



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MAGYDA ARABIA ARAJI DAHROUG

Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por  
*Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos e  
comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil

RIO DE JANEIRO  
FEVEREIRO/2014

Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por  
*Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos e  
comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil

MAGYDA ARABIA ARAJI DAHROUG

Tese apresentada ao curso de  
Pesquisa Clínica em Doenças  
Infecciosas do Instituto de Pesquisa  
Clínica Evandro Chagas para  
obtenção do grau de Doutor em  
Ciências.

Orientada por Maria Regina  
Reis Amendoeira

Rio de Janeiro  
Fevereiro/2014

MAGYDA ARABIA ARAJI DAHROUG

Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por  
*Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos e  
comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil

Tese apresentada ao curso de Pesquisa Clínica em  
Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica  
Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Regina Reis Amendoeira

Banca examinadora

---

Dr. Rodrigo Caldas Menezes (Presidente) IPEC/Fiocruz

---

Dra. Raquel Soares Juliano (Componente) Embrapa Pantanal

---

Dra. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (Componente) UFRRJ

---

Dr. Otílio Machado Pereira Bastos (Componente) UFF

---

Dr. Alexandre Ribeiro Bello (Componente) UERJ

---

Dra. Fabiana Lopes Rocha (Suplente) IOC/Fiocruz

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D131 Dahroug, Magyda Arabia Araji

Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos e comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil / Magyda Arabia Araji Dahroug. – Rio de Janeiro, 2014.

x, 118 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2014.  
Bibliografia: f. 96-110

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Animais silvestres. 3. Bovinos. 4. Porco-  
monteiro. 5. Cães. 6. Comunidade rural. 7. Genotipagem. I. Título.

CDD 571.99411

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu tenha vida, saúde e amparo.

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Issaf, agradeço por esse amor incondicional e confiança sempre escancarada em seu coração. Aos meus irmãos, Gilbert, Jean, Oumar, Khadyge e Zaryf pela força, torcida e paciência. Vocês são a certeza que tenho que sempre estarei protegida, amparada e fortalecida.

Ao meu esposo Issam, pelo amor e apoio que tanto me deste durante esta etapa. Obrigada por sempre confiar no meu potencial e ter a mais sincera compreensão durante minhas ausências. Agradeço aos meus sogros, Vera e Issam pela hospitalidade e apoio.

À minha orientadora, Dra Maria Regina Reis Amendoeira. Obrigada por me aceitar como orientada e a oferecer condições de realizar este trabalho, que desde o início se mostrou bastante entusiasmada com este estudo. Obrigada pelo carinho, dedicação e compreensão, principalmente nessa etapa final.

À minha colaboradora e amiga, Dra Raquel Soares Juliano, obrigada pelo apoio em todas as etapas deste projeto, pelo carinho que sempre me recebeste e pela sua amizade, tantas vezes demonstrada.

À Fabiana Lopes Rocha, agradeço pelo carinho e dedicação que teve, ao me orientar nos trabalhos de campo no Pantanal. Obrigada por todas as sugestões e considerações que foram sempre muito pertinentes na minha tese.

Aos colegas do Laboratório de Toxoplasmose: Anselmo, Leandro, Leonardo, Maíra, Eloíza, Mariana, Willian, Heloisa, Pâmela, Aline, Rachel, agradeço de coração pelos momentos que passamos juntos, pelas discussões científicas, pelas dúvidas resolvidas e pelo companheirismo.

Aos amigos cariocas que Deus me presenteou: Lucimary Pimentel, Edinho, Beatriz, Brunna, Anselmo, David, Leonardo, Rafaela, Leandro, Simone, Miguelzinho, entre outros queridos, muito obrigado por todo carinho, pelos momentos maravilhosos de descontração, gargalhadas, trabalho árduo e, por que não mencionar, tristezas e momentos difíceis ao longo desses anos que com vocês dividi. Vocês são os melhores presentes que este trabalho me proporcionou.

Aos amigos pantaneiros, Julianne, Paula, Rafael PV, Pamela, Chico, Pedro, Gustavo, Zucco, Ismael: Os dias na Fazenda Nhumirim se tornaram inesquecíveis por culpa de vocês! Obrigada pelos momentos de apoio e de boas gargalhadas! Saudades!

À Embrapa Pantanal, pelo apoio logístico e infraestrutura que possibilitou a realização deste trabalho. Agradeço a todos os pesquisadores, em especial aos colaboradores: Dra Raquel Juliano, Dr. Guilherme Mourão, Dr. Ubiratan Piovezan e Dra Aiesca Oliveira Pellegrin. Não poderia esquecer os funcionários da Fazenda Nhumirim: Armindo, Henrique, Augusto, Vitor, Márcia, Divina, entre tantos outros que tornaram os dias de campo menos difíceis. Muito obrigada!

À Dra Vera Chiocolla e sua aluna Inara Bastos, como também todos os integrantes da sua equipe do Laboratório de Biologia Molecular de parasitos e fungos do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. Obrigada pela oportunidade de aprender e realizar a técnica de genotipagem, além de toda prestabilidade.

Aos meus amigos, alguns desde o colegial e outros da faculdade, mas importantíssimos em minha vida: Erotides, Inti, Marcelo, George, Roselaura, Eduardo, Bruno, Leandro, James, Ítala, Arleana, Daphine, Nívea, Regiane, Cristiane, Ricardo, Danilo entre outros muito especiais. Obrigada por serem meus amigos!

Agradeço aos membros da banca examinadora por aceitarem participar desta fase importante em minha vida e sem dúvida enriquecer este trabalho.

Ao Laboratório de Toxoplasmose IOC/FIOCRUZ e CAPES pelo apoio financeiro.

Em especial a todos **os animais que participaram deste projeto!** Apesar de o presente trabalho visar à saúde pública, todo meu carinho e amor é deles! E é por eles grande parte da minha preocupação e sonho de poder contribuir principalmente com a conservação dos animais silvestres.

A todos que de alguma forma me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto, seja por auxílio laboratorial, científico, palavras de apoio, incentivo, pois sei que sem a ajuda de vocês essa tese não teria chegado ao final. A vocês meu **MUITO OBRIGADA!!!**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese àqueles que dedicaram suas próprias vidas por mim: Meu pai Khaled Mohamad Dahroug (*in memoriam*) e minha mãe Issaf Araji Dahroug.

Pareço-me tanto com vocês, olhando dá pra ver, seus rostos lembram o meu  
Desde o primeiro aniversário, o primeiro passo sempre prontos para me defender  
Sempre que brigaram comigo para eu não correr perigo, heróis prontos para me salvar  
E com vocês aprendi todas as lições, eu enfrentei os meus dragões  
E só depois me deixaram voar

Mãe, eu sei, o tempo é implacável  
Afasta os nossos corpos, mas aproxima o coração  
O seu nome é sempre lembrado, todos os dias  
Com um verso, falo de você sempre na oração  
Pai, foi muito difícil quando se foi  
Passei a não ter você pertinho de mim  
Mas eu sei, mesmo o mundo querendo me derrubar  
Ao meu lado você sempre está, para me levantar quando eu cair

Mas eu só quero lembrar, que de 10 vidas, 11 eu lhes daria  
Que foi vendo vocês que aprendi a lutar  
Mas eu só quero lembrar, antes que essas linhas se acabem  
Para vocês não se esquecerem  
Que se Deus me desse uma chance de viver outra vez, eu só queria se tivesse vocês!

Dahroug, MAA. **Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos e comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil.** Rio de Janeiro, 2014 118f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas].

## RESUMO

A toxoplasmose, causada pelo *Toxoplasma gondii* é uma protozoose que acomete o homem e uma grande variedade de animais de sangue quente e aves. No Brasil, a prevalência pode variar de 20% a 90% dependendo da área estudada, clima, condição socioeconômica e cultural. A infecção se dá através da ingestão de oocistos, que podem ser encontrados no solo, água e alimentos ou através da manipulação e ingestão de carne crua ou mal cozida, além da infecção congênita, apresentando importância em saúde pública. Este trabalho objetivou estudar a ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos, ovinos e comunidade rural da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul, utilizando métodos sorológicos (Hemaglutinação Indireta - HAI, Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI, Técnica de aglutinação modificada - MAT) e moleculares (Reação em cadeia pela polimerase – PCR, PCR-RFLP). Foram feitas coletas de amostras de sangue de 73 indivíduos da comunidade rural, de 25 cães, 442 bovinos e 148 porco-monteiros. Observou-se que 47,95% (35/73) das pessoas eram sororreagentes. Destas, apenas um indivíduo sororreagente (2,9%) apresentou lesão ocular presumível da infecção pelo parasito. Nos animais, observou-se a ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii* em 48% dos cães, 30,55% dos bovinos e 1,3% nos porco-monteiros. Relatos de várias partes do mundo têm demonstrado a importância do ciclo silvestre na epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii*. No entanto, apesar do papel conhecido de alguns felinos selvagens como hospedeiros definitivos para manutenção e transmissão do parasita para outros predadores carnívoros, pouco se sabe sobre a incidência de *Toxoplasma gondii* nestes animais. Os carnívoros foram capturados em armadilhas contendo iscas e após a contenção química as amostras biológicas (sangue de todos os animais e fezes dos felídeos) foram coletadas e armazenadas para análise posterior. No presente estudo, três espécies de carnívoros foram avaliadas: quati (*Nasua nasua*), lobinho ou cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Quarenta e dois roedores (Tricomys) também avaliados tiveram análises de PCR realizada em 42 tecidos (cérebro, pulmão e músculo). Através dos exames sorológicos (Hemaglutinação Indireta, Reação de Imunofluorescência Indireta, Técnica de aglutinação modificada) observou-se a ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em 29,16% (7/24) dos quatis, 47,82% (11/23) em lobinhos e 100% (2/2) nas jaguatiricas. No PCR observou-se positividade em 41,66% (10/24) dos quatis, 47,82 % (11/23) dos lobinhos e em 100% (2/2) das jaguatiricas. Em roedores, observou-se 23,80 % (10/42) de positivos pela PCR. Realizamos a caracterização molecular de amostras sanguíneas dos animais silvestres positivos pela PCR, onde utilizamos 12 marcadores genotípicos (SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2, Apico, CS3), onde observou-se a presença de um novo genótipo do parasito, circulando na região de forma homogênea entre as espécies.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, animais silvestres, bovinos, porco-monteiro, cães, comunidade rural, genotipagem.

Dahroug, MAA. **Clinical, laboratory and epidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection in wild animals, cattle, pigs and rural communities in the region Nhecolândia, Pantanal, Brazil.** Rio de Janeiro, 2014 118f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas].

## ABSTRACT

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii* is a protozoan infection that affects humans and a wide variety of warm-blooded animals and birds. In Brazil, the prevalence varies from 20% to 90% depending on the study area, climate, socioeconomic and cultural conditions. Infection occurs through ingestion of oocysts, which can be found in soil, food and water or through manipulation and ingestion of raw or undercooked meat, with public health significance. Collection of blood samples from 73 individuals from the rural community of 25 dogs, 442 cattle and 148 feral pig Nhecolândia the region were made. It was found that 47.95% (35/73) were seropositive persons. Of these, only one sororreagente individual (2.9%) had presumed ocular injury from infection by the parasite. In animals, we observed the occurrence of 48% of dogs and 30.55% in cattle and 1.3% in feral pig. Reports from several parts of the world have demonstrated the importance of the sylvatic cycle in the epidemiology of *Toxoplasma gondii* infections. However, despite the known role of some wild felids as definitive hosts for maintenance and transmission of the parasite to other carnivore predators, little is known about the incidence of *Toxoplasma gondii* in these animals. Therefore, one of the objective of this study was to detect exposure and occurrence of the *T. gondii* infection in wild carnivores and rodents of the Pantanal techniques. The carnivores were captured in traps containing lures and after chemical restraint samples were harvested and preserved until further analyses. In the present study, three species of carnivores were evaluated : Ring-tailed coati (*Nasua nasua*), Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and Ocelots (*Leopardus pardalis*). Forty two rodents also evaluated had PCR analyses performed in 42 tissues (brain, lung and muscle). Serological analyses demonstrated exposure to *Toxoplasma gondii* in 29.16% of the ring-tailed coati (7/24), 47.82% in crab-eating fox (11/23) and 100% in ocelots (2/2). The PCR analyses showed that 41.66% (10/24) of the ring-tailed coati were positive, comparing to 47.82% (11/23) in crab-eating fox and 100% (2/2) in ocelots. In small rodents, the positive results were 23.80% (10/42) by PCR. (sub-region subregion Nhecolândia), Brazil, using serologic and molecular. We performed the molecular characterization of blood samples from wild animals positive by PCR, where we use 12 genotypic markers (SAG1, SAG2 (5'- and 3'-SAG2 SAG2), SAG3, GRA6, BtuB, c22-8, c29-2, L358 , PK1, new SAG2 and apical). Thus, we observed the presence of a new genotype of the parasite, never described before, circulating in the region evenly between species.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, wildlife, cattle, feral pigs, dogs, rural community, genotyping.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
1.2. Infecção em humanos .....	14
1.3. Infecção em bovinos .....	15
1.4. Infecção no porco-monteiro ( <i>Sus Scrofa</i> ) .....	15
1.5. Infecção em animais silvestres .....	16
1.7. Características moleculares do <i>T. gondii</i> .....	17
1.8. Métodos de tipagem .....	20
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1. Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivo específico .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1. Aspectos éticos .....	27
4.2. Local e período da coleta .....	27
4.3. População alvo da pesquisa .....	28
4.4. Captura e contenção física dos animais silvestres .....	29
4.5. Contenção química .....	30
4.6. Marcação dos animais .....	31
4.7. Coleta do material biológico .....	31
4.1.1. Animais silvestres .....	31
4.1.2. Bovinos .....	31
4.1.3. Porco-monteiro .....	32
4.1.4. Comunidade local .....	33
4.1.4.1. Exame oftalmológico .....	33
4.8. Manutenção e obtenção do <i>T. gondii</i> .....	34
4.9. Exames sorológicos .....	35
4.9.1. Local de realização .....	35
4.9.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	35
4.9.3. Reação de Hemaglutinação Indireta (HAI) .....	36
4.9.4. Técnica de aglutinação Indireta Modificada (MAT) .....	36

4.10. Diagnóstico molecular.....	36
4.10.1. Extração de DNA.....	36
4.10.2. Reação pela cadeia de polimerase .....	36
4.10.3. Genotipagem.....	37
4.10.3.1. 1º PCR (Multiplex).....	37
4.10.3.2. 2º PCR ou Nested-PCR .....	38
4.10.3.3. PCR-RFLP.....	38
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
5.1. Artigo 1.....	42
5.2. Artigo 2.....	60
5.3. Artigo 3.....	68
5.4. Artigo 4.....	79
<b>6. CONCLUSÕESS .....</b>	<b>94</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>96</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasma gondii*

A classificação taxonômica do agente etiológico da toxoplasmose, de acordo com Current et al. (1990) e Cavalier-Smith (1993) é a seguinte: Império: Eucariota (Cavalier-Smith, 1993); Reino: Protozoa (Owen, 1858); Filo: Apicomplexa (Levine, 1970); Classe: Sporozoazida (Leukart, 1879); Ordem: Eucoccidiorida (Leukart, 1879); Subordem: Eimeriorina (Leger, 1911); Família: Sarcocystidae (Poche, 1913); Subfamília: Toxoplasmatinae (Bioca, 1956); Gênero: *Toxoplasma* (Nicolle e Manceaux, 1909); Espécie: *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909).

As três formas infectantes do *T. gondii* são: taquizoítas (trofozoítos), cistos contendo bradizoítas e oocistos contendo esporozoítos (Dubey, 1998).

Os taquizoítas (Figura 1A) são formas de replicação rápida encontradas na fase aguda de infecção que são disseminados na corrente sanguínea infectando vários tecidos, tais como: olhos, músculos esqueléticos, coração, placenta, sistema nervoso central, entre outros. Sua forma é de lua crescente e medem cerca de 2 x 4 µm de largura e 4 x 8 µm de comprimento (Dubey, 1998; Hill et al, 2005).

Os cistos teciduais (Figura 1B) variam no tamanho de 5 a 100 µm. São significativamente resistentes à resposta imunológica do hospedeiro, podendo durar por toda a vida nos tecidos do hospedeiro infectado. Possuem centenas ou milhares de bradizoítas que são formas de replicação mais lenta encontrados na fase crônica de infecção. Estruturalmente são idênticos aos taquizoítas, sendo mais delgados e menos susceptíveis a ação de enzimas proteolíticas. O núcleo dos bradizoítas situa-se na extremidade posterior, enquanto que nos taquizoítas está na posição central (Dubey, 1998; Hill et al., 2005).

Os oocistos (Figura 1C) medem cerca de 10x12 µm de diâmetro. É a forma infectante proveniente do ciclo sexuado em felídeos. São liberados para o meio ambiente nas fezes durante a infecção aguda por cerca de 7 a 10 dias, podendo esporular em 3 a 21 dias, dependendo da temperatura e umidade da região. Cada oocisto forma no seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um (Dubey, 1998).

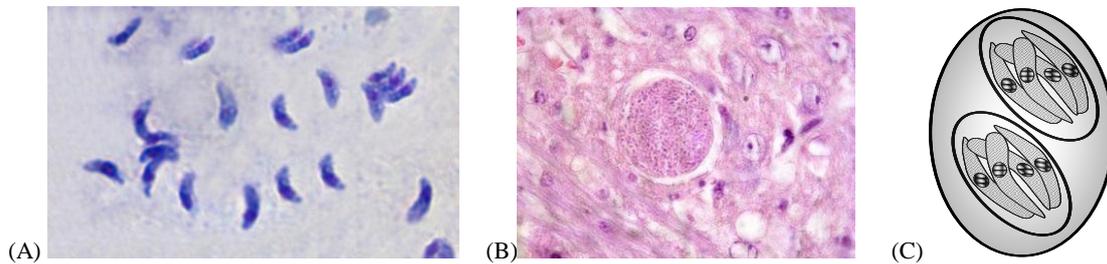


Figura 1. (A) Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* em exsudato peritoneal de camundongos, corado pelo método May-Grunwald-Giemsa, 1000X. (B) Cisto de *Toxoplasma gondii* em corte histológico de cérebro de camundongo, corado por hematoxilina eosina, 1000X. (C) Desenho esquemático do oocisto maduro de *T. gondii*, com dois esporocistos, cada um deles com quatro esporozoítas. Foto: Laboratório de Toxoplasmose – IOC-Fiocruz- Amendoeira et al., 2012.

O ciclo de vida deste parasito é heteroxênico, conforme demonstra a Figura 2. Esse protozoário é um coccídio intracelular obrigatório, que infecta naturalmente o ser humano e animais de sangue quente como os mamíferos e aves silvestres e domésticos. Os hospedeiros definitivos são os felídeos, pois só neles ocorre o ciclo sexuado do parasito, com a eliminação de oocistos que no ambiente esporulam e se tornam infectantes (Dubey et al., 1970). Os oocistos sobrevivem em ambiente úmido e quente por pelo menos um ano, porém não resistem muito tempo ao ressecamento (Frenkel et al., 1975; Frenkel; Ruiz, 1981). A transmissão é assegurada pela enorme quantidade de oocistos eliminados nas fezes de felídeos para o meio ambiente apesar do período curto, em torno uma a duas semanas (Hill e Dubey, 2002).

Os hospedeiros intermediários se infectam quer seja pela ingestão de oocistos esporulados, ou pelo carnivorismo ingerindo cistos com bradizoítas (Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfield, 2004). Quando ingerem os oocistos ocorre a liberação de esporozoítos que invadem as células epiteliais. Diferenciam-se em taquizoítas que se disseminam pela corrente sanguínea, invadindo células nucleadas. Caracteriza-se, então, a fase aguda da infecção, na qual ocorrem as manifestações clínicas da doença. Os taquizoítas, então, se diferenciam em bradizoítas e dentro de um vacúolo parasitário dividem-se mais lentamente formando os cistos em diversas células, principalmente no cérebro, coração e músculos podendo permanecer no local indefinidamente (Dubey e Frenkel, 1972; Kim e Weiss, 2008).

Nos hospedeiros definitivos (felídeos), após a ingestão dos cistos, estes são desintegrados no estômago e intestino delgado por enzimas proteolíticas. Então, os

bradizoítas são liberados e penetram no epitélio intestinal. Assim inicia-se o desenvolvimento de múltiplas gerações de ciclos sexuais e assexuais de *T. gondii* (Dubey e Frenkel, 1972). Os parasitas se multiplicam assexuadamente nas células do epitélio intestinal dando origem aos esquizontes (esquizogonia). Dos esquizontes são liberados merozoítos que após várias gerações se diferenciam em macrogametas e microgametas. Havendo a fecundação do macrogameta pelo microgameta ocorrerá a formação do zigoto, que posteriormente dará origem ao oocisto. Essa etapa de reprodução sexuada do ciclo é conhecida como gametogonia (Hill et al., 2005).

A transmissão placentária foi a primeira forma conhecida de transmissão do *Toxoplasma gondii*. O feto é infectado usualmente por taquizoítas que cruzam a placenta a partir da circulação materna durante a infecção primária, mas cistos teciduais dormentes de infecção passada podem reiniciar o ciclo de vida do parasito em gestantes imunodeprimidas e, em casos raros, em gestantes imunocompetentes (Trees e Williams, 2005). A maioria dos casos em gestantes é assintomática ou oligossintomática (Spalding et al., 2005).

