica, Epiphanyo *et al.*,³ señalan reacción inmunológica positiva a *Toxoplasma gondii* en hígado, pulmón, linfonodos, encéfalo, bazo, corazón, riñones, glándulas adrenales, arterias e intestino delgado en informes de epizootias, en este caso, la técnica sólo se llevó a cabo en el tejido hepático, pulmonar y encéfalo por ser los órganos con lesiones más representativas y de los animales mejor conservados; siendo inmunopositivos.^{1,3,5,6,9-11,15}

Histological findings such as lung (interstitial pneumonia), liver (necrotic hepatitis) lesions and presence of PAS positive protozoan cysts in lymphocytes and brain, are similar to the lesions recorded by Epiphanio *et al.*,³ in a retrospective study in 33 New World monkeys.^{1-5,7,9-11,13,15}

In regard to immunohistochemistry, Epiphanio *et al.*³ reported positive immunological reaction to *Toxoplasma gondii* in liver, lung, lymph nodes, brain, spleen, heart, kidneys, adrenal glands, arteries and small intestine in epizootic reports, in this case, the technique was only carried out in hepatic, lung and brain tissue for being the organs with most representative lesions and they were well preserved animals. All tissues immunopositive for *Toxoplasma gondii*.^{1,3,5,6,8,9,11,13,15-18}

Disposition and size of the observed structures with electron microscopy (conoid, rhoptries, micronemes, among others) are features of the *Aplicomplexa* genus and coincide with the information of the ultrastructure of *Toxoplasma gondii*, which were taken as diagnostic criteria.^{3,5,6,8,9,11,13,15-18}

This research coincides with epizootic studies of toxoplasmosis in New World monkeys in zoos, where high mortality is reported, without evident or specific signs in most of them before death,^{3,5,9,10,13,15} and shows the great susceptibility of squirrel monkeys to this protozoon, as well as the serious consequences in zoo monkey populations, private collections and research centers; therefore, it must be considered among differential diagnoses for diseases with nonspecific clinical course in these animals. On the other hand, due to close contact with man/men, it is considered an important zoonosis in human medicine.

Referencias

1. PADUA MC, MUÑOZ GJ, CEDILLO CP, MORALES SE. Toxoplasmosis en monos ardilla (*Saimiri Sciureus*). XV Congreso Nacional de Patología Veterinaria; 2006 junio 21 – 23; Zacatecas, Zac. Zacatecas, Zac., 2006.
2. SALLES CJ, PRATS N, LOPEZ S, DOMINGO M, MARCO AJ, MORAN JF. Epizootic Disseminated Toxoplasmosis in Captive Slender-tailed Meerkats (*Suricata suricatta*). *Vet Pathol* 1997; 34: 1-7.
3. EPIPHANIO S, SINHORINI IL, CATAO-DIAS JL. Pathology of Toxoplasmosis in Captive New World Primates. *J Comp Path* 2003; 129: 196-204.
4. VARELA N. La toxoplasmosis en los primates del Nuevo Mundo. *Boletín Geas*, 2001; 2: 30-35.
5. ESPINOSA AD, MORALES MM. Brote de toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri Sciureus*). *Vet Méx* 2007; 38: 366-369.
6. JEROME ME, RADKE J R, BOHNE W, ROOS DS, WHITE MW. *Toxoplasma gondii* Bradyzoites Form Spontaneously during Sporozoite-Initiated Development. *Infect Immun* 1998; 66: 4838-4844.

La disposición y el tamaño de las estructuras observadas con microscopía electrónica (conoide, rhoptrias, micronemas, entre otros) son características del género *Aplicomplexa* y concuerda con la información de la ultraestructura de *Toxoplasma gondii*, los cuales fueron tomados como criterios diagnósticos.^{3,5,6,8,9,11,13,15-18}

Este informe concuerda con los estudios de epizootias de toxoplasmosis en primates del Nuevo Mundo en zoológicos, en donde se informa alta mortalidad, sin signos evidentes o específicos en muchos de ellos antes de la muerte,^{3,5,9,10,13,15} y demuestra la gran susceptibilidad de los monos ardilla a este protozoario. Así como, sus graves consecuencias en poblaciones de monos en zoológicos, colecciones privadas y centros de investigación, por lo que se debe considerar entre los diagnósticos diferenciales para enfermedades con curso clínico no específico en estos animales. Por otra parte, debido al estrecho contacto con el hombre, se le considera una zoonosis importante en medicina humana.

7. KIM K, WEISS LM. *Toxoplasma*: the next 100 years, *Microbes Infect* 2008; 10: 978-984.
8. MUÑOZ ED, CHÁVEZ AV, CASAS EA, SUÁREZ FA, GAVIDIA CC, MUÑOZ KD *et al.* Frecuencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en monos *Cebus apella* criados en cautiverio. *Inv Vet Perú* 2005; 16: 163-168.
9. LEVINE DN. *Veterinary Protozoology*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1985.
10. SHERDING GR. *The cat diseases and clinical management*. Vol 1. 2nd ed. New York: WB Saunders Company, 1994: 565-584.
11. DUBEY JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int Parasitol* 2009; 398: 77-882.
12. DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of tissue Cyst. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 267-299.
13. INNES E. Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1997; 20:131-138.
14. SPEER CA, DUBEY JP, MCALLISTER MM, BLIXT JA. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1999; 29: 1509-1519.
15. QUINN PJ, MCCRAW B M. Current status of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Can Vet J* 1972; 13:247-262.
16. CHEVILLE NF. *Ultrastructure Pathology*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1994.
17. SPEER CA, DUBEY JP. Ultrastructure of the Oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1998; 84: 505-512.
18. RIBEIRO AM. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Cienc Rural* 2007; 37:1724-1727.