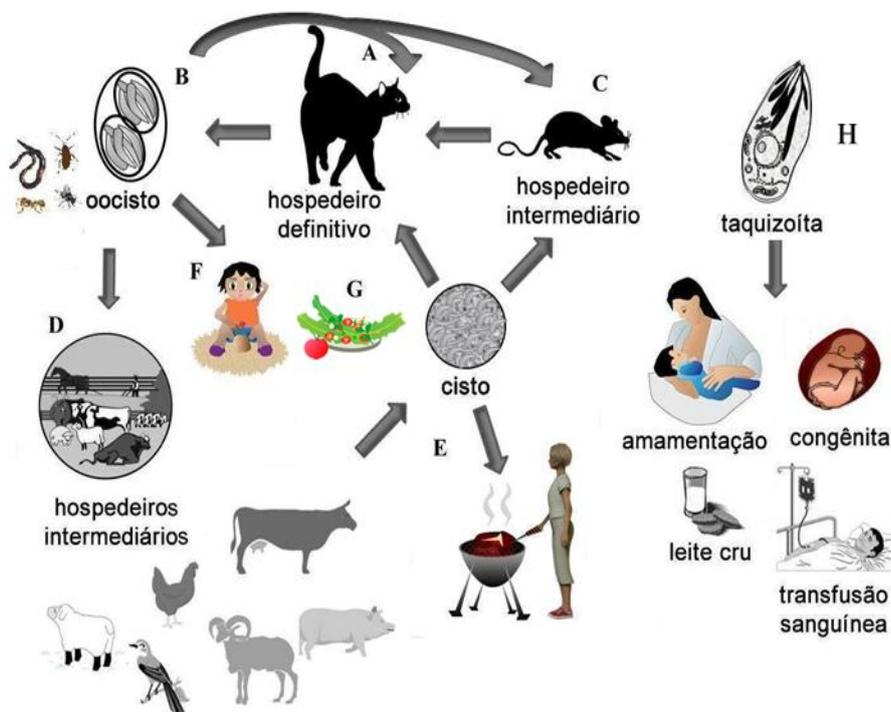


Figura 2: Ciclo de Transmissão do *Toxoplasma gondii*. Fonte: Amendoeira e Mattos, 2012. Laboratório de Toxoplasmose – IOC-Fiocruz.

## 1.2. Infecção em humanos

A toxoplasmose é uma zoonose com ampla distribuição mundial. Apresenta taxas de prevalências que variam em diversas regiões do mundo em função de fatores geográficos, sociais, hábitos da população e clima (Dubey e Beattie, 1988; Remington et al., 2005).

A infecção pelo *Toxoplasma gondii* afeta aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo. É assintomática em 80 a 90% dos indivíduos imunocompetentes, apresentando nestes evolução benigna. Nos 10 a 20% de casos sintomáticos, a linfadenopatia é a manifestação mais comum nesses indivíduos, podendo ser acompanhada de febre, astenia e mialgia. (Montoya e Liesenfield, 2004).

Em diferentes países, a soroprevalência da infecção por *T. gondii* tem-se mostrado entre 10% a 90% na população humana (James, 1996; Carruthers, 1999). No Brasil, a soroprevalência tem sido determinada entre 50% a 80% (Cantos, 2000), podendo variar de 15 a 85%, sendo estes valores influenciados por hábitos socioculturais e fatores geográficos e climáticos (Amendoeira; Costa et al., 1999, Albuquerque et al., 2009, Dubey et al., 2012). Alguns países como a Tailândia e Japão apresentam baixa prevalência com valores abaixo de 20%. No entanto, na Austrália, Polônia, Reino Unido e Bélgica foram detectadas prevalências entre 23% e 53%, enquanto que o Taiti e a França apresentaram alta prevalência com valores acima de 60% (Avelino et al., 2004).

A toxoplasmose ocular pode ser originada a partir de uma infecção congênita ou adquirida sendo, geralmente subclínica em crianças e adultos. Os sintomas oculares variam de acordo com a idade do indivíduo, sendo a retinocoroidite (lesão ocular caracterizada por inflamação acentuada e necrose) sua principal consequência, podendo também ocorrer falhas na visão ou glaucoma (Bonfioli; Orefice, 2005). Em indivíduos imunocomprometidos, as lesões oculares frequentemente múltiplas, com carga parasitária elevada, necrose em toda a área da retina tornando a retinocoroidite de tamanho extenso. Embora a conversão de bradizoítas em taquizoítas seja considerada como um evento crítico na patogênese da toxoplasmose ocular, seus mecanismos permanecem ainda pouco conhecidos (Norose et al., 2005).

### 1.3. Infecção em bovinos

No Brasil, estudos descrevendo a ocorrência da infecção toxoplásmica nos permite afirmar que esta parasitose está amplamente distribuída entre os bovinos (Costa, 1978; Garcia, 1999; Luciano et al., 2011). Em geral, a prevalência mundial varia de 0 a 99% (Hall et al., 2001) e no Brasil pode variar de 1,03% a 97,41% (Gondim et al., 1999; Ogawa, 2005; Santos, 2008, Dubey et al., 2012, Fajardo et al., 2013)

Um estudo objetivando avaliar a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos e comunidade rural foi realizado no estado de Mato Grosso, onde observou-se respectivamente a soroprevalência 71% e 97,41%. Estes resultados demonstraram uma elevada prevalência desta infecção toxoplásmica na população estudada e o alto risco da carne como via de transmissão para o homem quando manipulada ou ingerida crua ou mal cozida (Santos, 2008). No entanto, em outras regiões, a soroprevalência é baixa, como a encontrada na Zona Mata-MG de 2.68% (Fajardo et al., 2013).

Garcia et al. (1999) estudaram a soroprevalência da infecção por *T. gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos oriundos de propriedades rurais da região norte do Paraná como também os fatores de risco associados à infecção e a correlação entre títulos de anticorpos obtidos interespecie e com humanos, felinos e caninos. Observaram elevada soroprevalência em bovinos (90,8%), suínos (54,3%) e ovinos (87,7%) atentando para o alto risco da carne como via de transmissão para a população humana.

### 1.4. Infecção no porco-monteiro (*Sus Scrofa*)

O porco em estado asselvajado (*Sus scrofa*) é uma das espécies de mamíferos invasores mais bem sucedidas do mundo (Desbiez et al., 2009). Muitos estudos relatam as consequências negativas, tanto ecológicas quanto socioeconômicas, das invasões de suínos. Além disso, esses animais são reservatórios de vários agentes etiológicos de doenças infecciosas (Herrera et al., 2005; Corner, 2006; Hampton et al., 2006; Ruiz-Fons et al., 2007). Conhecido no Pantanal brasileiro como porco-monteiro, onde ocorre há mais de dois séculos, a espécie encontra-se estabelecida e entender sua ecologia é importante por razões conservacionistas e econômicas. As consequências ecológicas da sua invasão são ainda pouco compreendidas. A primeira vista, eles se beneficiam do estado de conservação das paisagens

na região e são de grande importância para a cultura pantaneira, pois há uma franca preferência pela caça de porcos monteiros, sendo considerada excelente fonte de carne fresca e gordura. O abate e a castração dos porcos monteiros é uma atividade social valiosa e já faz parte do tradicional estilo de vida pantaneiro (Desbiez, 2007).

Atualmente, não há estudos envolvendo a infecção por *T. gondii* nos porco-monteiros com característica asselvajada, encontrada apenas no Pantanal. No entanto, estudos sorológicos envolvendo javalis (*Sus scrofa*), já foram realizados no Rio Grande do Sul, sendo observado a prevalência de 17% de anticorpos IgG para *T. gondii* pela RIFI e 13% pela HAI (Santos et al., 2012).

### **1.5. Infecção em animais silvestres**

Diversos estudos objetivando estudar a soroprevalência da infecção por *T. gondii* em animais silvestres, principalmente os felídeos, mantidos em cativeiro como parques zoológicos, são reportados (Lukesova; Literak, 1998; Silva et al., 2001; Spencer et al., 2003; Kikuchi et al., 2004; Basso et al., 2005; Brown et al., 2005; Buddhirongawatr et al., 2006; Andrade et al., 2007; de Camps et al., 2008).

Em animais silvestres de vida livre capturados para realização do estudo da infecção por *T. gondii* é relatada a prevalência de 51,4% a 71,4% entre três espécies estudadas: *Procyon lotor*, *Canis latrans* e *Mephitis mephitis* in Wisconsin, EUA (Dubey et al., 2007); 15% a 47% em mamíferos selvagens (Hill et al., 1998, Shannon et al., 2011). Na África, a soroprevalência de felídeos silvestres de vida livre foi determinada em 96% e em 55,9% das amostras, respectivamente da região (Hove; Mukaratirwa, 2005). Na Pensilvânia, 83% dos felídeos capturados foram soroprevalentes (Mucker et al., 2006). Na Suécia, observaram 75,4% de felídeos silvestres soropositivos (Ryser-Degiorgis et al., 2006). Nos Emirados Árabes Unidos, Pas e Dubey (2008) encontraram soroprevalência de toxoplasmose em todos felídeos silvestres da espécie *Felis silvestris gordonii*, espécie esta ameaçada de extinção na região.

No Brasil, um estudo objetivando estudar a soroprevalência de animais silvestres de vida livre foi realizado na região da Amazônia, onde foi observada a presença de 75% dos felídeos silvestres e 61,1% dos roedores capturados soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* (Ferradoni; Marzochi, 1980). Vitaliano et al., (2014) relataram a ocorrência de 50%

(13/26) de mamíferos silvestres, sendo 11 de vida livre, utilizando a MAT. Proença et al. (2013) realizaram um trabalho na Estação Ecológica de Águas Emendadas, Distrito Federal, onde 10 das amostras analisadas, oito (80%) eram soropositivos para *T. gondii*: 3/3 (100 %) dos lobos guará e 5/7 (71,4%) das raposas -do-mato.

São escassos os estudos descrevendo a caracterização molecular de animais silvestres de vida livre, principalmente no Brasil. Um estudo foi realizado em amostras teciduais de felídeos silvestres oriundas de coleções biológicas, onde foram realizadas genotipagens (Cañon Franco et al., 2013).

A quantidade de oocistos de *T. gondii* eliminados pelos gatos nas fezes é elevada, num curto período de tempo, em torno de três semanas, dificultando o diagnóstico. No entanto podem ocorrer novas eliminações (Dubey; Frenkel, 1972). Nos felídeos silvestres, a eliminação de oocistos pode estar associada à diarreia. Na Bélgica um tigre siberiano de cativeiro teve um surto diarreico de 14 dias, com uma concentração de 200.000 oocistos/grama de fezes (Dorny; Franssen; 1989), sendo o mesmo observado em outros animais de cativeiro (Lusesová; Literák, 1998). Em animais de vida livre é difícil determinar a quantidade e o período de eliminação de oocistos. Em *Puma concolor* a concentração foi estimada entre  $2,4 \times 10^5$  a  $12,5 \times 10^6$  oocistos/grama de fezes (Aramini et al., 1998).

A contaminação ambiental de um felino silvestre pode ocorrer em níveis maiores quando comparados aos gatos domésticos, devido aos hábitos comportamentais, principalmente referentes à caça, onde o felino percorre extensas áreas em busca de alimento, que podem contribuir na dispersão de oocistos (Hove; Mukaratirwa, 2005).

A dificuldade na coleta de amostras de felídeos silvestres de vida livre restringe a realização de inquéritos mais aprimorados e estudos populacionais da infecção por *T. gondii* ainda são escassos. No Brasil, foram observadas pelo MAT em três indivíduos capturados de *Leopardus pardalis* no Pará sororeagentes (Whiteman, 2007).

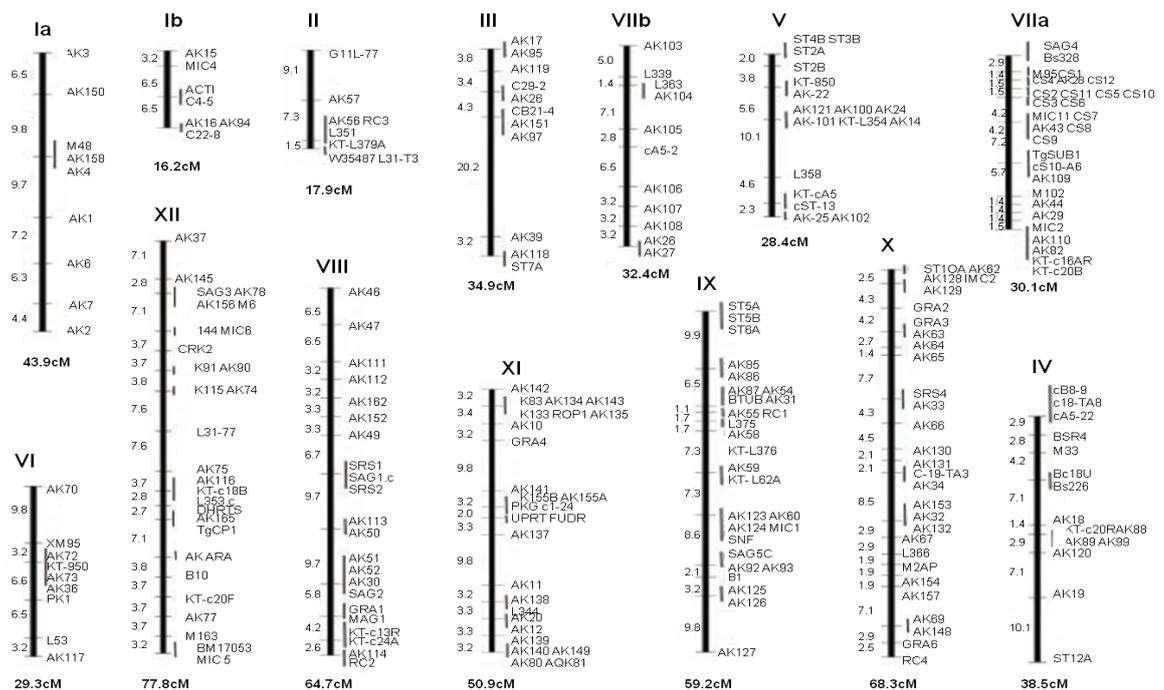
## **1.6. Características moleculares de *T. gondii***

*T. gondii* apresenta um genoma nuclear estável possuindo aproximadamente 87 Mb. É complementado por um DNA circular extracromossomal de 35 Kb no interior de uma organela denominada apicoplasto e um genoma mitocondrial de 6 Kb (Ajioka et al., 2001). A

localização subcelular desse genoma extracromossomal permanecia desconhecida, até que estudos de hibridização *in situ* usando sondas em *T. gondii* mostraram que o genoma de 35 Kb residia em uma organela localizada na região apical ao núcleo, denominada apicoplasto (McFadden et al, 1996).

O genoma nuclear é haplóide contendo  $8 \times 10^7$  pares de base, para a maioria dos estágios do ciclo de vida do parasita, exceto durante a divisão sexual que ocorre no intestino dos felídeos (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Sibley e Boothroyd (1992) construíram um mapa genômico constituído de 11 cromossomos, através de recombinações entre as cepas tipo II (ME-49) e cepas do tipo III (CEP). Posteriormente, Khan et al. (2005) através de recombinações de cepas dos tipos II e III e cepas dos tipos I e III, definiram um novo mapa com a segregação de 250 marcadores genéticos em 14 cromossomos designados por algarismos romanos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI e XII), com tamanhos que variam de 1,8 Mb a > 10 Mb (Figura 3).



**Figura 3:** Mapa genômico de *T. gondii* constituído de 14 cromossomos. Adaptado de Khan et al. (2005).

Os genótipos *T. gondii* baseados nos estudos de polimorfismo genético são formados pela combinação de duas classes de alélicas denominadas “A” e “E”. Um alelo foi definido como a classe alélica compartilhada por pelo menos dois dos três tipos de genótipo (I, II e III). Para cada *locus*, essas duas classes alélicas foram distribuídas aleatoriamente entre os parasitas das três linhagens. Para alguns *loci*, as linhagens I e II compartilhavam a mesma classe alélica, enquanto a linhagem III era diferente (Grigg et al., 2001). Os três tipos genéticos surgiram de uma origem comum, passando por troca genética limitada sendo altamente similares com diferenças inferiores a 1% em suas sequências de DNA (Grigg et al., 2001; Su et al., 2003).

A estrutura clonal das cepas de *T. gondii* pode ser explicada pela capacidade de transmissão do parasito entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo e sofrer meiose e recombinação sexual (Su et al., 2003). Pode ocorrer também por macrogametas do parasito que permanecem infertilizados, porém são capazes de formar oocistos por partenogênese no intestino dos felídeos (Ferguson, 2002).

A diversidade genética das cepas de *T. gondii* tem sido atualmente um importante objeto de estudo. Durante as últimas décadas os métodos moleculares têm possibilitado realizar a detecção, diagnóstico e genotipagem deste parasito (Dubey, 2008). Inicialmente, estudos demonstraram que o *T.gondii* apresentava três linhagens clonais: I, II e III (Sibley e Boothroyd, 1992; Owen e Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003; Dubey et al., 2004; Vallochi et al., 2005; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006; Dubey et al., 2006). Na América do Sul com uma predominância de cepas dos tipos I e III (Dardé, 2004; Khan et al., 2006), enquanto que na Europa e América do Norte a predominância cepas do tipo II (Howe e Sibley, 1995; Owen e Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006).

Posteriormente outros estudos evidenciaram linhagens divergentes dos tipos arquetípos, assim como linhagens recombinantes ou atípicas (Khan et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Dubey et al., 2007, Ferreira et al., 2008).

## 1.7. Métodos de tipagem

Os primeiros relatos da existência de linhagens bem definidas dentre os isolados de *T. gondii* foram demonstradas inicialmente pelos perfis eletroforéticos de isoenzimas (Dardé et al., 1998).

Atualmente métodos de tipagem utilizando multilocus RFLP-PCR, microsátélites e sorotipagem são utilizados para estudar a diversidade genotípica entre amostras de *T. gondii* (Dardé, 2004; Khan et al., 2007; Su et al., 2010; Sousa et al., 2010; Vaudaux et al., 2010).

Com os métodos moleculares é possível estudar a variação de virulência das diferentes linhagens do parasita, para revelar o potencial de correlação entre o genótipo do parasita e os padrões de doença em pacientes infectados e para o estudo da epidemiologia, bem como a biologia populacional de *T. gondii* (Dubey et al., 2008; Pereira- Chioccola et al., 2009).

O estudo da diversidade genética de um parasito visa uma melhor compreensão de sua evolução, fornecendo subsídios para avaliação de características biológicas tais como a virulência, atividade imunológica e resistência às drogas, podendo também esclarecer as diferentes manifestações da doença na população humana para que ocorram melhorias no diagnóstico e tratamento (Tibayrenc, 1995).

A PCR-RFLP é um método de tipificação baseado no polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela PCR. As enzimas de restrição reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases e são classificadas de acordo com a estrutura, atividades e sítios de reconhecimento e clivagem de DNA. O método consiste em clivar o DNA em pontos específicos resultando fragmentos de massas moleculares diferentes, sendo assim possível diferenciar os tipos de cepas (Khan et al., 2005).

As investigações das características genotípicas em animais também são de extrema importância para um melhor entendimento da epidemiologia, identificando as fontes de infecção ou vias de transmissão, visto o potencial zoonótico da toxoplasmose (Owen e Tree, 1999).

Na América do Norte, Ásia e África, a maioria dos isolados pertencem aos tipos clonais I, II e III, com predominância de cepas do tipo II. As análises foram feitas em pacientes com infecções congênitas, com toxoplasmose/AIDS e animais domésticos (Howe e

Sibley, 1995; Sibley e Boothroyd, 1992; Owen e Trees, 1999; Ajzenberg et al., 2002; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006). Na América do Sul, os estudos mostraram uma predominância de cepas I e III. Em pacientes com toxoplasmose/AIDS e toxoplasmose ocular havia predominância de cepas do tipo I (Howe e Sibley, 1995; Khan et al, 2006; Gallego et al., 2006; Ferreira et al; 2008).

Os primeiros estudos eram limitados na identificação de isolados distintos, uma vez que poucos marcadores eram utilizados (Pereira-Chioccola et al., 2009). Os estudos por PCR-RFLP eram realizados analisando-se apenas um *locus*, o gene SAG2 localizado no cromossomo VIII. Este gene codifica a proteína p22 que é expressa tanto por taquizoítas quanto por bradizoítas (Howe et al.,1997; Owen e Tree, 1999; Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003; Khan et al., 2005; Dubey et al., 2006).

Dubey et al. (2002) genotipou pela primeira vez no Brasil isolados de galinhas caipiras infectadas naturalmente, procedentes de São Paulo. Amostras de galinhas caipiras procedentes do Rio de Janeiro, Paraná e Rondônia também foram genotipadas com a utilização somente do marcador SAG2 (Dubey et al., 2003; Dubey et al., 2006). No mesmo país, gatos, cães e porcos também tiveram suas amostras genotipadas utilizando o marcador SAG2 (Dubey et al., 2004; Da Silva et al., 2005; Pena et al., 2006).

No Brasil, estes trabalhos pioneiros de genotipagem por PCR-RFLP utilizando um único marcador mostraram a predominância de cepas do tipo I e tipo III. Os ensaios eram realizados em amostras isoladas de galinhas, gatos, cães e porcos provenientes de diferentes regiões do Brasil (Dubey et al., 2002; Dubey et al., 2003, Dubey et al., 2004; Da Silva et al., 2005; Dubey et al., 2006; Pena et al., 2006). Em contrapartida estudos realizados em isolados de animais e humanos nos Estados Unidos, Europa, Ásia e África mostraram a predominância cepas do tipo II (Sreekumar et al, 2003; Peyron et al; 2006; Zakimi et al., 2006).

Com o emprego de mais marcadores moleculares verificou-se que a população de *T.gondii* possuindo somente os tipos clonais I, II e III não tinha sustentação científica, mostrando uma estrutura populacional bastante diversificada com genótipos recombinantes ou atípicos entre os três arquétipos (tipos I, II e III) (Khan et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Su et al., 2006; Dubey et al., 2007). Estes marcadores foram desenvolvidos com base na sequência de polimorfismo de DNA das linhagens clonais I, II e III, gerando informação valiosa para revelar a diversidade do parasito, sendo de fácil utilização e alta resolução na identificação de isolados de *T. gondii* (Su et al., 2010).

Dubey et al. (2007) utilizando 11 marcadores moleculares (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2 e Apico) observaram grande diversidade genética nas populações de *T. gondii* isolados de galinhas caipiras do Pará e Rio Grande do Sul. As análises mostraram que os isolados de *T. gondii* eram geneticamente distintos entre as duas regiões estudadas e com 3500 km de distância.

Posteriormente, um estudo feito com 125 isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas, cães e gatos do estado de São Paulo revelou 48 genótipos e mais quatro com linhagens típicas do Brasil denominadas BrI, BrII, BrIII, BrIV. De acordo com a taxa de mortalidade em camundongos infectados, determinou-se que o tipo BrI foi como virulento, o tipo BrII como avirulento e os tipos BrIII e BrIV como de virulência intermediária (Pena et al., 2008).

Estudos de genotipagem de cepas de *T. gondii* isolados de animais selvagens e pacientes de diferentes regiões geográficas, revelaram uma alta frequência de genótipos não-arquétipos sugerindo uma alta diversidade da população de *T. gondii* (Su et al., 2006).

Cepas não clonais, recombinantes ou atípicas foram determinadas em isolados de cães, gatos, gatos selvagens, gambás, ratos, esquilos, tucanos, capivaras e ursos de diversas partes do mundo (Brasil, Costa Rica, México, Egito, Alasca, Índia). Em todos os estudos foram utilizados os 11 de marcadores moleculares (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt -SAG2 e Apico) (Dubey et al., 2009; Yai et al., 2009; Al-Kappany et al., 2010; Dubey et al., 2010; Frazão-Teixeira et al., 2011).

Um estudo realizado na ilha de Fernando de Noronha (PE) indicou que isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas caipiras apresentaram os genótipos originais, isto é, clonais que são dominantes na Europa e América do Norte. Foram encontrados seis genótipos incluindo o tipo II, tipo III e 4 novos genótipos ainda não encontrados no Brasil. Este resultado foi inesperado, já que isolados do Brasil são fenotipicamente e geneticamente diferentes dos isolados de outros países (Dubey et al.; 2010).

É descrita a tentativa de vários pesquisadores no isolamento do *T. gondii* em felídeos silvestres, a partir de amostras teciduais. Os estudos demonstraram que apesar de alguns animais sejam soropositivos para o agente, em muitos casos não foi possível obter positividade pela PCR, devido a baixa quantidade do parasita no tecido (Miller et al., 2008, Cañón Franco et al., 2013).

Sendo assim, a PCR-RFLP ainda é a técnica mais utilizada para genotipagem de cepas de *T.gondii*, contribuindo positivamente na caracterização genotípica de isolados de *T.gondii* de animais e humanos em todo o mundo (Howe e Sibley, 1995; Su et al., 2010). No Brasil, a maioria dos isolados genotipados foi coletada de animais, sendo poucos trabalhos realizando genotipagem em isolados humanos pela dificuldade da coleta das amostras (Vallochi et al., 2005; Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2011; Carneiro et al., 2013). Portanto, novas e diferentes regiões do genoma de *T. gondii* já foram analisadas, aumentando assim o número de marcadores para realizar a genotipagem das amostras brasileiras (Su et al., 2006). Diferentes marcadores foram descritos e com excelentes resultados quando utilizados para analisar isodados de animais brasileiros (Pena et al., 2006; Pena et al., 2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

O avanço da agricultura e da pecuária próximo às áreas naturais proporcionou um maior contato entre as populações humanas e de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus habitats. Este estreito contato facilitou a disseminação de agentes infeccioso-parasitários para outros hospedeiros e ambientes, estabelecendo novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão de doenças. Nesse panorama, a infecção por *T. gondii* ganha atenção por esse agente estar presente nos diversos reservatórios animais, sendo uma zoonose de importância clínica.

Nos EUA, a toxoplasmose é a terceira causa de óbitos de origem alimentar (Castro et al., 2008) e calcula-se que ocorrem aproximadamente 1.500.000 novas infecções agudas por ano, sendo 15% assintomáticas (Aigner, 2008). No Brasil, a prevalência da infecção por *T. gondii* varia entre 10% a 90% dependendo da área estudada, sendo as gestantes o grupo de maior risco (Dubey et al., 2012). Em Mato Grosso, a soroprevalência de gestantes foi de 70,7% entre as pacientes estudadas (Leão et al., 2001).

Em um estudo realizado pela equipe do Laboratório de Toxoplasmose (LabTOXO) – IOC – Fiocruz, no qual foi observada uma alta soroprevalência (90,7%) estabelecida nos gatos domésticos de Santa Rita de Cássia, Barra Mansa, município rural do estado do Rio de Janeiro, evidenciou-se uma correlação linear positiva entre a infecção humana e a animal. O valor dessa correlação foi elevado, próximo de 1 (correlação de Pearson = 0,852), ou seja, quanto mais frequente a infecção humana mais frequente a infecção animal. Este fato sugere que havia na região uma elevada taxa de contaminação ambiental, devido à possibilidade de grande eliminação de oocistos no meio ambiente. Tal fato poderia, também, estar contribuindo para a alta prevalência (65,9%) da infecção na população humana da região, indicando prováveis fontes comuns de infecção entre humanos e animais. Nesta população, a prevalência de lesões cicatrizadas compatíveis com toxoplasmose ocular foi de 5,8% entre os indivíduos com sorologia positiva para *Toxoplasma gondii*, sendo encontrada associação entre o polimorfismo para IFN gama e a susceptibilidade ao desenvolvimento das lesões oculares toxoplásmicas (Bonna, 2008).

Realizar estudos em regiões como o Pantanal é importante porque são áreas que albergam grande variedade de espécies de animais silvestres, havendo ambientes com pouca ou nenhuma ação antrópica. É fundamental entendermos como é a dinâmica da infecção por *Toxoplasma gondii* na população silvestre, principalmente nos felídeos, que são responsáveis

pela eliminação de oocistos, contaminando o ambiente. Conseqüentemente, ocorre a infecção de animais domésticos, animais domésticos de produção e o homem, sendo este se infectando através do contato com o solo e principalmente, manipulando e se alimentando de forma inadequada de produtos de origem animal. Contudo, é importante realizar o estudo envolvendo todas essas populações para haver um entendimento melhor da epidemiologia da infecção.

A região da Nhecolândia foi escolhida por contarmos com o apoio do campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Pantanal (Fazenda Nhumirim), com todo apoio logístico que o presente estudo necessitou.

Poucos estudos são realizados em animais silvestres, principalmente devido à dificuldade de trabalho a campo na captura desses animais. Mas essa barreira deve ser vencida para elucidar questionamentos e trazer soluções no controle de zoonoses objetivando principalmente a saúde pública.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a prevalência da infecção por *T. gondii* em animais silvestres, bovinos, suínos (porco-monteiro) e população humana, em um mesmo intervalo de tempo, na região de Nhecolândia, Pantanal sul-matogrossense, utilizando métodos de diagnóstico sorológicos e moleculares.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Descrever a prevalência da infecção por *T. gondii*, através de métodos sorológicos e moleculares em animais silvestres de vida livre (*Leopardus pardalis*, *Nasua nasua* e *Cerdocyon thous*).

Através da RFLP, identificar os genótipos de *T. gondii* em amostras clínicas de carnívoros silvestres (*Leopardus pardalis*, *Nasua nasua* e *Cerdocyon thous*) e pequenos roedores silvestres, todos de vida livre.

Descrever a soroprevalência da infecção por *T. gondii*, em bovinos, criados para o abate e consumo humano em uma propriedade rural onde há contato com animais silvestres.

Descrever a soroprevalência da infecção por *T. gondii*, em porcos-monteiro de vida livre.

Descrever a soroprevalência da infecção por *T. gondii* e a ocorrência de lesões oculares associadas a esse parasito nas populações humanas das propriedades rurais estudadas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Aspectos Éticos**

Com relação aos humanos, este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC, FIOCRUZ, CAAE 4865.0.000.009-10, de acordo com a resolução 196/96 do CNS-MS. Para o trabalho com os animais silvestres, este projeto foi aprovado no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), sob número 27103-1. Para os animais domésticos, o projeto foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais), FIOCRUZ, sob número L35/13. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelas pessoas que concordaram em participar do projeto está sob a guarda do pesquisador responsável pelo projeto no Laboratório de Toxoplasmoses/IOC/Fiocruz (Anexo 4).

### **4.2. Local e período da coleta**

As amostras foram coletadas no período de março de 2011 a julho de 2012 na região de Nhecolândia, na Fazenda Nhumirim (Figura 4), uma unidade experimental da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Pantanal, situado no Pantanal sul-matogrossense (18°59'11"S 56°37'19"W), Brasil. A fazenda Nhumirim (4.313 hectares), localizada a 160 Km de Corumbá com acomodações, sala de estudos e laboratórios. A fazenda conta com uma área protegida desde 1988, com 862 ha, declarada como Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN). No estudo com as comunidades rurais, além da Fazenda Nhumirim, outras propriedades circunvizinhas foram visitadas a fim de convidar as pessoas residentes a participar do projeto, tais como: Fazenda Alegria, Fazenda Campo Dora, Fazenda Ipanema, Fazenda Dom Valdir.

A região é caracterizada por uma mistura de vegetação com características de floresta semidecíduas, cerrado, cerradão e vegetação arbustiva esparsa. O solo é predominantemente arenoso, além de apresentar um grande número de lagoas permanentes ou temporárias e campos sazonalmente inundáveis (Rocha, 2006). Uma descrição mais detalhada da área de estudo pode ser encontrada em Soriano et al.(1997).

Figura 4: Localização da Fazenda Nhumirim na região do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil.



Fonte: <http://marcelosouzarn.com.br/blog/pesquisas-se-multiplicam-no-pantanal-veco/>

#### 4.3. População alvo da pesquisa

- Animais silvestres: Foram avaliados nesse estudo os principais animais silvestres da área de estudo pertencentes a diferentes famílias. Dentre estes, capturamos três espécies de carnívoros de médio porte: jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), quatis (*Nasua nasua*) e lobinhos ou cachorro do mato (*Cerdocyon thous*). Algumas amostras de pequenos roedores (N=42) foram gentilmente cedidas para realizarmos o diagnóstico molecular para *T. gondii*. Portanto, foram coletadas amostras teciduais de cérebro, pulmão e músculo de animais do Gênero *Trichomys*.
  - Bovinos: Foram coletados amostras sanguíneas de 442 bovinos de corte, raça tucura, da Fazenda Nhumirim, cuja criação fosse destinada ao consumo humano. O soro desses animais foi enviado e armazenado no Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz.
  - Porco-monteiro: Os porco-monteiros (N=148) precisaram ser capturados, visto que se trata de uma espécie de suíno de vida selvagem no Pantanal. As amostras sanguíneas foram coletadas no decorrer do ano de 2010 na fazenda Nhumirim e fazendas circunvizinhas.
  - Comunidade local: Foi coletado sangue de moradores das propriedades rurais acima de 18 anos de idade, para realização do estudo de soroprevalência da infecção por *T. gondii*.
- Todos os funcionários da EMBRAPA Pantanal foram convidados a participar do projeto na

Semana da Segurança do trabalhador realizada no dia 17 de outubro de 2011. Nesta mesma semana, famílias que residiam em outras propriedades circunvizinhas à Fazenda Nhumirim foram convidadas a participar do presente estudo, totalizando 73 pessoas.

- Critério de inclusão: foram incluídos no estudo todos os indivíduos com mais de 18 anos que, após esclarecidos sobre o projeto, aceitaram e assinaram o TCLE.
- Critério de exclusão: foram excluídos do estudo todos os indivíduos menores de 18 anos ou que, após esclarecidos sobre o projeto não aceitaram ou não assinaram o TCLE.
- Remuneração dos indivíduos: não houve remuneração dos participantes do projeto.
- Confidencialidade: o indivíduo da pesquisa foi informado de que quaisquer informações dadas, e os resultados dos testes sorológicos não seriam divulgados a não ser em artigos científicos, sem qualquer identificação da pessoa.
- Guarda do material biológico: o sangue e o soro, que foi extraído do sangue dos participantes do estudo foram armazenados no banco de soros que está localizado no Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz, sob a guarda da Dra Maria Regina Reis Amendoeira, chefe do LabTOXO. O indivíduo da atual pesquisa foi informado, por meio do TCLE, que o seu material biológico foi utilizado apenas na presente projeto e caso o material estocado venha ser solicitado, para uma nova pesquisa, será feita uma nova submissão ao CEP (Anexo 1).

#### **4.4. Captura e contenção física dos animais silvestres**

Os mamíferos silvestres foram capturados através do uso de dez armadilhas feitas de ferro galvanizado de 40x50x100 cm (Zootech®) ou equipamentos de contenção física, tais como puçás ou luvas de raspas, quando necessário. As armadilhas foram iscadas com toucinho para atrair o animal. As armadilhas do tipo gaiolas possuem um sistema de desarme tipo “guilhotina”, que é acionado por um gatilho no momento em que o animal entra na gaiola para comer a isca. O piso da armadilha, quando esta foi armada suspensa, ficou sobre uma plataforma de madeira para evitar lesões nas patas, e a porção superior e laterais foram cobertas com folhas de acuri (*Attalea phalerata*) para camuflar a armadilha, proteger o animal da luz solar direta, reduzir o risco de hipertermia e diminuir o estresse dos animais capturados (Figura 5). As armadilhas ficaram armadas por 24 horas e foram checadas pelo menos duas vezes ao dia, no início da manhã e no final da tarde.

Figura 5: Armadilha armada e suspensa, coberta com folhas de acuri.



#### 4.5. Contenção química dos animais silvestres

No momento de administrar a anestesia no animal, devido à agilidade característica das espécies estudadas e para evitar a quebra de agulhas ou ferimentos no animal, foi utilizado um “sistema de prensa móvel”. Dessa forma é possível imobilizar o animal capturado ao fundo da armadilha para então realizar a administração da anestesia, promovendo segurança tanto para o animal como para a equipe de campo.

Foram utilizados protocolos anestésicos seguros a cada espécie, garantindo a segurança dos procedimentos e o retorno seguro do animal. O fármaco utilizado foi o Tiletamina-zolazepam (Zoletil®) administrado por via intramuscular. O peso foi inicialmente estimado, sendo mensurado após a anestesia do animal. A dose para canídeos e felídeos foi de 8 mg/Kg e suídeos e roedores de 5 mg/Kg. Quando necessário, foi administrado sulfato de atropina na dose de 0,04 mg/kg via subcutânea, para diminuir a sialorréia e agir como estimulante cardíaco e respiratório.

Os parâmetros fisiológicos, tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corpórea, foram avaliados e anotados em fichas individuais de controle anestésico. A recuperação anestésica foi acompanhada pela equipe.

Durante o manuseio, os olhos foram umedecidos com solução fisiológica para prevenir o ressecamento da córnea e foram colocadas vendas e tampões de ouvido nos animais para reduzir estímulos visuais e sonoros.

#### **4.6. Marcação dos animais silvestres**

Em todos os animais silvestres capturados do estudo foram realizados procedimentos de identificação e marcação através da aplicação de *microchips* e brincos numerados, exceto àqueles que já apresentarem identificação por este método.

#### **4.7. Coleta do material biológico**

##### **4.7.1. Animais silvestres**

Após a adequada contenção física e/ou química, foi realizada preferencialmente por venocentese jugular ou por outro vaso aparente, utilizando-se tubos estéreis a vácuo devidamente identificados. Após a refração do coágulo, a amostra foi centrifugada a 1000g durante 10 minutos. Os soros foram identificados e armazenados em tubos de polipropileno, mantidos a temperatura de -20°C, até a realização dos testes sorológicos.

Dos felídeos silvestres além do soro, foram coletadas as fezes através de sondagem da ampola retal. As fezes coletadas foram armazenadas em recipientes plásticos estéreis devidamente identificados individualmente e congeladas até a realização da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

##### **4.7.2. Bovinos**

Foram coletadas amostras de sangue dos bovinos (aproximadamente 5 ml) de diferentes faixas etárias, pertencentes à fazenda Nhumirim. O sangue foi coletado através de venocentese jugular. O material utilizado, processamento e armazenamento foram realizados da mesma maneira como descritos nos animais silvestres.

As amostras de sangue dos bovinos foram coletadas pela equipe da EMBRAPA Pantanal para projetos internos e cedidas para o presente projeto.

Nos bovinos abatidos para consumo na Fazenda Nhumirim, foram coletadas amostras teciduais para realização da PCR, tais como músculo esquelético e pulmão. As amostras foram congeladas a -20°C.

### **4.7.3. Porco-monteiro**

A busca de animais em campo foi feita com veículo 4x4 ou a cavalo. Os animais a serem capturados foram selecionados de forma aleatória, desconsiderando-se fatores como sexo, idade e localização, sendo a amostragem feita sem reposição. Quando um grupo de animais era avistado, a aproximação era feita de forma discreta até que se atingia uma distância aproximada de 100 a 200m do grupo. A partir desta distância, iniciava-se a perseguição dos indivíduos, que após poucos minutos reduziam sua velocidade de fuga e podiam ser laçados ou apanhados manualmente pelos assistentes de campo. Eventualmente (no caso de animais muito grandes), a completa imobilização física dos animais era garantida com o uso de peias, a fim de manter a segurança da equipe até a administração de anestésico. Imediatamente após a contenção física os animais recebiam uma dose anestésica baseada na estimativa visual de seu peso vivo. Além disso, vendas e tampão de orelha eram utilizados e os indivíduos eram levados à sombra, em local plano e seco, para biometria e colheita de amostras biológicas. Todos os animais foram capturados e manuseados por funcionários da EMBRAPA Pantanal, treinados para esta prática e supervisionados por um pesquisador especialista em captura de animais silvestres (Licença SISBIO # 21416-1). Em cerca de 30% das capturas, especialmente quando os porcos foram procurados a cavalo, uma matilha de dois a cinco cães treinados (aptos para a perseguição dos suínos sem sofrerem ou infringirem injúrias) podiam ser liberados para auxiliarem na captura dos animais. Após o animal a ser capturado ser parado (acuado) pelos cães, este era laçado ou apanhado manualmente pelos peões.

Para a contenção química dos animais utilizou-se uma mistura do conteúdo liofilizado da associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (Zoletil® 50, Virbac) com cloridrato de xilazina (Sedomin® - König do Brasil), preparados no mesmo frasco. A proporção de concentrações utilizada foi de 1:1 (2,5 mL de diluidor com 2,5 mL de Sedomin® no frasco de Zoletil® 50) resultando em uma solução de 5 mL com 250 mg de tiletamina-zolazepam (50 mg/mL) e 250 mg de xilazina (50 mg/mL). A dosagem, utilizada,

foi de 2 mg/kg de tiletamina-zolazepam e 2 mg/kg de xilazina por via intramuscular, como sugerido por Gabor et al. (1997).

A coleta das amostras sanguíneas foi realizada através de venopunção (veia mamária), por um veterinário da equipe. Ao todo, foram coletadas amostras de 148 animais adultos. Após a retração do coágulo, a amostra foi centrifugada a 1000g durante 10 minutos. Os soros foram identificados e armazenados em tubos de polipropileno, mantidos a temperatura de -20°C, até a realização dos testes sorológicos que foram analisadas no Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

#### **4.7.4. Comunidade local**

Foram coletadas amostras de sangue de 73 pessoas com idade superior a 18 anos, conviventes com os animais domésticos de produção e próximos aos animais silvestres da região estudada. A coleta foi realizada por punção venosa, sob responsabilidade de uma auxiliar de enfermagem, da Secretária de Saúde do município de Corumbá-MS.

Todos os indivíduos assinaram o TCLE após serem informados e esclarecidos sobre a sua participação e antes dos procedimentos.

Foi realizado um exame clínico, seguido um protocolo, estabelecido por um médico oftalmologista. Tal exame foi realizado em uma sala apropriada da EMBRAPA Pantanal.

##### **4.7.4.1. Exame oftalmológico**

O Exame oftalmológico foi realizado nas dependências da fazenda Nhumirim. Para isso, contamos com energia elétrica fornecida através de um gerador. Os aparelhos necessários para proceder com os exames eram de patrimônio particular e foram levados pela médica oftalmologista, colaboradora do projeto.

Todos os indivíduos sororeagentes foram examinados pela Dra. Ana Luisa Quintella do Couto Aleixo a fim de verificar a presença de alterações fundoscópicas. Os pacientes foram orientados quanto ao leve desconforto transitório (representado por ardência à instilação e fotofobia) gerado pela instilação do colírio midriático, pela midríase e pela luz emitida pelo oftalmoscópio indireto. Foram esclarecidos quanto à dificuldade de realização de tarefas que necessitassem de visão para perto nas três horas que sucedem o exame oftalmológico. Antes da instilação do colírio midriático todos os pacientes foram examinados na lâmpada de fenda para avaliação do segmento anterior, sendo contra-indicada a midríase

nos casos suspeitos de ângulo estreito. A acuidade visual foi aferida antes da midríase por meio da tabela de Snellen de optotipos.

Foram consideradas lesões compatíveis com toxoplasmose: focos de retinocoroidite em atividade, caracterizados por lesões da coróide e da retina brancacentas com ou sem exsudação vítrea; focos de retinocoroidite cicatrizados com as seguintes características (Oréfice, 2005): limites bem marcados com halo de hiperpigmentação e área de atrofia coriorretiniana central (tipo 1), lesões com halo hipopigmentado e área central hiperpigmentada (tipo 2) e lesões hiperpigmentadas ou hipopigmentadas compatíveis com hiperplasia ou atrofia do epitélio pigmentar retiniano (tipo 3).

As lesões foram chamadas de centrais se estivessem localizadas entre as grandes arcadas vasculares, sendo subdivididas ainda em: maculares, perimaculares e peripapilares. As lesões periféricas tinham sua localização definida nas áreas nasal e temporal superiores e nasal e temporal inferiores, nasal, temporal, superior e inferior. Foram consideradas lesões extensas aquelas que mediam mais de três diâmetros de disco.

#### **4.8. Manutenção e obtenção do *T. gondii***

Os parasitas utilizados foram taquizoítas de cepa RH, que é uma linhagem altamente virulenta, não cistogênica e de multiplicação rápida. A manutenção da cepa foi realizada em camundongos machos da linhagem Swiss, com idade entre 25 e 30 dias, provenientes de biotério (FIOCRUZ), por via intraperitoneal com média de 100 taquizoítas por animal. Após três ou quatro dias de infecção foi realizada uma lavagem intraperitoneal com 5 mL de solução fisiológica estéril para a retirada dos taquizoítas, seguindo da contagem de parasitas em câmara de Neubauer e acertada na concentração desejada. Os taquizoítas obtidos foram utilizados para a manutenção da cepa através de passagem para um novo grupo de animais, para extração de DNA e para a preparação dos antígenos.

Os taquizoítas obtidos neste procedimento, após a realização da extração de DNA, foram utilizados para padronizar a técnica da PCR e serem utilizados como controle positivo nas análises das amostras clínicas.

## 4.9. Exames sorológicos

### 4.9.1. Local de realização

As amostras de soros sanguíneos estocadas a -20°C foram analisadas no Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz, sob coordenação da Dra. Maria Regina Reis Amendoeira.

### 4.9.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* foi utilizada a técnica RIFI, de acordo por Camargo (1964), utilizando-se soro anti-IgG.

Os soros foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato 0,1M, pH 7,2 (PBS), em múltiplos de dois, com título inicial de 64. Dez µL do soro foram adicionados nos poços das lâminas contendo o antígeno. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C por 40 minutos. Em seguida, as mesmas foram lavadas três vezes em tampão PBS, por 10 minutos e colocadas para secar em estufa a 37°C. Posteriormente, foram adicionadas 10 µL do conjugado anti-IgG referente à espécie em questão (Sigma Chemical, F7887) marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído (1:1200) de acordo com as informações do fabricante, em azul de Evans a 0,01%. As lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por 40 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão PBS por 10 minutos e uma vez com água destilada por 1 minuto para remoção do excesso dos sais e colocadas para secar em estufa a 37°C por 10 minutos. Após a secagem foi adicionada glicerina tamponada em carbonato bicarbonato 0,1M, pH 9,5 e as mesmas foram recobertas por lamínulas e examinadas em microscópio de imunofluorescência com objetiva de 40 x. Para cada lâmina, houve um poço destinado a um soro controle positivo e negativo.

Para os animais, foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência em toda a periferia do parasito, ainda que em pequena intensidade e cujos títulos iguais ou superiores a 1:64. As reações negativas foram caracterizadas quando os taquizoítas não apresentaram fluorescência, podendo ser observada uma coloração avermelhada na lâmina e quando houve reação apical, em que apenas a extremidade apical do *Toxoplasma* mostrou reatividade.

Para os humanos, foram consideradas positivas as amostras com título igual ou superior a 1:16. Foram utilizados conjugados anti-IgG (Sigma Chemical, F3512) e anti-IgM humana (Sigma Chemical, F9762).

#### 4.9.3. Reação de Hemaglutinação Indireta

As amostras de todos os animais foram analisadas pela técnica de Hemaglutinação Indireta conforme especificações do fabricante (Kit Toxotest HAI, Wiener lab). Foram considerados positivos títulos na diluição 1:64 para bovinos e 1:16 para animais silvestres.

#### 4.9.4. Técnica de aglutinação direta modificada (MAT)

Nas amostras de animais silvestres foram realizadas a Técnica de aglutinação direta modificada (MAT) de acordo com Dubey & Desmonts (1987). Foram consideradas positivas amostras com títulos iguais ou maiores que 1:25.

### **4.10. Diagnóstico molecular**

#### 4.10.1. Extração de DNA

Para as extrações de amostras sanguíneas e teciduais foi usado o kit de extração de DNA da QIAGEN® (QIAamp DNA *Blood* Mini Kit Handbook), seguindo as especificações do fabricante.

Para as amostras de fezes, realizamos as extrações utilizando o Kit “QIAamp DNA Stool Mini Kit”, seguindo as especificações do fabricante. No entanto, antes de realizar as extrações, conforme o protocolo, foi realizado um choque térmico (utilizando banho maria e gelo seco), com o objetivo de romper a parede dos oocistos.

#### 4.10.2. Reação pela Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a reação de PCR foram utilizados iniciadores sintetizados pela Invitrogen®, que amplificam um segmento específico do gene B1, do *T. gondii*, gerando um produto

amplificado de 194 pb. Os iniciadores foram descritos por Burg et al., (1989), e têm sido os mais usados desde então.

Foram designados como TX-1 (oligo 1 de Burg) e TX-2 (oligo 4 de Burg) os correspondentes aos nucleotídeos 694 a 714 e 887 a 868 do gene B1, respectivamente (Burg et al., 1989), sendo: TX-1: 5' GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG 3' e TX-2: TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC 3'.

Para cada reação foram utilizadas com as respectivas concentrações: 26 µL de água, 5 µL de tampão (1X da Invitrogen®), 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM da Invitrogen®), 5µL de dNTP (200µM), 1µL do iniciador Tx-1 (10pmol/µL), 1µL do iniciador Tx-2 (10pmol/µL), 0,5µL da Taq-Polimerase (2,5U) e 10µL da amostra de DNA.

Os produtos amplificados foram diluídos em tampão de corrida (30% glicerol; 0,25% xilenocianol FF; 0,25% azul de bromefenol) na proporção de 1:6, aplicados em gel de agarose 2% em TEB (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 0,1 µl/ml de GelRed (Biotium Products®).

#### 4.10.3. Genotipagem

Todas as amostras positivas pela PCR foram triadas para a realização da genotipagem através da PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição). Para este fim, foram escolhidos 12 marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2, CS3 e Apico (Su et al., 2006; Su et al., 2010).

##### 4.10.3.1. 1º PCR (*Multiplex*)

Para as reações em multiplex foram adicionados os oligonucleotídeos iniciadores externos dos marcadores SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico (Tabela 2). Cada reação foi realizada adicionando-se 0,25 ul do mix de Primer Forward (25 uM), 0,25 ul do mix de Primer Reverse (25 uM), 2,5 ul de tampão de PCR 10X sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 2 ul do mix de desoxinucleotídeos (2.5mM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 ul 50mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,2 ul de DNA Taq polimerase (5U/ul), 3 µl de DNA de cepas de *T.gondii*, em um volume final de 25 ul completado com água ultrapura. As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com

30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando por um ciclo de extensão por 3 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram diluídos adicionando-se 25 µl de água ultrapura e armazenados a -20°C utilizados posteriormente no 2ºPCR.

#### 4.10.3.2. 2ºPCR ou *Nested-PCR*

Para cada marcador realizou-se uma reação, onde foram adicionados oligonucleotídeos iniciadores externos, conforme descrito por Ferreira (2008). As concentrações de todos os componentes foram às mesmas descritas na reação de multilocus - PCR, com exceção das concentrações dos oligonucleotídeos, onde cada região do DNA foi amplificada separadamente com 0,5 µl (50 µM). As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando por um ciclo de extensão por 3 minutos a 72°C.

#### 4.10.3.3. PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)

O polimorfismo de cada locus foi analisado por RFLP. Os fragmentos amplificados da *Nested-PCR* foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas para os diferentes marcadores na temperatura adequada para cada enzima e de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação cepas RH, ME - 49, VEG, GTI, PTG, CTG, COUGAR (TgCgCaI), MAS, TgCatBr5 foram utilizadas como controles positivos. Os dados das enzimas de restrição, temperatura, tempo e concentração do gel de agarose estão descritos na Tabela 3, conforme Ferreira (2008).

Consideramos como resultado, ou seja, amostras passíveis de realizar a caracterização molecular, aquelas que demonstraram positividade em oito ou mais marcadores genotípicos.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados no 1ºPCR (Multiplex) e 2ºPCR (Nested) e enzimas de restrição

Marcadores	Iniciadores externos 5'→3'	Iniciadores internos 5'→3'	(RFLP)
SAG1	GTTCTAACCACGCACCCTGAG AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	CAATGTGCACCTGTAGGAAGC GTGTTCTCCGTCCGTGTGAG	Sau96I+HaeII (digestão dupla)
5'-SAG2	GCTACCTCGAACAGGAACAC GCATCAACAGTCTTCGTTGC	GAAATGTTTCAGGTTGCTGC GCAAGAGCGAACTTGAACAC	Sau3 AI
3'-SAG2	TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC TCAAAGCGTGCATTATCGC	ATTCTCATGCCTCCGCTTC AACGTTTACGAAGGCACAC	HhaI
SAG3	CAACTCTCACCATTCCACCC GCGCGTTGTTAGACAAGACA	CACAAGGAGACCGAGAAGGA TCTTGTCCGGTGTTCACCTCA	NciI
GRA6	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTGTT	TTTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCGAAGAGTTGACATAG	MseI
BTUB	TCCAAAATGAGAGAAATCGT AAATTGAAATGACGGAAGAA	GAGGTCATCCTCGGACGAACA TTGTAGGAACACCCGGACGC	BsiEI+TaqI (digestão dupla)
c22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	TCTCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGGATATTGCGC	BsmA I, Mbo II
c29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AGGGTCTCTTGCGCATAACAT	AGTTCTGCAGAGTGTGCGC TGTCTAGGAAAGAGGCGC	HpyCH4IV, Rsa I
L358	TCTCTCGACTTCGCTCTTC GCAATTTCTCGAAGACAGG	AGGAGGCGTAGCGCAAGT CCCTCTGGCTGCAGTGCT	Hae III, Nla III
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	CGCAAAGGAGACAATCAGT TCATCGCTGAATCTCATTGC	Ava I, Rsa I
alt-SAG2	GGAACGCGAACAATGAGTTT GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTTCCAGCAGCGGGAGCAC	Hinf I, Taq I
Apico	TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	TGCAAATTTCTGAATCTCAGTT GGGATTCGAACCCCTTGATA	Afl II, Dde I

Fonte: Ferreira (2008).

**Tabela 3:** Descrição dos marcadores genotípicos com os tratamentos utilizados com as respectivas enzimas de restrição com dados de temperatura, tempo e concentração do gel de agarose.

<b>Marcador</b>	<b>Enzima</b>	<b>Temperatura/Tempo</b>	<b>Gel (%)</b>
SAG 1	Sau96I/HaeII	37°C/60'	2,5%
SAG 3	NciI	37°C/60'	2,5%
3'-SAG 2	HhaI	37°C/60'	2,5%
5'-SAG 2	MboI	37°C/60'	2,5%
GRA6	MseI	37°C/60'	2,5%
NewSAG2	HinfI/TaqI	37°C/30'; 65°C/30'	2,5%
L358	HaeIII/NlaIII	37°C/60'	2,5%
PK1	RsaI/AvaI	37°C/60'	2,5%
C22	BsmAI/AvaI	37°C/30'; 55°C/30'	2,5%
C29	HpyCH4IV/RsaI	37°C/60'	2,0%
APICO	AfIII/DdeI	37°C/60'	3,0%
CS3	MboI/NlaIII	37°C/60'	2,5%

*Fonte:* Ferreira (2008).

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados no formato de artigos em fase de publicação.

Nesta seção, esses resultados estão ordenados da seguinte forma:

- 5.1. ARTIGO 1: Apresenta e discute os resultados da análise sorológica e molecular dos animais silvestres, utilizando a Hemaglutinação Indireta, Reação de Imunofluorescência Indireta e a Reação em Cadeia pela polimerase. Submetido a “*ACTA TROPICA*”.
- 5.2. ARTIGO 2: Apresenta e discute os resultados sorológicos das amostras biológicas dos porcos-monteiro, utilizando a Hemaglutinação Indireta e Reação de Imunofluorescência Indireta. Submetido e adequado de acordo com sugestões dos revisores do “*Journal of Wildlife Diseases*”.
- 5.3. ARTIGO 3: Apresenta e discute os resultados sorológicos das amostras da comunidade rural da região estudada, como também dos bovinos e cães. Artigo submetido à “*Pesquisa Veterinária Brasileira*”.
- 5.4. ARTIGO 4: Apresenta o resultado da caracterização molecular das amostras dos animais silvestres deste estudo, realizado através da técnica RFLP-PCR. Artigo em fase de produção juntamente com os colaboradores desta etapa.

## 5.1. ARTIGO 1

Molecular and serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in wild carnivores and rodents in the Pantanal (subregion Nhecolândia) Brazil.

Magyda Arabia Araji Dahroug<sup>1,2\*</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, José Leonardo Nicolau<sup>2</sup>, Leandro Bastista das Neves<sup>2</sup>, Juliane Saab<sup>3</sup>, Paula Melges Felix<sup>3</sup>, Erotides Capistrano da Silva<sup>4</sup>, Pâmela Castro Antunes<sup>5</sup>, Guilherme de Miranda Mourão<sup>3</sup>, Maria Regina Reis Amendoeira<sup>2</sup>

1. Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças infecciosas – IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
2. Laboratório de Toxoplasmose – IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
3. Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – EMBRAPA Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul.
4. Veterinary Practitioner, Lexington KY 40503, USA.
5. Laboratório de Ecologia e Conservação de Populações, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ).

\*Corresponding author: Tel: +55 67 9933 1509; E-mail: magyda@gmail.com

## ABSTRACT

Reports from several parts of the world have demonstrated the importance of the sylvatic cycle in the epidemiology of *Toxoplasma gondii* infections. However, despite the known role of some wild felids as definitive hosts for maintenance and transmission of the parasite to other carnivore predators, little is known about the incidence of *Toxoplasma gondii* in these animals. Therefore the objective of this study was to detect exposure and occurrence of the *T. gondii* infection in wild carnivores and rodents of the Pantanal (sub-region subregion Nhecolândia), Brazil, using serologic (HAI, RIFI and MAT) and PCR. The carnivores were captured in traps containing lures and after chemical restraint samples (blood of all animals and feces of the felines) were harvested and preserved until further analyses. In the present study, three species of carnivores were evaluated : ring-tailed coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and ocelots (*Leopardus pardalis*). Forty two rodents (Trycomis) also evaluated had PCR analyses performed in brain, lung and muscle). Serological analyses demonstrated exposure to *Toxoplasma gondii* in 29.16% of the ring-tailed coati (7/24), 47.82% in crab-eating fox (11/23) and 100% in ocelots (2/2). The PCR analyses showed that 41.66% (10/24) of the ring-tailed coati were positive, comparing to 47.82% (11/23) in crab-eating fox and 100% (2/2) in ocelots. In small rodents, the positive results were 23.80% (10/42) by PCR.

Key-words: *Toxoplasma gondii*, *Nasua nasua*, *Cerdocyon thous*, *Leopardus pardalis*, small rodents.

## 1. INTRODUCTION

The studies of infectious diseases in nondomestic animals can be a challenge and at the same time complex (Friend, 2005). The studies of wild animal's conservation show even more researchers worrying with the increase of the pathogenic agents in these animals (Furtado and Filoni, 2008). Some wildlife studies can demonstrate the importance of the potential effects of the infectious diseases and analyze the risk factors, as the growing destruction of the natural environment and the increase contact with the domestic animals, facilitating the dynamic of the dissemination (Nava et al., 2008)

The toxoplasmosis is caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular coccidian that infects warm-blood animals. Several species of wild and domestic mammals, including human and avian can be infected by *Toxoplasma gondii*. The definitive hosts (i.e. members of the family Felidae) are required to complete *Toxoplasma gondii* life cycle by sexual reproduction. Upon elimination of oocysts in the environment, the sporulation takes place and then the sporums are capable of infecting host warm blood animals (Dubey et al., 1970). Highly resilient, oocysts can survive up to one year in humid and warm environments but not in dry climates (Frenkel and Ruiz, 1981).

Several studies reported the seroprevalence of toxoplasmosis in wild animals, especially captive wild felids in the zoos (Lukesova and Literak, 1998; Silva et al., 2001; Spencer et al., 2003; Kikuchi et al., 2004; Basso et al., 2005; Brown et al., 2005; Buddhirongawatr et al., 2006; Andrade et al., 2007; de Camps et al., 2008). Studies carried out with free-ranging wild animals showed exposure to *Toxoplasma gondii* to be from 51.4% to 71.4% among three species: *Procyon lotor*, *Canis latrans* and *Mephitis mephitis* (Dubey et al., 2007); 15% to 47% in wild mammals (Hill et al., 1998, Shannon et al., 2011). In Africa, the overall seroprevalence was 96% among nondomestic felids (Hove; Mukaratirwa, 2005). In

Pennsylvania, the seroprevalence was 83% of the captured nondomestic felids (Mucker et al., 2006). and the seroprevalence in the Sweden was 75,4% of the captured nondomestic felids (Ryser-Degiorgis et al., 2006) In the United Arab Emirates, Pas and Dubey (2008) have found seroprevalence of *T. gondii* in all of the wild felid of the species *Felis silvestris gordonii*, which is threatened with extinction.

In Brazil, a seroprevalence study in wild animals in the Amazon area demonstrated that 75% of the wild felids (*Felis* ssp) and 61.1% of the rodents (*Proechinys* ssp) were positive for *T. gondii* infection (Ferradoni; Marzochi, 1980). Relatively few studies have been conducted to determine the prevalence of *T. gondii* infection among wild animals in Brazil. To the best of our knowledge, this is the first study in Brazil that involves captures *in-situ* to evaluate parasites and the first to use molecular diagnostic methods in this specific area (Pantanal - Subregion Nhecolândia).

Therefore the objective of this study was to detect the occurrence of the *Toxoplasma gondii* infection in wild carnivores and rodents of Pantanal (the Nhecolândia region), Brazil, using serologic and molecular techniques. This is the first study in Brazil that involves captures *in-situ* to evaluate parasites and the first to use molecular diagnostic methods in this specific area.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 1.1. *Geographic location and collect season*

The samples were obtained between March of 2011 and June of 2012 in the Nhumirin Farm (4313 hectares), a research farm of the Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária) Pantanal located in the Pantanal (subregion of Nhecolândia), Mato Grosso, Brazil (18°59'11"S 56°37'19"W). This region is characterized by a mixed vegetation with characteristics of semi-deciduous forest, savanna, cerrado and sparse shrubby vegetation. The soil is rich in sandy, and presents a large number of permanent or temporary ponds and seasonal flooded grasslands.

In the present study, the three more common midsize carnivores that inhabit the area were evaluated, including: ring-tailed/ring-tailed coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and ocelots (*Leopardus pardalis*) as well as small rodents of the genus *Tricomys*, who were found dead.

## 1.2. *Capture and sample collection*

All animal capture and sampling protocols carried out in the present study were revised and approved by SISBIO (System Authorization and Information on Biodiversity Protocol# 27103-1) and by the CEUA (Ethics Committee of the animals Protocol# L35/13).

The wild mammals were captured through the use of traps made of galvanized iron 40x50x100 cm (Zootech®) with a lure inside (bacon) to attract the animal. The disarmament system of the cage were triggered by the animal movement in the moment it entered the cage to eat the bait. The floor of the trap was covered with sand to avoid limb injuries, and the upper portion and lateral walls were covered with acuri leaves (*Attalea phalerata*) to camouflage the trap, and to reduce the risk of hyperthermia and stress. The traps were armed for 24 hours and were checked twice a day.

During anesthesia, in order to promote safety to the animals and to the researchers team, a system was developed and called "movable type system" (Rock, 2006). A

combination of tiletamine/zolazepam was used. The body weight was estimated and dose of 8mg/kg was administered intramuscularly. After anesthetized, body weight of each animal was measured. Vital parameters such as heart rate, respiratory rate and body temperature were evaluated and recorded. Recovery from anesthesia was accompanied by staff. During the intervention, the animals had their eyes moistened with saline solution to prevent cornea dryness, also to reduce visual and audio stimuli, an eye mask and earplugs were placed on the animals.

After proper chemical restraint, blood was collected by venipuncture of the jugular vein (or other readily accessible vein). Blood was allowed to clot at room temperature and centrifuged at 1000g for 10 minutes. Sera samples were harvested and preserved at -20°C until further analyses. Faeces and tissue samples of the rodents were collected, stored and frozen for PCR analysis.

### 1.3. *Serology*

The samples were analyzed using an indirect hemagglutination assay (IHA) (Kit Toxotest HAI, Wiener lab full address), modified agglutination test (MAT) as described by Dubey & Desmonts (1987) and indirect fluorescent antibody test (IFAT) as described by Camargo (1964).

The upper cut-off point for all the species was set at 1:16 in the IHA. For IFAT, the cut-off value was set at 1:64, adapting the domestic cat conjugate for the wild cats and the domestic dog conjugate for the wild carnivores. The IFAT was not possible to be done with the ring-tailed coati due to the absence of the conjugate.

Due the similarity of the technique the samples that reacted with IHA and MAT were considered positive

#### 1.4. *Molecular diagnosis*

Brain, liver and muscle of 42 rodent (genus *Trichomys*), found dead in traps after predation, were tested for the presence of *T. gondii* using PCR (Protocol #SISBIO 23116-1).

For the blood samples collected from wild carnivores and felids and tissues of rodents the DNA was extracted by using Qiagen animal tissue extraction kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook), according to the manufacturer's recommendations.

The specific segment B1 gene of *T. gondii* was selected for amplification in PCR assay, using Invitrogen® primers, generating an amplified product of 194 bp. The primers were described by Burg et al., (1989), and they have been extensively used since then .

TX-1 (oligo 1 of Burg) and TX-2 (oligo 4 of Burg) was designated as the following nucleotides 694 to 714 and 887 to 868 of the gene B1, respectively (Burg et al., 1989): TX-1: 5' GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG 3' and TX-2: 5' TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC 3'.

The following concentrations were used for each reaction: 26 µL of water, 5 µL of buffer (1X of Invitrogen®), 1,5µL of MgCl<sub>2</sub> (1,5mM of Invitrogen®), 5µL of dNTP (200µM), 1µL of primer Tx-1 (10pmol/µL ), 1µL of primer Tx-2 (10pmol/µL ), 0,5µL of Taq-Polimerase (2,5U) and 10µL of the DNA sample.

The amplified products were visualized by agarose gel 2% in TEB (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) with 0,1 µl/ml of GelRed (Biotium Products®).

### 3. RESULTS

A total of 10 expeditions spread across 113 days of fieldwork were conducted. During this period the total of 24 ring-tailed ring-tailed coati (*Nasua nasua*), 23 crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and 2 ocelots (*Leopardus pardalis*) were captured.

To determine the prevalence of positive animals, for both molecular and serologic tests, the percentage of positive results compared to the population of the captured animal species were calculated.

For the ring-tailed coati, the occurrence of *T. gondii* infection was observed in 20.83% (5/24) with IHA, (3/24) with MAT and 41.66% (10/24) with PCR. Overall, 8.33% (2/24) were positive by serology and PCR, one by using IHA and one by using MAT.

For the crab-eating fox, the occurrence of *T. gondii* infection was observed in 43.47% (10/23) with IHA, 43.47% (11/23) with IFAT, 47.82% (11/23) with MAT and 30.43% (7/23) with PCR. In 2 out of this 7 animals positives by PCR (8.69%, 2/23), serological evidence was there. By using PCR, 4.34% (1/23) was positive with IHA and MAT. In total, 42,85% (3/7) of the positive animals by using PCR were not positives in any serological test. The overall results of wild carnivores with their geographic coordinates using different diagnostic techniques are shown in Table 1. In Figure 1, the detection of amplified DNA products for *T. gondii* in 2% agarose gel are shown.

Concordance between IHA and MAT test was strongest and can be considered good. However, also there are agreement between IHA/IFAT and MAT/IFAT, but those are weaker, can be considered accepted according with Rosner B, 2006.

The blood samples of the two ocelots captured were positive by using serological and PCR. Of all positive animals by PCR and negative by serological test, a primo infection is

suggested, and the serum conversion did not these happen in this individuals. In opposite situation, ie positive by serological test and negative by PCR, suggests that seroconversion occurred and the absence of circulating parasite forms

A specific conjugate for the wild animals in this study is not existent. Therefore, we consider as a result of the positive samples by IHA and MAT.

Of all 42 rodents in this study (*Trichomys*), 23.80% (10/42) were positive by PCR, including: 30% (3/10) positive using brain, lung and muscle samples, 40% (4/10) positive using brain sample, 10% (1/10) positive using lung samples and 10% (1/10) positive using brain and muscle samples and 10% (1/10) positive using lung and muscle samples.

The map of the farm Nhumirim with geographical coordinates of animals testing positive for *T. gondii* infection are shown in Figure 2.

Figure 1: PCR products gel

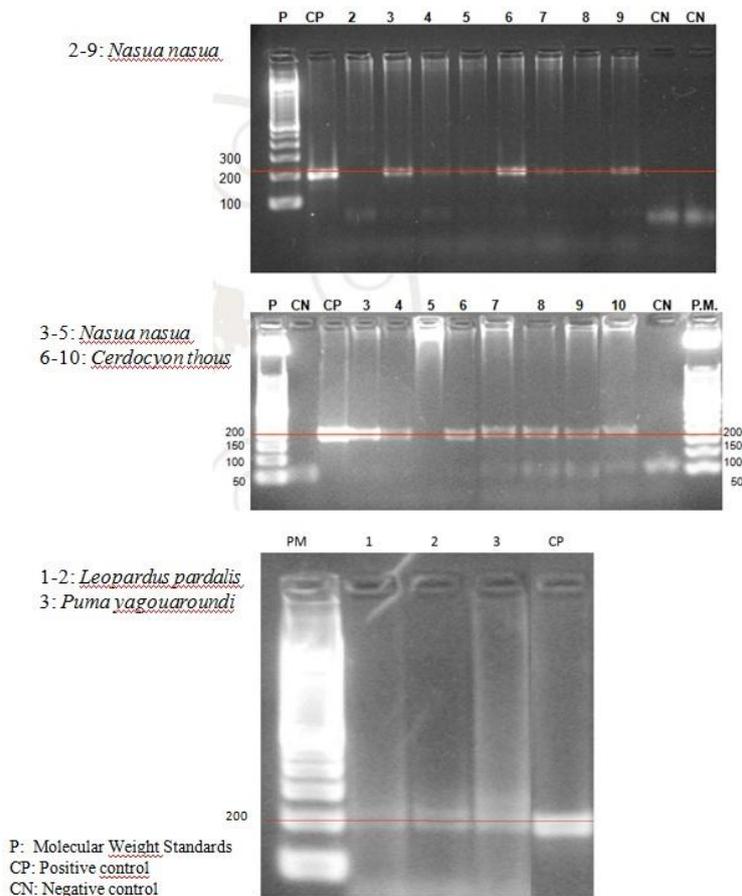


Table 1: Overall results of wild carnivores with their geographic coordinates using different diagnostic techniques (IHA, MAT, IFAT and PCR)

Animal ID	Geographic coordinates		Titers			
	Latitude	Longitude	IHA	MAT	IFAT	PCR
LP676	538962	7901992	<b>P (64)</b>	<b>P</b>	<b>P (64)</b>	<b>P</b>
LP737	538939	7902012	<b>P (64)</b>	<b>P</b>	<b>P (16)</b>	<b>P</b>
CT255	538998	7899067	<b>P (32)</b>	<b>P</b>	<b>P (64)</b>	<b>P</b>
CT409	539317	7899128	<b>P (16)</b>	<b>N</b>	<b>P (16)</b>	<b>P</b>
CT714	537544	7896917	<b>P (64)</b>	<b>P</b>	<b>P (16)</b>	<b>N</b>
CT751	539511	7901992	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
CT754	536093	7898535	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
CT758	537740	7900361	<b>P (32)</b>	<b>P</b>	<b>P (64)</b>	<b>P</b>
CT760	536883	7899086	<b>P (16)</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
CT761	537852	7899735	<b>P (16)</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
CT770	539256	7902521	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
CT771	540744	7902025	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P (64)</b>	<b>N</b>
CT773	540744	7902025	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>P (16)</b>	<b>N</b>
CT774	539256	7902521	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>P</b>
CT775	537679	7899206	<b>P (16)</b>	<b>P</b>	<b>P (64)</b>	<b>N</b>
CT776	537830	7899729	<b>P (32)</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
CT777	537544	7896917	<b>P (64)</b>	<b>P</b>	<b>P (64)</b>	<b>N</b>
CT778	540871	7900162	<b>P (16)</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>N</b>
CT93	539256	7902521	<b>P (64)</b>	<b>P</b>	<b>P (16)</b>	<b>N</b>
NN407	537997	7901180	<b>P (16)</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN756	536883	7899086	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN756	537507	7899219	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN757	539317	7899128	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN761	537852	7899735	<b>P (64)</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN762	537852	7899735	<b>P (64)</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>N</b>
NN763	539317	7899128	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN764	539317	7899128	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN765	539317	7899128	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN766	539317	7899128	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN767	538998	7899067	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>
NN781	539777	7900926	<b>P (64)</b>	<b>P</b>	<b>NP</b>	<b>N</b>
NN782	539777	7900926	<b>P (32)</b>	<b>P</b>	<b>NP</b>	<b>N</b>
NN768	540744	7902025	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>NP</b>	<b>P</b>

Caption: CT (*Cerdocyon thous*), NN (*Nasua nasua*) and LP (*Leopardus pardalis*). NP: not performed. IHA: indirect hemagglutination assay; MAT: modified agglutination test; IFAT: indirect fluorescent antibody test. P: Positive; N: Negative.

Figure 2: Geographic location where positive animals were captured at the Nhumirim farm.



Caption: CT (*Cercopithecus thous*), NN (*Nasua nasua*) and LP (*Leopardus pardalis*).

Table 3. Results about agreement IHA, MAT and IFAT using kappa test. K= kappa test result; p= index of significance.

	k	p	Observed Agreement	Expected Agreement
IHA/MAT	0,5165	0,0014	75,76%	49,86%
IHA/IFAT	0,3294	0,0704	68,42%	52,91%
MAT/IFAT	0,3294	0,0704	68,42%	52,91%

#### 4. DISCUSSION

To the best of our knowledge this study was the first to describe the exposure and presence of infection in the species (*Leopardus pardalis*, *Nasua nasua*, *Cerdocyon thous*) in captive animals. Exposure to *T. gondii* was observed in 29.16% of ring-tailed coati, 47.82% of crab-eating fox and 100% of ocelots. By PCR, positivity was observed in 41.66% of ring-tailed coati, 30.43% of crab-eating fox and 100% of ocelots.

Studies were conducted in the United States with wild carnivores of the species *Procyon lotor* of the same family (Procyonidae) of the ring-tailed coati (*Nasua Nasua*), with positive serology for *T. gondii* ranging from 49 % to 59.2% (Dubey et al., 2007; Mitchell et al., 1999), whereas Dubey et al. (2007) reporteded five animals positive for *T. gondii* by using PCR. It was observed reactive serum for *T. gondii* in 19.2% of captive crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) living in a zoo at São Paulo (19.2%); 36% (9/25) from Paraná, Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro and Distrito Federal (Mattos et al., 2008); 61% from Northeast, Southeast and Southern (Gennari et al., 2004).

Studies carried with red fox (*Vulpes vulpes*), reported that 68% of animals were seropositive for *T. gondii* in Hungary (Jakubek et al., 2007) and 35% in Austria (Wanha et al., 2005).

In studies with captive and free-ranging maned wolves, the occurrence of 74.6% was observed by IFAT (Vitaliano et al., 2004). However, Mello et al. (2002) found no animal with reactive serum by IFAT , in the total of 48 maned wolves and two crab-eating fox .

There is no evidence in the literature of serological reports about the occurrence of infection by *T. gondii* in free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and free-range ring-tailed coati (*Nasua nasua*).

Also, there is no evidence in the literature about molecular diagnosis of *T. gondii* in wild felid blood sample. Reports describing the molecular characterization using techniques such as bioassay are reported (Miller et al., 2008; Dubey et al., 2010, Cañon-Franco et al., 2013).

In the United Arab Emirates, a feline (*Felis margarita*) died due complications of congenital toxoplasmosis (Dubey et al., 2010). Thus, a better understanding of this infection in wild cats population, especially those that can be found immunosuppressed, is important when thinking about conservation of the species, especially for being such a susceptible species to this infection and important in the epidemiological chain .

In the present study, we used the technique of IHA and MAT. Studies using MAT (Dubey et al., 2007; Silva et al., 2006) and IHA (Ferradoni; Marzochi , 1980) have been reported. There are some studies with IFAT established in crab-eating fox. (Catenacci et al., 2010; Mattos et al., 2008).

To better consider the results of IFAT, it is important undertake the manufacture of conjugates for specific species, even if IFAT has been used by other authors with conjugate of domestic dog, for serological diagnosis of crab-eating fox (Catenacci et al., 2010; Mattos et al., 2008).

We observed that 23.80% (10/42) of rodents in this study were positive by PCR. Molecular studies for diagnosis of infection by *T. gondii* in rodents of genus *Trichomys* have not been reported. Serologic analysis was not realized because the animals were found dead and only tissue samples were collected. In Brazil, a serologic study reported the occurrence of 61.1% of seropositive rodents of genus *Proechimys* (Ferradoni; Marzochi , 1980) .

The consumption of food by these animals in the present study is associated to the high seropositivity, since one of the transmission routes of *T. gondii* is through contaminated

flesh tissue cysts (Martins, 2003). The difference of prevalence between the three carnivore species can be explained by dietary habits. Thus, we can see more positivity in cats because they are the top predators among the three species studied here, and the coatis demonstrated less positivity for being a carnivore with frugivorous habit too. Small rodents were positive for *T. gondii* by PCR technique. We suggest conclude that these animals are a source of infection for their predators, such as crab-eating fox and ocelot, studied in this research.

The minimum population density of these three species has been estimated in the region here studied, and it has been classified by the number of animals (@) per square kilometer (Km<sup>2</sup>). The minimum population density for ocelots were of 0.34 @/Km<sup>2</sup>, 0.68 @/Km<sup>2</sup> for ring-tailed coati and 0.8 @/Km<sup>2</sup> for crab-eating fox (Rocha, 2006). These data support the idea of possible environmental contamination extension by oocysts containing sporozoites (infective form of *T. gondii*) that are eliminated by the feces of wild cats in the area. All these species overlaps the areas of use, which are also used by several other species, facilitating environmental contamination and infection in animals

It is important emphasize that this environmental contamination can damage not only wild animals, but also domestic animals and humans. Humans can be infected by domestic animals when handling contaminated meat and eating raw or undercooked meat or even by inadequate hygiene habits.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Laboratory for Toxoplasmosis and collaborating researchers from Embrapa Pantanal. Thanks also due to Nhumirim farm for the contributing to the realization of this work. This study was funded by Capes, CNPQ, EMBRAPA, and FIOCRUZ.

## REFERÊNCIAS

- Andrade MCR, Coelho JMCO, Amendoeira MRR, Vicente RT, Cardoso C, Ferreira PCB, et al. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Ciência Rural* 2007; 37: 1724-1727.
- Basso W, Edelhofer R, Zenker W, Mostl K, Kubber-Heiss A, Prosl H. Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. *Parasitology* 2005; 130: 293-299.
- Brown M, Lappin MR, Brown JL, Munkhtsog B, Swanson WF. Exploring the ecologic basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J Wildl Dis* 2005; 41(4): 691-700.
- Buddhirongawatr R, Tungsudjai S, Chaichoune K, Sangloun C, Tantawiwattananon N, Phonaknguen R, Sukthana Y. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37(suppl.3): 15-17.
- Camargo, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v.6, p.117-118, 1964.*
- Catenacci LS, Griese J, da Silva RC. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2010, 169: 190-192.
- de Camps S, Dubey JP, Saville WJ. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the midwestern United States. *J. Parasitology* 2008; 94(3): 648-653.
- Dubey JP, Pas A, Rajendran C et al. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Veterinary Parasitology* 2010; 172: 195-203.
- Dubey J.P. & Desmonts G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. Med. J.* 19:337-339
- Dubey JP, Quirk T, Pitt JA et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*procyon lotor*), cats (*felis domesticus*), striped skunk (*mephitis mephitis*), black bear (*ursus americanus*), and cougar (*puma concolor*) from Canada. *J. Parasitol* 2008; 94(1): 42-45.

- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exptl Med 1970; 132: 636-662.
- Dubey JP, Sundar N, Nolden CA, Samuel MD, Velmurugan GV, Bandini LA, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. J. Parasitology 2007; 93(6): 1524-1527.
- Ferradoni JJ, Marzochi MCA. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e humanos da Amazônia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1980; 75(1-2): 99-109.
- Frenkel JK, Ruiz A. Endemicity of toxoplasmosis in Costa Rica. American Journal of Epidemiology 1981; 113: 254-269.
- Friend M. Disease Emerging and Resurgence: the wildlife-human connection. Reston Virginia U.S.: Geological Survey, Circular 1285; 2005.
- Furtado MM, Filoni C. Diseases and their role for jaguar conservation. Cat News Especial—The Jaguar in Brazil 2008; 4: 35-40.
- Gennari SM, Canno´n-Franco WA, Yai LEO, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. Vet. Parasitol. 2004, 121: 337-340.
- Hill Jr RE, Zimmerman JJ, Wills RW, Patton S, Clark WR. Seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in free-ranging mammals in Iowa. J Wildl Dis 1998; 34(4): 811-815.
- Hove T, Mukaratirwa S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostriches and wild game species from Zimbabwe. Acta Tropica 2005; 94(1): 49-53.
- Hwang YT, Pitt JA, Quirk TW, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in mesocarnivores of the canadian prairies. J. Parasitol. 2007, 93(6): 1370-1373.
- Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Martenson JS, Swift PK, O'Brien SJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). Vet parasitol 2004; 120: 1-9.
- Jakubek, EB, Farkas R, Palfi P, et al. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red foxes (*Vulpes vulpes*). Veterinary Parasitology 2007, 144(1-2): 39-44.

- Lukesova D, Literak I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 1998; 74(1): 1-7.
- Mattos BC, Patrício LLF, Plugge NF, et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2008, 17(Supl.1): 267-272.
- Melo C.B, Leite RC, Leite FSC, et al. Serological surveillance on South American wild canids for *Neospora caninum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2002, 54(4): 444-447.
- Miller MA, Miller WA, Conrad PA, et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 2008, 38(11):1319-28.
- Mitchell MA, Hungerford LL, Nixon C, et al. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *Journal of Wildlife Diseases* 1999, 35(2), 1999, pp. 347–355
- Mucker EM, Dubey JP, Lovallo MJ, Humphreys JG. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Pennsylvania bobcat (*Lynx rufus rufus*). *J Wildl Dis* 2006; 42(1): 188-191.
- Pas A, Dubey JP. Seroprevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Gordon's Wildcat (*Felis silvestris gordonii*) in the Middle East. *J Parasitol* 2008; 94(5): 1169.
- Rocha FL. 2006. Áreas de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na Fazenda Nhumirim e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 106p.
- Rosner, B. (2006). *Fundamentals of Biostatistics*. 6th. ed., Duxbury Press, Boston.
- Ryser-Degiorgis MP, Jakubek EB, af Segerstad CH, Brojer C, Morner T, Jansson DS, et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Sweden. *J Wildl Dis* 2006; 42(1): 182-187.
- Silva JC, Ogassawara S, Marvulo MF, Ferreira-Neto JS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* antibodies in exotic wild felids from Brazilian zoos. *J Zoo Wild Med* 2001; 32(3): 349-351

- Shannon LF, Mateus-Pinilla NE, McAllister M, et al. prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in terrestrial wildlife in a natural area. *Journal of Wildlife Diseases* 2011, 47(2): 381-392.
- Silva AV, Bosco SMG, Langoni H, et al. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Veterinary Parasitology* 2006; 135: 81–83
- Spencer JA, Higginbotham MJ, Blagburn BL. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. *J Zoo Wildl Med* 2003; 34(3): 246-249.
- Vitaliano SN, Silva DAO, Mineo TWP, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2004, 122(4): 253-260.
- Wanha K, Edelhofer R, Glaber-Eduardo C, et al. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Veterinary Parasitology* 2005, 128(3-4): 189-193.

## 5.2. ARTIGO 2

Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in feral pigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal Nhecolândia region, in Brazil.

Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa<sup>\*,1,2</sup>, Ubiratan Piovesan<sup>3</sup>, Leandro Batista das Neves<sup>1</sup>, José Leonardo Nicolau<sup>1</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, Maria Regina Reis Amendoeira<sup>1</sup>

1. Laboratório de Toxoplasmose. Instituto Oswaldo Cruz, IOC/FIOCRUZ. Rio de Janeiro – RJ, 21040-900.
2. Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Instituto de Pesquisa Clínica, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, 21040-900.
3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Pantanal. Corumbá – Mato Grosso do Sul, Brasil, 79331-090.

\*Corresponding author: Tel: +55 67 9933 1509; E-mail: magyda@gmail.com

**ABSTRACT**

The occurrence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs, known as feral pigs (*Sus scrofa*) in the Pantanal region was assessed by the frequency of IgG antibodies anti-*T. gondii* in 148 animals. Serum samples were examined by IFAT (Indirect Immunofluorescence Antibody Assay) and IHA (Reaction of Indirect Hemagglutination). A frequency of 1.3% (2/148) of positive sera, in addition to dilutions equal or greater than 1:64 by IFAT and frequency of 3.4% (5/148) by IHA. The low occurrence of infection found in these animals imply that they may provide a more effective immune response against infection by this protozoan, since there is *Toxoplasma gondii* infection in various species of animals in the region.

**Keywords:** Feral pigs, *Toxoplasma gondii*, serology, Pantanal

## INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a widespread disease all over the world, caused by the protozoa *Toxoplasma gondii*. It impacts a great array of vertebrates, including mammals and birds (Amendoeira et al., 1999; Millar et al., 2008). According to Dubey (1995), swine are infected by toxoplasmosis through oocyst-contaminated water and ration ingestion (present in feline feces), along with cysts present in infected meat or through diaplacental infection. Several authors have been performing seroepidemiological studies in swine in different regions of Brazil (Ishizuka 1978, Vidotto et al. 1990, Garcia et al. 1999, Tsutsui et al. 2003). According to Dias & Freire (2005), the high production and consumption of pork, the high dissemination and prevalence of *T. gondii*, associated to the fact that cysts may not be detected in slaughtering, makes this food, when ingested raw or improperly cooked, an important source of infection by *T. gondii* to human beings.

The feral pig (*Sus scrofa*) is one of the most successful invasive mammal species in the world (Desbiez et al., 2009). Many studies report the negative consequences, both on the ecological and socioeconomic standpoints, of swine invasions. Besides this, these animals are hosts of several etiological agents of infectious diseases (Herrera et al., 2005; Corner, 2006; Hampton et al., 2006; Ruiz-Fons et al., 2007). Known in the Brazilian swampland ecosystem called Pantanal as *porco monteiro* (feral pig), where it inhabits for more than two centuries, the species is established, and, therefore, is necessary to understand its ecology due to preservation and economic reasons. The ecological consequences of its invasion are still not fully understood. At first sight, they benefit from the status of preservation of the regional landscapes and are mostly important to the swampland culture, as there is an outspoken preference for haunting these feral pigs (Desbiez et al., 2011), and it is considered as an excellent source of fresh game and fat. The slaughtering and castration of these animals is a socially-valued activity and is already traditional in the lifestyle of Pantanal (Desbiez, 2007).

Given that the local population is used to eating feral pig pork, which may, in turn, be a route of infection, this research is targeted at tracing the occurrence of infection by *T. gondii* in these animals.

## MATERIALS AND METHODS

The blood samples were collected over the year of 2010 in *Fazenda Nhumirim* and neighboring farms, located in the Pantanal Region of the State of Mato Grosso do Sul, in a

region called Nhecolândia, in Brazil. Nhumirim farm (4,390.6 ha) is the experimental field of the division of Pantanal of Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), which undertakes research projects in the fields of cattle-raising, preservation of genetic resources and fauna, flora, soils and meteorology. The property is located 160 Km away from the city of Corumbá and has a preserved natural area since 1988, with 862 ha, declared as RPPN (National Wilderness Preservation System) by the government of the State of Mato Grosso do Sul in 1994.

The search for field animals was made with four-wheel drive vehicles or on horses. The animals to be captured were chosen randomly, disregarding the factors of gender, age and location in sampling without replacement. When a group of animals on sight, they were approached quietly, up to an approximated distance of 100 to 200m from the herd. As of this distance, the individuals were pursued, and in few minutes reduced they flee speed and could be roped or caught by field assistants. Occasionally (in the case of very large animals), the full physical immobilization was ensured with the use of hobbles, so as to keep the team safe until the anesthetics were administered. Immediately after the physical containment of animals, they received an anesthetic dose based on the visual estimate of their live weights. In addition to this, sales and earmuffs were used and individuals were taken to a shade, flat and dry locations, for biometry and collection of biological samples. All of the animals were taken and handled by employees of Embrapa Pantanal, trained for such practice and supervised by an researcher specialized in capturing wild animals (SISBIO License # 21416-1). In around 30% of the captures, especially when the pigs were searched on horses, a pack of two to five dogs trained (capable of pursuing swine without undergoing injuries or causing them) could be released to help capture animals. After the animal to be captured was stopped (cornered) by dogs, this was hopes or caught by the farm laborers.

For chemically containing the feral pigs, a mixture of freeze-dried content of the association of tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride (Zoletil® 50, Virbac) and xylazine hydrochloride (Sedomin® - König do Brasil) was prepared in the same bottle and used. The proportion of concentrations used was 1:1 (2.5mL of thinner with 2.5mL of Sedomin® in a bottle of Zoletil® 50), resulting in a solution of 5mL with 250mg of tiletamine-zolazepam (50mg/mL) and 250mg of xylazine (50mg/mL). The dose used was 2mg/kg of tiletamine-zolazepam and 2mg/kg of xylazine, as indicated by Gabor et al. (1997).

The collection of blood samples of 148 adult animals was performed through venipuncture (mammary vein), by a veterinarian physician of the staff. After blood clot refraction, the material was centrifuged at 1000G during 10 minutes. The sera were identified

and stored in propylene tubes, kept at a temperature of -20°C, until the performance of serological tests which were analyzed in the Laboratory of Toxoplasmosis of the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro. For the research of anti-toxoplasma antibodies, the IFAT technique was used, in accordance with Camargo (1964), using the anti-IgG serum for the species under study, and were also analyzed through the hemagglutination technique (Kit Toxotest HAI, Wiener lab). With regard to IFAT, the sera whose titles were equal or higher than 1/64 (Camardo, 1964) were considered.

## RESULTS

An occurrence of 1.3% (2/148) of IgG anti-*T. gondii* was traced by the IFAC technique, with titres equal or higher than 64. In turn, the frequency of 3.4% (5/148) was found in IHA, and with the titration of 64 and two samples with the titration of 128. The two positive samples were observed through the IFAT technique, and they were also positive by IHA in titration of 64.

## DISCUSSION

In this study, we observed a very small frequency of seropositive animals by infection with *T.gondii* compared to the one observed in other *Suidae* of wild swine, wild boars. Santos et al., (2012) observed the frequency of 17% of IgG antibodies for *T. gondii* by the IFAT technique and 13% for IHA, with a higher titration of 128 and 512, respectively, in a study with 30 wild boars slaughtered in a slaughterhouse in the State of Rio Grande do Sul. The occurrence of seropositive individuals between feral pigs was quite smaller (1.3%).

In other countries, a great variation was observed in the frequency of seropositive individuals for infection by *T.gondii* in wild pigs. In Austria, by means of the IFAT, a frequency of 19% (Edelhofer et al.,1996) was observed; 38.4% in the South Spain through the MAT (Modified Agglutination Technique), involving free and captive animals (Gauss et al., 2005); 26.2% in the Czech Republic and 8.1% in the Slovak Republic when the ELISA (enzyme immunoassay) was performed (Bártová et al., 2006; Antolová et al., 2007).

There are no studies describing the occurrence of infection by *T. gondii* in feral pigs. Information about the occurrence of these parasites in other wild swine is little and there is a lack of knowledge regarding the epidemiology of toxoplasmosis in these populations. The low frequency of protozooisis in these animals points to the assumption that they present a

rather effective cellular response against protozoosis. A possible explanation would be that feral pigs would have a high degree of resistance to toxoplasmic infection, since the infection by *T.gondii* in other species of domestic and wild animals was found in the Pantanal region studied (Juliano et al., 2011).

The ontogenesis of the immune system of different species may be studied in an attempt to define the processes involved in structural changes of this intricate functional system, which allows, among other things, the survival of individuals and the existence of populations subject to different types of challenges present in the environment. Some authors studied how the animal behavior with stressing factors could interfere with the immune response and vulnerability of individuals to certain disorders, based on the interaction between the styles of coping, neuroendocrine system and immune system (Edfors-Lilja et al., 1994; Helsing et al, 1995; Kolhass, 2008).

Helsing et al (1995), studying the behavior of coping in swine subject to stressing factors found that individuals defined as "active" and "resistant" presented different immune responses, with higher cellular immune response to specific and nonspecific antigens and smaller humoral response. This fact is explained by authors with an intricate interaction between cellular mechanisms and biochemical mediators. However, it may justify the suspicion that wild populations, such as feral pigs, subject to a long process of natural selection, present immune response patterns which are different from other populations of the same species.

## CONCLUSION

Different from what is observed in other populations of the same species, the occurrence of individuals seropositive for infection by *T.gondii* in feral pigs was rather low, pointing to the possibility that these animals are resistant to infection by this protozoa. The physiological and immunological factors responsible for these characteristics need to be the target of future studies, since this game is much consumed by the local population.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank CNPq, CAPES and Fiocruz for the financial support, to all employees of Fazenda Nhumirim engaged in field work, to co-researchers and the staff of the Laboratory of Toxoplasmosis of the Oswaldo Cruz Institute.

## REFERENCES

- Antolova, D.; Reiterova, K.; Dubinsky, P.; Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) in the Slovak Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14: 71-73, 2007.
- Amendoeira, M.R.R.; Costa, T.; Spalding, S.M. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques*, 1(1): 15-29, 1999.
- Bártova, E.; Sedlak, K.; Literak, I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 142: 150-153, 2006.
- Camargo, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, 6: 117-118, 1964.
- Corner, L.A.L. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112: 303-312, 2006.
- Desbiez, A. L. J. Wildlife conservation in the Pantanal: habitat alteration, invasive species and bushmeat hunting. Thesis ( Doctor of Philosophy in Biodiversity Management) - Durrell Institute of Conservation and Ecology (DICE), University of Kent, Canterbury. 288 f, 2007.
- Desbiez, A. L. J.; Keuroghlian, A.; Piovezan, U.; Desbiez, R. E. B. Population ecology of feral pigs in the Brazilian Pantanal. 2009.
- Dias, R.A.F.; Freire, R.L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. *Semina, Ciênc. Agrárias, Curitiba*, 26(2):239-247, 2005.
- Dubey J.P., Weigel R.M., Seigel A.M., Kitron U.D., Mannelli A., Mitchell M.A., Mateus-Pinilla N.E., Thulliez P., Shen S.K., Kwok O.C.H. & Todd K.S. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81(5):736-741, 1995.
- Edelhofer, R; Prosl, H; Kutzer, E. Trichinellosis and toxoplasmosis in wild boar from Eastern Austria [in German]. *Winer Tierarztliche Monatsschrift*, 83: 225-229, 1996.
- Edfors-Lilja, I.; Wattrang, E.; Magnusson, U.; Fossum, C. Genetic variation in parameters reflecting immune competence of swine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 40:1-16, 1994.
- Garcia, J.L.; Navarro, I.T.; Ogawa, L.; Oliveira, R.C. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, 29(1):91-97, 1999.
- Gauss, C. B. L.; Dubey, J. P.; Vidal, D.; Ruiz, F.; Vicente, J.; Marco, I.; Lavin, S.; Gortazar, C.; Almería, S. Soroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Veterinary Parasitology*, 131, p.151-156, 2005.

Hampton, J.; Spencer, P. B. S.; Elliot, A. D.; Thompson, R. C. A. Prevalence of zoonotic pathogens from feral pigs in major public drinking water catchments in Western Australia. *EcoHealth*, v. 3, p. 103-108, 2006.

Herrera, H. M.; Norek, A.; Freitas, T .P.T.; Rademaker, V.; Fernandez, O.; Jansen, A. M. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitological Research*, v. 96, p. 121-126, 2005.

Hessing, M.J.C.; Coenen, G.J.; Vaiman, M.; Renard, C. Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45, 97-113, 1995.

Ishizuka, M.M. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta, em suínos de matadouro do município de São Paulo. *Revta Fac. Med. Vet. Zootec.*, 15(2):151-154, 1978.

Juliano, R.; Fioravanti, M.C.S.; Sereno, J.R.B.; Abreu, U.G.P.; Jayme, V.S.; Silva, A.C.; Machado, R.Z.; Britto, W.M.E.D.; Alfieri, A.; Santos, S. Aspectos sanitários dos Núcleos de conservação *in situ* de bovinos pantaneiros. *Boletim de Pesquisa n 103, Embrapa Pantanal*, 16p, 2011.

Koolhaas, J.M. Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22: 662–667, 2008.

Millar, P.R.; Sobreiro, L.G.; Bonna, I.C.F.; Amendoeira, M.R.R. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. *Semina*, 29(3): 693-706, 2008.

Ruiz-Fons, F.; Vidal, D.; Hofle, U.; Vicente, J.; Gortazar, C. Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Veterinary Microbiology*, 120: 241-250, 2007.

Santos, L. M. J. F; Cademartóri, B. G.; Schreiner, A.; Dos Santos, L. S. S.; Farias, N. A. R.; Ruas, J. L. *Toxoplasma gondii*: Detecção de anticorpos em javalis (*Sus scrofa*) de abatedouro na região sul do Rio Grande do Sul – Brasil. *Anais do XIV ENPOS*. 2012.

Tsutsui, V.S.; Navarro, I.T.; Freire, R.L.; Freitas, J.C.; Prudencio, L.B.; Delbem, A.C.B.; Marana, E.R.M. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos no norte do Paraná. *Arch. Vet. Sci.*, 8(2):27-34, 2003.

Vidotto, O.; Navarro, I.T.; Giraldi, N.; Mitsuka, R.; Freire, R.L. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina, PR. *Semina*, Curitiba, 11(1):53-59, 1990.

### 5.3. ARTIGO 3

Ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em humanos, bovinos e cães da região de Nhecolândia, Pantanal Sul-Matogrossense, Brasil

Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa<sup>1,2,\*</sup>, José Leonardo Nicolau<sup>2</sup>, Leandro Batista das Neves<sup>2</sup>, Ana Luiza Quintella do Couto Aleixo<sup>1,2</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>3</sup>, Maria Regina Reis Amendoeira<sup>2</sup>

1. Laboratório de Toxoplasmose. Instituto Oswaldo Cruz, IOC/FIOCRUZ. Rio de Janeiro – RJ, 21040-900.
2. Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Instituto de Pesquisa Clínica, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, 21040-900.
3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Pantanal. Corumbá – Mato Grosso do Sul, Brasil, 79331-090.

\*Corresponding author: Tel: +55 67 9933 1509; E-mail: magyda@gmail.com

## RESUMO

A toxoplasmose, causada pelo *Toxoplasma gondii* é uma protozoose que acomete o homem e uma grande variedade de animais de sangue quente e aves. A infecção se dá através da ingestão de oocistos, que podem ser encontrados no solo, água e alimentos ou através da manipulação e ingestão de carne crua ou mal cozida, além da infecção congênita, apresentando importância em saúde pública. O trabalho teve por objetivo de conhecer a ocorrência da infecção toxoplásmica na região de Nhecolândia - Pantanal sul-matogrossense, em animais domésticos e humanos, utilizando métodos sorológicos (Hemaglutinação indireta para os bovinos e Reação de imunofluorescência indireta para os cães e humanos). Foram feitas coletas de amostras de sangue de 73 indivíduos da comunidade rural, de 25 cães e 442 bovinos da região da Nhecolândia. Observou-se que 47,95% (35/73) dos humanos eram sororreagentes. Destas, apenas um indivíduo sororreagente (2,9%) apresentou lesão ocular presumível da infecção pelo parasito. Nos animais, observou-se a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em 48% dos cães e em 30,55% dos bovinos. Assim, pudemos observar a ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* nas populações estudadas.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, comunidade rural, cães, bovinos

## ABSTRACT

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii* is a protozoan infection that affects humans and a wide variety of warm-blooded animals and birds. Infection occurs through ingestion of oocysts, which can be found in soil, food and water or through manipulation and ingestion of raw or undercooked meat, apart from congenital infection, with public health significance. The study aimed to understand the occurrence of *T. gondii* infection in the region of Nhecolândia - Pantanal Mato Grosso do Sul, in domestic animals and humans, using serological methods (indirect hemagglutination reaction for bovine and indirect immunofluorescence for dogs and humans). Collection of blood samples from 73 individuals from the rural community of 25 dogs and 442 cattle Nhecolândia region were made. It was found that 47.95% (35/73) were seropositive humans. Of these, only one seropositive individual (2.9%) had presumed ocular injury from infection by the parasite. In animals, it was observed to occur in 48% of dogs and 30.55% bovine. Thus, we observed the occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in populações studied.

Key-words: *Toxoplasma gondii*, rural community, dogs, cattle.

## INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose com ampla distribuição mundial. Em humanos, apresenta taxas de prevalência que variam em diversas regiões do mundo (Dubey e Beattie, 1988; Remington et al., 1995; Remington et al., 2001; Remington et al., 2005, Hill e Dubey 2013). Em diferentes países, a soroprevalência dessa parasitose tem-se mostrado entre 10% a 90% na população humana (James, 1996; Carruthers, 1999). No Brasil, a soroprevalência tem sido determinada entre 50% a 80% (Cantos, 2000, Sobral et al., 2005, Dubey et al., 2012), podendo variar de 15 a 85%, sendo estes valores influenciados por hábitos socioculturais e fatores geográficos e climáticos (Amendoeira; Costa et al., 1999, Albuquerque et al., 2009).

A toxoplasmose ocular pode ser originada a partir de uma infecção congênita ou adquirida sendo, geralmente subclínica em crianças e adultos. Os sintomas oculares variam de acordo com a idade do indivíduo, sendo a retinocoroidite (lesão ocular caracterizada por inflamação severa e necrose) sua principal consequência, podendo também ocorrer falhas na visão ou glaucoma (Bonfioli; Orefice, 2005, Aleixo et al., 2009).

Um estudo objetivando avaliar a prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e comunidade rural foi realizado em Mato Grosso, encontrando-se a soroprevalência de 71% e 97,41% respectivamente. Estes resultados demonstraram a elevada prevalência da infecção toxoplásmica na população estudada e o alto risco da carne como via de transmissão para o homem quando manipulada ou ingerida crua ou mal cozida (Santos, 2008).

Garcia et al. (1999) estudaram a soroprevalência da toxoplasmose em suínos, bovinos, ovinos e equinos oriundos de propriedades rurais da região norte do Paraná como também os fatores de risco associados à infecção e a correlação entre títulos de anticorpos obtidos interespecie e com humanos, felinos e caninos. Observaram elevada soroprevalência em bovinos (90,8%), suínos (54,3%) e ovinos (87,7%) atentando ao alto risco da carne como via de transmissão para a população humana.

O primeiro relato da infecção toxoplásmica na espécie canina foi relatado na Itália (Mello, 1910 apud Freire et al., 1992). Não há uma grande evidência de importância epidemiológica dos cães na transmissão desta parasitose. Mas os oocistos esporulados de *T. gondii* quando ingeridos pelos cães podem atravessar o trato intestinal desses animais caninos e serem excretados nas fezes nesse mesmo estágio infeccioso (Lindsay et al., 1997). A prevalência da infecção pode variar de acordo com o teste sorológico utilizado e a região estudada (Fialho et al., 2009)

## MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta das amostras de sangue dos residentes locais e dos bovinos foi realizada na fazenda Nhumirim (4.313 hectares), campo experimental da EMBRAPA Pantanal – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (18°59'11"S 56°37'19"W), localizado a 160 Km de Corumbá. A fazenda conta com uma área protegida desde 1988, com 862 ha, declarada como Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) pelo governo do estado do Mato Grosso do Sul em 1994.

Os funcionários residentes da fazenda Nhumirim, assim como as famílias das fazendas vizinhas foram convidadas a participar do projeto. Ao concordar, o participante lia (para aqueles que diziam ser analfabetos, alguém da equipe realizava a leitura) e assinava o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Em seguida, a coleta foi realizada por punção venosa, sob responsabilidade de uma auxiliar de enfermagem, da Secretária de Saúde do município de Corumbá-MS.

Foram coletadas amostras de sangue de 73 pessoas, incluindo pessoas residentes na Fazenda Nhumirim e fazendas circunvizinhas da região pantaneira. Após o resultado do exame, aquelas pessoas que apresentaram positividade, foram convidadas a realizar um exame oftalmológico, com o objetivo de investigar a ocorrência de lesão ocular, em consequência da infecção por *Toxoplasma gondii*. Assim, antes da instilação do colírio midriático todos os pacientes foram examinados na lâmpada de fenda para avaliação do segmento anterior, sendo contra-indicada a midríase nos casos suspeitos de ângulo estreito. A acuidade visual foi aferida antes da midríase por meio da tabela de Snellen de optotipos. Foram consideradas lesões compatíveis com toxoplasmose: Focos de retinocoroidite em atividade, caracterizados por lesões da coróide e da retina brancacentas com ou sem exsudação vítrea; Focos de retinocoroidite cicatrizados.

Dentre os animais, foram coletadas amostras de sangue biológicas de 442 bovinos criados na fazenda Nhumirim e de 25 cães da fazenda Nhumirim e fazendas circunvizinhas, sendo estes utilizados principalmente para auxílio na caça de porco-monteiro, animal bastante consumido pelos pantaneiros. Nos bovinos a punção do sangue foi através da veia jugular e dos cães através da veia cefálica. Após a refração do coágulo, a amostra foi centrifugada a 1000g durante 10 minutos. Os soros foram identificados e armazenados em tubos de polipropileno, mantidos a temperatura de -20°C, até a realização dos testes sorológicos.

Realizamos a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) nas amostras da população humana e nos cães e Hemaglutinação indireta (HAI) nos bovinos. Para os cães

considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência em toda a periferia do parasito, ainda que em pequena intensidade e cujos títulos iguais ou superiores a 1:64 utilizando conjugado anti-IgG referente à espécie em questão (Sigma Chemical, F7887). Para os humanos, foram consideradas positivas as amostras com título igual ou superior a 1:16. Foram utilizados conjugados anti-IgG (Sigma Chemical, F3512) e anti-IgM humana (Sigma Chemical, F9762).

Todas as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Toxoplasmose do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro.

Para a realização deste estudo com a participação da comunidade rural, obtivemos aprovação do Comitê de ética em Pesquisa do IPEC, Fiocruz, CAAE 4865.0.000.009-10, de acordo com a resolução 196/96 do CNS-MS. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelas pessoas que concordaram em participar do projeto está sob a guarda do pesquisador responsável pelo projeto no Laboratório de Toxoplasmoses/IOC/Fiocruz. Para a realização deste estudo com animais, este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Etica no Uso de Animais (CEUA), sob número LW-35/13.

## RESULTADOS

Na população humana, observou-se que 47,95% (35/73) das pessoas eram soropositivas para anticorpos anti-*T. gondii*. Dos humanos soropositivos, apenas um indivíduo (2,9%) apresentou lesão ocular presumível de infecção pelo parasito (retinocoroidite), que já se encontrava cicatrizada.

Dentre os animais, observamos na população canina a ocorrência de 48% (12/25) de soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* e nos bovinos, a ocorrência de soropositivos foi de 30,55% (135/442).

## DISCUSSÃO

A região do Pantanal sul-mato-grossense, particularmente a região de Nhecolândia, é caracterizada por grandes propriedades de criação de gado com uma densidade populacional muito pequena, porém bastante significativa para uma região de difícil acesso. Além disso, a população era arredia e foi muito difícil que aceitassem participar do estudo, muitos evitando inclusive conversar com a equipe. As características da região podem explicar a baixa

ocorrência (47,95% - 35/73) de pessoas positivas ao exame sorológico, bem menor do que as encontradas por outros autores em populações de característica rural do estado do Mato Grosso (97,41%) (Santos, 2008), do Paraná (71% a 82,9%) (Garcia et al., 1995; Garcia et al., 1998; Garcia et al., 1999). Silva Filho et al., (2012) observaram em assentamentos rurais no norte do Paraná a ocorrência de 79,1% de pessoas positivas para a infecção toxoplásmica. O risco da infecção toxoplásmica é maior entre a população rural, devido aos seus hábitos e ao contato frequente com as fontes de infecção, por exemplo, os animais domésticos (Garcia et al., 1995; Rawlins e Prabhakar, 1989; Excler et al., 1988).

No Brasil, o *T. gondii* é o agente etiológico mais frequente nas uveítes de localização posterior na população humana no Brasil (Melamed e Alves, 1984; Aleixo et al., 2009). A toxoplasmose ocular pode ter origem congênita ou adquirida (Montoya e Remington, 1996). Alguns autores relataram ser a toxoplasmose ocular adquirida, bastante comum no Sul do Brasil (Glasner et al., 1992; Silveira et al., 1988). A ocorrência de lesão ocular em apenas um indivíduo soropositivo no presente estudo foi baixa quando comparada a ocorrência de 5,8% encontrada em humanos soropositivos em um bairro rural de Barra Mansa, RJ (Aleixo et al., 2009) e ao trabalho de Garcia (1998) que observou em seu estudo no Paraná, que 75 (21,8%) dos pacientes da área rural apresentaram algum tipo de alteração ocular. Segundo Garcia (1998) 58 (77,3%) desses pacientes com alteração ocular foram soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*. O pequeno número amostral está relacionado à baixa densidade populacional da região da Nhecolândia, somado ao fato do difícil acesso à essa população residente na planície pantaneira.

Observamos a ocorrência de 48% (12/25) dos cães oriundos de áreas rurais sororeagentes à infecção toxoplásmica. Silva Filho et al., (2012) observaram em cães de assentamentos rurais no Paraná, a ocorrência de 82,2% de soro positivos. Souza et al., (2003) observaram a ocorrência de 34,3% de cães soro reagentes à infecção oriundos de áreas rurais e 19,7% de cães soro reagentes oriundos de áreas urbanas, demonstrando que a infecção por *T. gondii* é maior em áreas rurais, devido a uma maior exposição a fatores de riscos ambientais. Os cães de áreas rurais são mais expostos a fatores de risco à infecção, que semelhante aos cães do presente estudo, apresentavam dieta baseada principalmente no consumo de carnes cruas, além de percorrem grandes áreas ao serem usados no auxílio a caça de porco-monteiro, sendo mais expostos ao ambiente contaminado com oocistos, que são eliminados por felídeos silvestres, já que não havia gatos domésticos na região.

No artigo de revisão realizado por Fialho et al. (2009), podemos observar a prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em diversas regiões do Brasil, envolvendo a

espécie canina e bovina, assim como outras espécies de animais domésticos. Relatam a prevalência da infecção em cães variando de 3,1% a 84,1%.

Muitos trabalhos já foram realizados a fim de determinar a ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em bovinos em várias regiões do Brasil (Daguer et al., 2004; Ogawa et al., 2005; Albuquerque et al., 2005; Spagnol et al., 2009; Moura et al., 2010) e no mundo (Dubey e Jones, 2008; Tian Y-M et al., 2012, Wang et al., 2012), utilizando diferentes métodos sorológicos, sendo observado variação das taxas entre 1,3% a 60% de animais sororeagentes (Fialho et al., 2009), sendo esta espécie a mais consumida por seres humanos em todo o mundo (Fajardo et al., 2013).

Fajardo et al., (2013) observou a ocorrência de 2,68% de sororeagentes nos animais estudados na zona da mata em Minas Gerais, utilizando a Reação de imunofluorescência indireta. Moura et al. (2010) observou no Paraná a ocorrência de 30,8% de bovinos sororeagentes em um total de 350 animais. No estado do Mato Grosso foi relatada a ocorrência de 71% de animais sororeagentes (Santos, 2008)

Segundo Amendoeira et al. (1999), a toxoplasmose é assintomática em 90% dos casos nos bovinos, e pode se manifestar de muitas formas com sinais clínicos que podem ser facilmente confundidos com outras doenças infecciosas.

É importante e de fundamental interesse em pesquisas voltadas para a saúde pública, que se façam mais estudos em áreas rurais investigando a infecção toxoplásmica, pois a prevalência observada principalmente em animais de regiões rurais é um importante indicador tanto do risco de transmissão para humanos como da presença de oocistos do protozoário no ambiente.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda equipe da Fazenda Nhumirim e do Laboratório de Toxoplasmose pelo auxílio na realização deste trabalho e à Embrapa Pantanal, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

Albuquerque G. R., Munhoz A. D., Flausino W., Silva R. T, Almeida C. R. R., Medeiros S. M., Lopes C. W. G. 2005. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos

leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet.* 14:125-128

Albuquerque M. C., Aleixo A.L., Benchimol E.I., Leandro A.C., das Neves L.B. & Vicente R.T. 2009. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(3):451-455.

Aleixo, A. L. Q. C., Benchimol E. I., Neves E. I., Silva C. S. P., Coura L. C. & Amendoeira M. R. R. 2009. Frequência de lesões sugestivas de toxoplasmose ocular em uma população rural do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(2):165-169.

Amendoeira M. R. R. & Costa T., Spalding S. M. 1999. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques.* 1(1):15-29.

Bonfioli A. A. & Orefice F. 2005. Toxoplasmosis. *Semin Ophthalmol.* 20(3):129-141.

Cantos G. A. 2000. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* 46(4):335-341.

Carruthers V. B. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* used and arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology international.* 48:1-10.

Daguer H., Vicente R. T., Costa T., Virmond M. P., Hamann W., Amendoeira M. R. R. 2004. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. *Cienc Rural,* 34:1133-1137

Dubey J. P. & Beattie C. P. *Toxoplasmosis of animals and man.* Boca Raton: CRC Press Inc; 1988.

Dubey J. P. & Jones J. L. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol.* 38:1257-12

Excler J. L., Pretai E., Pozzelo B., Charpin B. & Garin J. P. 1988. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in Burundi. *Trop Med Parasit.* 39(2):139-141.

Fajardo H. V., D'ávila S., Bastos R. R., Cyrino C. D., Detoni M. L., Garcia J. L., Neves L. B., Nicolau J. L., Amendoeira M. R. R. 2013. Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. *Parasites & Vectors.* 6:191.

Fialho C. G., Teixeira M. C. & Araujo F. A. P. 2009. Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae.* 37(1):1-23.

Freire R. L., Navarro I. T., Vidotto O., Tudury E. A., Vianna C. C. 1992. Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL-PR. *Semina.* 13(1): 66-69.

Garcia J. G., Navarro I. T., Ogawa L. & Oliveira R. C. 1999. Soroprevalência do Toxoplasma gondii em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. *Ciência Rural.* 29(1):91-97.

Garcia J. L. 1998. Epidemiologia do Toxoplasma gondii na população animal e humana dentro do ecossistema da doença. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

Garcia J. L. & Navarro I.T. 1995. Levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em moradores da zona rural do município de Guaraci - Paraná - Brasil. *Semina.* 16:63-67.

Glasner P. D., Silveira C., Kruszon-Moran D., Martins M. C., Burnier Junior M., Silveira S., Camargo M. E., Nussenblatt R. B., Kaslow R. A. & Belfort Junior R. 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal Ophthalmology.* 114:136-144.

Hill D. E., Dubey J. P. 2013. Toxoplasma gondii prevalence in farm animals in the United States. *International Journal for Parasitology.* 43: 107-113.

James G. S. 1996. Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. *J Clin Microbiol.* 34(6):1572-1575.

Lindsay D. S., Dubey J. P., Butler J. M. & Blagburn B. L. 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology.* 73:27-33.

Melamed J. & Alves L. S. *Toxoplasmose e Deficiência Visual. Resumos do Congresso Brasileiro de Prevenção da Cegueira.* Campinas, 1984

Montoya J. G. & Remington J. S. 1996. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases.* 23: 277-282.

Moura AB, Osaki SC, Zulpo DL, Garcia JL, Teixeira EB: Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil. *Arch Vet Sci* 2010, 15:94-99.

Ogawa L., Freire R. L., Vidotto O., Gondim L. F. P., Navarro I. T. 2005. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 57:312-316

Rawlins S. C. & Prabhakar P. 1989. Toxoplasmosis in Young Jamaicans. *J Trop Ped* 35(5):234-236.

Remington J. S. & Klein J. O. 1995. *Infections diseases of the fetus and newborn infant.* 4<sup>a</sup> ed. W B Saunders Company. p.140-268.

Remington J. S., McLeod R., Thulliez P. & Desmonts G. 2001. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 5<sup>th</sup> edn. Philadelphia: WB Saunders. p.205-346.

Remington J. S., Thulliez P. & Montoya J. G. 2004. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 42:941-945.

Santos T. R. 2008. Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em bovinos, cães e humanos da região sudoeste do estado de Mato Grosso. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Silva Filho M. F., Tamekuni K., Toledo R. S., Dias R. C. F., Lopis-Moril F. M. R., Breganó R. M., Thomaz-Soccol V., Garcia J. L., Freire R. L., Vidotto O. & Navarro I. T. 2012. Infection by Toxoplasma gondii and Leishmania spp. in humans and dogs from rural settlements in Northern Paraná State, Brazil. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 33(supl2):3251-3264.

Silveira C., Belfort Junior M., Burnier Junior M. & Nussenblatt R. 1988. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. American Journal of Ophthalmology. 106:362-364.

Sobral C. A., Amendoeira M. R. R., Teva A. , Patel B. N., & Klein C. H. 2005. Seroprevalence of infection with Toxoplasma gondii in indigenous brazilian populations. Am. J. Trop. Med. Hyg., 72(1):37-41.

Souza S. L. P., Gennari S. M., Yai L. E. O., D'auria S. R. N. & Cardoso S. M. S. 2003. Guimarães Júnior JS, Dubey JP. Occurrence of Toxoplasma gondii antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brasil. Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária. 12(1):1-3.

Spagnol F. H., Paranhos E. B., Oliveira L. L. S., Medeiros S. M., Lopes C. W. G., Albuquerque G. R. 2009. Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet. 18:42-45.

Tian Y-M., Dai F-Y., Huang S-Y., Deng Z-H., Duan G., Zhou D-H., Yang J-F., Weng Y-B., Zhu X-Q., Zou F-C. 2012. First report of Toxoplasma gondii seroprevalence in peafowls in Yunnan Province. Southwestern China. Parasit Vectors. 5:205

Wang Q., Jiang W., Chen Y-J., Liu C-Y., Shi J-l., Li X-t. 2012. Prevalence of Toxoplasma gondii antibodies, circulating antigens and DNA in stray cats in Shanghai. China. Parasit Vectors. 5:190

#### 5.4. ARTIGO 4

Genotipagem do *Toxoplasma gondii* em amostras de clínicas de animais silvestres de vida livre da região da Nhecolândia, Pantanal, Brasil.

Magyda Arabia Araji Dahroug<sup>1,2\*</sup>, Inara Bastos<sup>3</sup>, Raquel Soares Juliano<sup>4</sup>, José Leonardo Nicolau<sup>2</sup>, Erotides Capistrano da Silva<sup>5</sup>, Guilherme de Miranda Mourão<sup>3</sup>, Vera Pereira Chioccola<sup>4</sup>, Maria Regina Reis Amendoeira<sup>2</sup>

1. Pós-graduação em Pesquisa clínica em Doenças infecciosas – IPEC
2. Laboratório de Toxoplasmose – IOC
3. Laboratório de Biologia molecular de parasitoses e fungos – Instituto Adolfo Lutz
4. Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – EMBRAPA Pantanal
5. Doctor Veterinary Medicine (DVM)

\*e-mail autor para correspondência: magyda@gmail.com

## RESUMO

Um dos princípios das técnicas moleculares, como por exemplo, o método da PCR-RFLP, é a detecção de ácidos nucleicos que auxilia no diagnóstico tendo a capacidade de diferenciar agentes parasitários taxonomicamente próximos, facilitando estudos das populações de parasitas. Contudo, esse trabalho objetivou realizar a caracterização molecular de amostras sanguíneas de carnívoros silvestres (*Leopardus pardalis*, *Nasua nasua* e *Cerdocyon thous*), teciduais de pequenos roedores (*Trichomys*) e de um gato mourisco (*Puma yagouaroundi*) e fezes de felinos silvestres, todos de vida livre, capturados *in situ* na região da Nhecolândia, Pantanal sul-matogrossense. Para isto, foram utilizados 12 marcadores genotípicos (SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2, CS3 e Apico). Dessa forma, observou-se a presença de um novo genótipo do parasito, nunca descrito antes, circulando na região de forma homogênea entre as espécies.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, wild animals, genotyping, PCR-RFLP, Brasil.

## INTRODUÇÃO

O impacto das espécies de vida silvestre na transmissão e epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* tem sido objeto de estudo na última década, com o foco de estabelecer a diversidade genética e a estrutura da população silvestre do parasito (Lindsay; Dubey, 2007).

Estudos envolvendo análises sorológicas, molecular e isolamento do *T. gondii* têm sido realizados em diferentes ordens de mamíferos brasileiros (Ferradoni e Marzochi, 1980; Andrade et al., 2007; Antoniassi et al., 2011; Araújo et al., 2010; Carme et al., 2002; Thoisy et al., 2003; Dubey et al., 2012; Epiphanyo et al., 2003; Fornazari ET al., 2011; Garcia et al., 2005; Gondim et al., 2010; Pena et al., 2011; Minervino et al., 2010; Pimentel et al., 2009; Silva ET al., 2006; Silva et al., 2009; Soares et al., 2011).

No Brasil, em um estudo realizado por Cañon-Franco et al (2013), foi descrito um felino (*P. yagouaroundi*) exibindo o alelo I em onze dos 12 marcadores analisados e alelo II no BTUB e nos outros felídeos estudados relatam a presença de genótipos recombinantes com a presença de alelos diferentes dos tipos clonais.

É possível que a reprodução assexuada nos hospedeiros intermediários seja responsável pela expansão clonal do *T. gondii* e suficiente para manter o ciclo do parasito sem a presença dos felídeos, permanecendo na cadeia alimentar pelo carnivorismo (Wendte et al., 2011). Vale ressaltar, que os animais escavadores e mamíferos terrestres e/ou arborícolas são mais expostos a *T. gondii*. O contrário pode ocorrer quando comparamos espécies que apresentam curto período de vida e portanto, apresentam menor chance de exposição ao agente (Carme et al., 2002; Thoisy et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular do *T. gondii* em amostras clínicas de três espécies de carnívoros de médio porte (*Leopardus pardalis*, *Cerdocyon thous*, *Nasua nasua*), como também de pequenos roedores capturados *in situ* na região de Nhecolândia, Pantanal. Este é o primeiro estudo envolvendo capturas a campo objetivando determinar a epidemiologia molecular da infecção por *T. gondii* no Brasil, nas espécies principais espécies de médios carnívoros: *Leopardus pardalis*, *Nasua nasua* e *Cerdocyon thous*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Local do estudo, captura e coleta de material biológico*

As amostras foram coletadas no período de março de 2011 a julho de 2012 na região de Nhecolândia, na Fazenda Nhumirim (4.313 hectares), campo experimental da Embrapa Pantanal, situado no Pantanal sul-matogrossense, Brasil (18°59'11"S 56°37'19"W). A região é caracterizada por uma mistura de vegetação com características de floresta semidecíduas, cerrado, cerradão e vegetação arbustiva esparsa. O solo é arenoso, além de apresentar um grande número de lagoas permanentes ou temporárias e campos sazonalmente inundáveis.

Foram avaliados nesse estudo os principais carnívoros de médio porte que habitam a região, pertencentes a diferentes famílias, tais como quatis (*Nasua nasua*), lobinhos ou cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e jaguatiricas (*Leopardus pardalis*). Para a realização deste trabalho, tivemos a aprovação junto ao SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), sob número 27103-1 e pelo CEUA (Comissão de ética no de animais), sob número L35/13. Amostras teciduais de cérebro, fígado e músculo de 42 roedores do gênero *Trichomys* encontrados mortos em armadilhas após predação, foram gentilmente cedidas para estudo da infecção por *T. gondii* (Licença SISBIO #23116-1). Foi coletado amostra cerebral de um gato mourisco (*Puma yagouaroundi*) encontrado morto na região, que foi congelada para posterior realização do PCR.

Foram coletadas amostras de sangue de duas jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), 23 lobinhos (*Cerdocyon thous*) e 24 quatis (*Nasua nasua*), como também amostras de fezes das duas jaguatiricas. Os mamíferos silvestres foram capturados através do uso de armadilhas feitas de ferro galvanizado de 40x50x100 cm (Zootech®) que continham iscas (toucinho) para atrair o animal. As armadilhas do tipo gaiolas possuem um sistema de desarme, que era acionado por um gatilho no momento em que o animal entrava na gaiola para comer a isca. O piso da armadilha foi coberto com areia para evitar lesões nas patas, e a porção superior e laterais cobertas com folhas de acuri (*Attalea phalerata*) para camuflar a armadilha, reduzir o risco de hipertermia e diminuir o estresse dos animais capturados. As armadilhas ficaram armadas por 24 horas e foram checadas duas vezes ao dia.

Na anestesia, a fim de promover segurança ao animal e à equipe, foi desenvolvido um “sistema de prensa móvel” (Rocha, 2006). Esse sistema permitia o aciuamento do animal para

o fundo da armadilha para a equipe então abrí-la e pressionar o animal também ao fundo para uma adequada imobilização física. O fármaco utilizado foi o tiletamina-zolazepam (Zoletil®-Virbac) administrado por via intramuscular. O peso foi estimado para cálculo da dose de anestésico, sendo mensurado após a anestesia do animal. A dose foi de 8 mg/Kg para todas as espécies. Os parâmetros fisiológicos, tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corpórea, foram avaliados e anotados em fichas individuais de controle anestésico. A recuperação anestésica foi acompanhada pela equipe.

Durante o manuseio dos animais, os olhos foram umedecidos com solução fisiológica para prevenir o ressecamento da córnea e foram colocados vendas e tampões de ouvido nos animais para reduzir estímulos visuais e sonoros. Em todos os animais silvestres capturados do estudo foram realizados procedimentos de identificação e marcação através da aplicação de *microchips*, exceto àqueles que já apresentarem identificação por este método.

Após a adequada contenção química, realizamos a coleta de sangue por venocentese jugular ou por outro vaso aparente, utilizando-se tubos a vácuo devidamente identificado. Após a retração do coágulo, a amostra foi centrifugada a 1000g durante 10 minutos. As amostras de sangue total e soros foram identificados e armazenados em tubos de polipropileno, mantidos a temperatura de -20°C, até a realização dos testes laboratoriais.

#### *PCR-RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição)*

Todas as amostras positivas pela PCR convencional foram triadas para a realização da genotipagem através da PCR-RFLP. Para este fim, foram escolhidos 11 marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (5'- SAG2 e 3'- SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt - SAG2 e Apico (Su et al., 2006; Su et al., 2010).

Inicialmente, foi realizada a PCRMultiplex, onde foram adicionados os oligonucleotídeos iniciadores externos dos marcadores SAG1, SAG2 (5'-SAG2 e 3'-SAG2), SAG3, GRA6, BTUB, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2 e Apico (Tabela 2). Cada reação foi realizada adicionando-se 0,25 ul do mix de Primer Forward (25 uM), 0,25 ul do mix de Primer Reverse ( 25 uM), 2,5 ul de tampão de PCR 10X sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 2 ul do mix de desoxinucleotídeos (2.5mM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 ul 50mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,2 ul de DNA *Taq* polimerase (5U/ul), 3 ul de DNA

de cepas de *T.gondii*, em um volume final de 25  $\mu$ l completado com água ultrapura. As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando por um ciclo de extensão por 3 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram diluídos adicionando-se 25  $\mu$ l de água ultrapura e armazenados a -20°C utilizados posteriormente no 2ºPCR.

Após essa etapa foi realizada a Nested-PCR. Para cada marcador realizou-se uma reação, onde foram adicionados oligonucleotídeos iniciadores externos, conforme descrito por Ferreira (2008). As concentrações de todos os componentes foram às mesmas descritas na reação de multilocus - PCR, com exceção das concentrações dos oligonucleotídeos, onde cada região do DNA foi amplificada separadamente com 0,5  $\mu$ l (50  $\mu$ M). As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando por um ciclo de extensão por 3 minutos a 72°C.

O polimorfismo de cada *locus* foi analisado por RFLP. Os fragmentos amplificados da Nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas para os diferentes marcadores na temperatura adequada para cada enzima e de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação cepas RH, ME - 49, VEG, GTI, PTG, CTG, COUGAR (TgCgCaI), MAS, TgCatBr5 foram utilizadas como controles positivos.

Consideramos como resultado, ou seja, amostras passíveis de realizar a caracterização molecular, aquelas que demonstraram positividade em oito ou mais marcadores genotípicos.

## RESULTADOS

Das amostras coletadas (2 jaguatiricas, 1 gato mourisco, 2 amostras de fezes de jaguatiricas, 23 lobinhos e 24 quatis), realizou-se a técnica de genotipagem em todas as amostras de felinos, em dez amostras de quatis e sete amostras de lobinhos, os quais foram positivos pela Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional. Dessa forma foi possível genotipar todas as amostras de felinos (100%), amostras de três quatis (30%) e de dois lobinhos (28,57%).

Das 42 amostras teciduais dos pequenos roedores, 40,47% (17/42) foram positivas no PCR convencional e triadas para a caracterização molecular. Entretanto, todas obtiveram resultado com menos de oito marcadores genotípicos, o que atualmente é considerado pouco para determinar com confiabilidade o genótipo de determinada amostra.

## DISCUSSÃO

As características das amostras do presente estudo são de amostras clínicas, coletadas a campo. Muitos pesquisadores com o objetivo de realizar genotipagem do *T. gondii* descrevem metodologias envolvendo isolamento por meio de bioensaio em camundongos (Dubey et al., 2012). No entanto, o isolamento não foi possível de ser realizado, pois os camundongos não suportariam a viagem até a Fazenda Nhumirim, que além de ser longa, teriam que enfrentar as altas temperaturas do Pantanal, além de fortes crepitações durante o percurso percorrido. Além disso, na fazenda não havia condições de manter um biotério, pois além da dificuldade de transportar animais de laboratório, não havia energia elétrica, exceto em curtos períodos de tempo com a ajuda de um gerador para manter as amostras biológicas armazenadas no *freezer*. Apesar dessas dificuldades, escolhemos essa região, pois era do nosso objetivo descrever a ocorrência da infecção por *T. gondii* em um ambiente predominantemente silvestre, com pouca ou quase nenhuma interferência humana.

Por se tratar de amostras clínicas, não foi possível obtermos resultados em todos os marcadores moleculares, provavelmente devido a pouca quantidade de material genético do parasito. Dubey et al. (2004) enfatizam a necessidade da realização do bioensaio em camundongo, devido a quantidade de DNA de *T. gondii* presente nos tecidos serem pequenas, o que pode explicar a baixa positividade obtida nas amostras teciduais e sanguíneas.

Observamos nas amostras analisadas, a existência de um novo genótipo recombinante ou atípico nestas espécies de carnívoros (*Leopardus pardalis*, *Nasua nasua*, *Cerdocyon thous*) nunca antes descrito, além de observamos que a infecção é homogênea entre as populações silvestres da região. No Brasil, um trabalho com o objetivo de realizar genotipagem em felídeos brasileiros de vida livre, mortos por atropelamento, foi realizado por Cañon-Franco et al. (2013). Amostras teciduais, tais como língua, cérebro, músculo esquelético, coração, diafragma, olhos, humor vítreo, musculatura ocular, foram armazenados em coleções

biológicas. Estes autores detectaram DNA do *T. gondii* em 34,4% (31/90) de pequenos felídeos (*Puma yagouaroundi*, *Leopardus geoffroyi*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *L. pardalis* e *L. colocolo*). Do total de 433 amostras primárias teciduais, 63 foram positivas pela PCR e destas, oito foram parcialmente caracterizadas e três tiveram o genótipo completamente resolvido com os doze marcadores moleculares utilizados, que correspondeu a dois novos genótipos.

A estrutura clonal das cepas de *T. gondii* pode ser explicada pela capacidade de transmissão do parasita entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro definitivo e sofrer meiose e recombinação genética (Su et al., 2003). Pode ocorrer também por macrogametas do parasita que permanecem infertilizados, porém são capazes de formar oocistos por partenogênese no intestino dos felídeos (Ferguson, 2002). Outra possibilidade é raridade da infecção simultânea no gato com diferentes cepas, sendo assim, a recombinação ocorreria se felídeos fossem infectados simultaneamente com diferentes amostras de *T. gondii*. Contudo é um evento raro de ocorrer na natureza, uma vez que teriam que se alimentar de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerissem duas presas, cada uma com uma amostra diferente. Este evento teria que ocorrer em um intervalo de tempo bem curto. No entanto, analisando o comportamento e hábitos alimentares dos felinos deste estudo, podemos relatar a possibilidade desses animais se infectarem com diferentes cepas em um curto período de tempo, durante a caça, o que poderia explicar a presença dos genótipos recombinantes nos animais estudados.

O fato de *T.gondii* ser haplóide contribui para a estrutura clonal, pois o hospedeiro definitivo infectado com apenas um tipo de cepa, produz oocistos contendo progênies geneticamente idênticas à amostra infectante original (Ajzenberg et al., 2004). Apesar de não encontrarmos genótipos clonais e sim recombinantes, observamos que os resultados observados em cada marcador molecular nas amostras de sangue e fezes foram iguais.

Pouco se conhece sobre a quantidade e período de eliminação de oocistos em felídeos silvestres. No entanto, em *Puma concolor*, a concentração foi estimada entre  $2,4 \times 10^5$  a  $12,5 \times 10^6$  oocistos/grama de fezes (Aramini et al., 1998). Na espécie silvestre, a eliminação de oocistos pode estar associada à ocorrência de diarreia observada em felídeos de cativeiro (Dorny e Fransen, 1989 ; Lukesová e Literák, 1998). Nos felinos deste estudo eram adultos e pudemos detectar o DNA do *Toxoplasma gondii* em suas fezes. Não há como afirmar se eram formas viáveis e infectantes, uma vez que só foi realizado o diagnóstico molecular. Um dos felinos apresentou fezes diarreicas no momento da coleta.

Com isso, enfatizamos a importância do isolamento, quando possível, para se obter melhores resultados na genotipagem. Observamos a presença de dois genótipos novos, contudo mais estudos devem ser realizados na população silvestres para aprimorar os conhecimentos da epidemiologia molecular da infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda equipe do Laboratório de Toxoplasmose (IOC/FIOCRUZ), da Embrapa Pantanal e do Laboratório Biologia molecular de parasitoses e fungos do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio, financiamento e suporte técnico.

#### REFERÊNCIAS

Andrade MCR, Coelho JMCO, Amendoeira MRR, Vicente RT, Cardoso C, Ferreira PCB. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Ciência Rural* 2007, 37: 1724-1727.

Antoniassi NAB, Boabaid FM, Souza RL, Nakazato L, Pimentel MFA, Filho JOX, Pescador CA, Driemeier D, Colodel EM. Granulomatous meningoencephalitis due to *Toxoplasma gondii* in a Black-headed night monkey (*Aotus nigriceps*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2011, 42(1):118-120.

Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island Cougars (*Felis concolor Vancouverensis*): Serology and oocysts shedding. *International Journal for Parasitology* 1998, 84(2):438-440.

Araujo JB, Silva AV, Rosa RC, Mattei RJ, Silva RC, Richini-Pereira VB, Langoni H. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2010, 174(3-4):328-331.

Ajzenberg, D, Banñuls AL, Su C, Dume`tre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 1185-96.

Cañon-Franco WA. 2013. Detecção Molecular de coccídios da Família Sarcocystidae em amostras teciduais de pequenos felídeos neotropicais do Rio Grande do Sul. Tese de

doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 131p.

Carme B, Aznar C, Motard A, Demar M, De Thoisy B. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guiana. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2002, 2(1):11-17.

Dorny P, Franssen J. Toxoplasmosis in Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). *Veterinary Record* 1989, 125(26-27): 647.

Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 2004-; 90: 721-6.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012, 139(11):1375-1424.

Epiphany S, Sinhorini IL, Catão-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. *Journal of Comparative Pathology* 2003, 129(2-3):196-204.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends of Parasitology.* 2002; 18: 355-9.

Ferradoni JJ, Marzochi MCA. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e humanos da Amazônia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1980; 75(1-2): 99-109.

Ferreira IMR. Genotipagem de cepas polimórficas de *Toxoplasma gondii* provenientes de pacientes com toxoplasmose. Tese. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 96p.

Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Leiva M, Almeida SC, Langoni H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian White-eared opossums (*Didelphis albiventris*). *Veterinary Parasitology* 2011, 179(1-3):238-241.

Garcia JL, Svoboda WK, Chryssafidis AL, Malanski LS, Shiozawa MM, Aguiar LM, Teixeira GM, Ludwig G, da Silva LR, Hilst C, Navarro IT. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Parará State Brazil. *Veterinary Parasitology* 2005, 133(4):307-311.

Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MAS, Santos SL, Mota RA, Vilela SMO, Gondim LFP. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2010, 168(1-2):121-124.

Lindsay DS, Dubey JP. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: WEISS L, Kami KA. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan, perspective and methods. London: Academic Press, 2007. p. 133-152.

Lukesová D, Literák I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 1998, 74(1):1-7.

Minervino AHH, Soares HS, Barrêto-Júnior RA, Neves KAL, Pena HFJ, Ortolani EL, Dubey JP, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. *Journal of Zoo and wildlife Medicine* 2010, 41(3):572-574.

Pena HFJ, Marvulo MFV, Horta MC, Silva MA, Silva JCR, Siqueira DB, Lima PACP, Vitaliano SN, Gennari SM. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarondi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brasil. *Veterinary Parasitology* 2011, 175(3-4):377-381.

Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos SA, Morais ZM, Silva JCR, Neto JE. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2009, 29(12):1009-1014.

Rocha FL. 2006. Áreas de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na Fazenda Nhumirim e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 106p.

Soares HS, Minervino AHH, Barrêto-Júnior RA, Neves KAL, Oliveira MF, Santos JR, Van Sauers AR, Dubey JP, Gennari SM. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in *Dasyprocta aguti* from Brazil: Comparison of diagnostic techniques. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2011, 42(4):763-765.

Thoisy B, Demar M, Aznar C, Carne B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. *Journal of wildlife diseases* 2003, 39(2):456-459.

Silva AV, Bosco SMG, Langoni H, et al. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasyus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Veterinary Parasitology* 2006; 135: 81–83

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka Jw Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* though enhanced oral transmission. *Science*. 2003, 299:414-6.

Su C, Zhang X., Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol*. 2006, 36:841-8.

Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*. 2010, 137:1-11.

Wendte JM, Gibsona AK, Grigg ME. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Veterinary Parsitology* 2011, 182(1):96-111.

Andrade MCR, Coelho JMCO, Amendoeira MRR, Vicente RT, Cardoso C, Ferreira PCB. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Ciência Rural* 2007, 37: 1724-1727.

Antoniassi NAB, Boabaid FM, Souza RL, Nakazato L, Pimentel MFA, Filho JOX, Pescador CA, Driemeier D, Colodel EM. Granulomatous meningoencephalitis due to *Toxoplasma gondii* in a Black-headed night monkey (*aotus nigriceps*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2011, 42(1):118-120.

Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island Cougars (*Felis concolor Vancouverensis*): Serology and oocysts shedding. *International Journal for Parasitology* 1998, 84(2):438-440.

Araujo JB, Silva AV, Rosa RC, Mattei RJ, Silva RC, Richini-Pereira VB, Langoni H. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2010, 174(3-4):328-331.

Ajzenberg, D, Banuls AL, Su C, Dume`tre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 1185-96.

Cañon-Franco WA. 2013. Detecção Molecular de coccídios da Família Sarcocystidae em amostras teciduais de pequenos felídeos neotropicais do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 131p.

Carme B, Aznar C, Motard A, Demar M, De Thoisy B. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guiana. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2002, 2(1):11-17.

Dorny P, Fransen J. Toxoplasmosis in Siberian Tiger (*Panthera tigris altaica*). *Veterinary Record* 1989, 125(26-27): 647.

Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J. Parasitol.* 2004-; 90: 721-6.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 2012, 139(11):1375-1424.

Epiphanyo S, Sinhorini IL, Catão-Dias JL. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. *Journal of Comparative Pathology* 2003, 129(2-3):196-204.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends of Parasitology.* 2002; 18: 355-9.

Ferradoni JJ, Marzochi MCA. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e humanos da Amazônia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1980; 75(1-2): 99-109.

Ferreira IMR. Genotipagem de cepas polimórficas de *Toxoplasma gondii* provenientes de pacientes com toxoplasmose. Tese. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 96p.

Fornazari F, Teixeira CR, Silva RC, Leiva M, Almeida SC, Langoni H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian White-eared opossums (*Didelphis albiventris*). Veterinary Parasitology 2011, 179(1-3):238-241.

Garcia JL, Svoboda WK, Chryssafidis AL, Malanski LS, Shiozawa MM, Aguiar LM, Teixeira GM, Ludwig G, da Silva LR, Hilst C, Navarro IT. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Parará State Brazil. Veterinary Parasitology 2005, 133(4):307-311.

Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MAS, Santos SL, Mota RA, Vilela SMO, Gondim LFP. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. Veterinary Parasitology 2010, 168(1-2):121-124.

Lindsay DS, Dubey JP. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: WEISS L, Kami KA. *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan, perspective and methods. London: Academic Press, 2007. p. 133-152.

Lukesová D, Literák I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. Veterinary Parasitology 1998, 74(1):1-7.

Minervino AHH, Soares HS, Barrêto-Júnior RA, Neves KAL, Pena HFJ, Ortolani EL, Dubey JP, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. Journal of Zoo and wildlife Medicine 2010, 41(3):572-574.

Pena HFJ, Marvulo MFV, Horta MC, Silva MA, Silva JCR, Siqueira DB, Lima PACP, Vitaliano SN, Gennari SM. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarondi (*Puma yagouaroundi*), and a

black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brasil. *Veterinary Parasitology* 2011, 175(3-4):377-381.

Pimentel JS, Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos SA, Morais ZM, Silva JCR, Neto JE. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2009, 29(12):1009-1014.

Rocha FL. 2006. Áreas de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na Fazenda Nhumirim e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 106p.

Soares HS, Minervino AHH, Barrêto-Júnior RA, Neves KAL, Oliveira MF, Santos JR, Van Sauers AR, Dubey JP, Gennari SM. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in *Dasyprocta aguti* from Brazil: Comparasion of diagnostic techniques. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2011, 42(4):763-765.

Thoisy B, Demar M, Aznar C, Carme B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. *Journal of wildlife diseases* 2003, 39(2):456-459.

Silva AV, Bosco SMG, Langoni H, et al. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasyopus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Veterinary Parasitology* 2006: 135: 81–83

Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka Jw Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* though enhanced oral transmission. *Science*. 2003, 299:414-6.

Su C, Zhang X., Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol.* 2006, 36:841-8.

Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 2010, 137:1-11.

Wendte JM, Gibsona AK, Grigg ME. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Veterinary Parsitology* 2011, 182(1):96-111.

## 6. CONCLUSÕES

Com este estudo, observou-se a importância de pesquisas voltadas em aprofundar conhecimentos referentes à epidemiologia de doenças infecciosas, como a toxoplasmose por exemplo. O conhecimento da infecção e o comportamento do parasito em vários hospedeiros susceptíveis é importante para compreender o cenário da infecção em diferentes regiões, em diferentes populações com costumes diferentes, como também em diferentes espécies animais, sejam estes domésticos ou silvestres.

Observamos a ocorrência da infecção por *Toxoplasma gondii* em 47,95% (35/73) das pessoas que concordaram em participar deste estudo, sendo que apenas um indivíduo sororeagente (2,9%) apresentou lesão ocular presumível de infecção pelo parasito. Estudos com comunidades rurais devem ser realizados em todo o país, lembrando que as características culturais são muito diferentes de acordo com a região. Vale ressaltar que nessas regiões é fundamental contar com apoio logístico para chegar até essas comunidades, uma vez que a região estudada não dispunha de energia elétrica, portanto tampouco de telefone e internet.

Com os bovinos, observamos a importância do estudo dos animais domésticos de produção. Conhecendo a prevalência desses animais no campo, independentemente da espécie, é possível presumir o risco de infecção em humanos que poderão manipular e consumir essa carne de forma inadequada. Observou-se a ocorrência de 30,55% (135/442) de bovinos positivos para a infecção toxoplásmica.

Do contrário que esperávamos, observamos baixa ocorrência da infecção nos porco-monteiros (1.3%). A princípio não foi possível obter uma justificativa mais sólida quanto a esse evento, já que se trata de um animal que susceptível a infecção toxoplásmica e totalmente exposto em um ambiente que é sabido ser contaminado. Concluimos que nestes animais pode ocorrer uma resposta imunológica mais eficaz quando comparamos a outros animais também susceptíveis.

O estudo envolvendo animais silvestres é bastante desafiador, principalmente nos trabalhos de campo que envolve as capturas dos animais. Ao trabalhar principalmente com as três principais espécies de médios carnívoros do Pantanal (*Leopardus pardalis*, *Nasua nasua*, *Cerdocyon thous*), foi possível obtermos resultados não descritos do Brasil. Através da sorologia detectamos a ocorrência da infecção toxoplásmica em 20,83% (5/24) pela HAI, (3/24) dos quatis, 43,47% (10/23) dos lobinhos e nas duas jaguatiricas capturadas. Através da PCR, observamos 41,66% (10/24) de positividade nos quatis, 30,43% (7/23) nos lobinhos e

nas duas jagatiricas. Destaco a importância de realizar a fabricação de conjugados específicos para as principais espécies silvestres, a fim de ampliar as opções diagnósticas, facilitando o estudo de diversas outras doenças.

A técnica PCR-RFLP nos possibilitou realizar a caracterização molecular das amostras clínicas do presente estudo onde observamos a ocorrência de um novo genótipo circulante na região, que é homogêneo entre as populações silvestres. Esses genótipos atípicos ou recombinantes são comumente observadas em populações humanas e animais no Brasil, sendo, portanto, uma característica do nosso país.

A epidemiologia molecular é uma ferramenta importantíssima para verificar se determinada linhagem do parasito ocorre em vários hospedeiros susceptíveis no mesmo intervalo de tempo e expostos ao mesmo ambiente. Portanto, observou-se que para aumentar as chances de sucesso na técnica é importante realizar o isolamento, através do bioensaio, com a finalidade de obter um material genético de melhor qualidade. No presente estudo, isso não foi possível devido às características rústicas da região, porém concluímos que nossos resultados poderiam ser melhores se a realização do isolamento fosse possível.

## 7. REFERÊNCIAS

- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter, CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med*. 2001, 3:1-19.
- Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessieres MH, Thulliez P, Fillisetti D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2002, 186:684-9.
- Albuquerque GR, Munhoz AD, Flausino W, Silva RT, Almeida CRR, Medeiros SM, Lopes CWG. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros do vale do Paraíba Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2005, 14:125-128
- Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI, Leandro AC, das Neves LB, Vicente RT.. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009, 104(3):451-455.
- Aleixo ALQC, Benchimol EI, Neves EI, Silva CSP, Coura LC, Amendoeira MRR. Frequência de lesões sugestivas de toxoplasmose ocular em uma população rural do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2009, 42(2):165-169.
- Al-Kappany YM, Rajendran C, Abu-Elwafa SA, Hilali M, Su C, Dubey JP. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates in Egyptian feral cats reveals new genotypes. *J Parasitol*. 2010, 96:1112-4.
- Amendoeira MRR, Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques* 1999. 1(1):15-29.
- Andrade MCR, Coelho JMCO, Amendoeira MRR, Vicente RT, Cardoso C, Ferreira PCB, et al. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. *Ciência Rural* 2007, 37: 1724-1727.
- Antolova D, Reiterova K, Dubinsky P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) in the Slovak Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2007, 14:71-73.
- Aramini JJ, Stephen C, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): Serology and oocyst shedding. *J. Parasitol* 1998, 84(2):438-440. *Arch Vet Sci*, 2010, 15:94-99.

- Avelino MM, Campos Junior D, Parada JB, Castro AM. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in woman of childbearing age. *Braz. J Infect Dis* 2004, 8(2):164-174.
- Bártova E, Sedlak K, Literak I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 2006, 142:150-153.
- Basso W, Edelhofer R, Zenker W, Mostl K, Kubber-Heiss A, Prosl H. Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. *Parasitology* 2005, 130: 293-299.
- Bonfioli AA, Orefice F. Toxoplasmosis. *Semin Ophthalmol.* 2005, 20(3):129-141.
- Brown M, Lappin MR, Brown JL, Munkhtsog B, Swanson WF. Exploring the ecologic basis for extreme susceptibility of Pallas' cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. *J Wildl Dis* 2005, 41(4): 691-700.
- Buddhirongawatr R, Tungsudjai S, Chaichoune K, Sangloun C, Tantawiwattananon N, Phonaknguen R, Sukthana Y. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006, 37(suppl.3):15-17.
- Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, 6: 117-118, 1964.
- Cantos GA. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* 2000, 46(4):335-341.
- Carruthers VB. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* used and arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology international* 1999, 48:1-10.
- Catenacci LS, Griese J, da Silva RC. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2010, 169: 190-192.
- Cavalier-Smith, T. Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. *Microbiology Review* 1993, 57: 953-94.
- Corner LAL. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology* 2006, 112:303-312.
- Costa AJ, Costa EP. Frequência de bovinos reagentes à Reação de Imunofluorescência Indireta para *Toxoplasma gondii* em Poços de Caldas, MG, Brasil. *Arq. Esc. Vet.* 1978, 30(1):47-51.

- Costa R. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1975, 24:439-443.
- Current WL, Upton SJ, Long PL. Taxonomy and life cycles. In: Coccidiosis of man and domestic animals. Ed. LONG, P. L., Boca Raton: CRC Press 1990, p. 2-16.
- Da Silva AV, Pezerico SB, de Lima VY, d'Arc Moretti L, Pinheiro JP, Tanaka EM. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. 2005, 127:23-7.
- Daguer H, Vicente RT, Costa T, Virmond MP, Hamann W, Amendoeira MRR. Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. Cienc Rural, 2004, 34:1133-1137
- Dardé ML, Bouteille B, Pestre-Alexandre M. Isoenzyme characterization of seven strains *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing polyacrylamide gels . J Parasitol. 1998, 39:551-8.
- Dardé ML. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità. 2004, 40:57-63
- de Camps S, Dubey JP, Saville WJ. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the midwestern United States. J. Parasitology 2008, 94(3):648-653.
- Desbiez ALJ, Keuroghlian A, Piovezan U, Desbiez REB. Population ecology of feral pigs in the Brazilian Pantanal. 2009.
- Desbiez ALJ. Wildlife conservation in the Pantanal: habitat alteration, invasive species and bushmeat hunting. 2007. 288 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Biodiversity Management) - Durrell Institute of Conservation and Ecology (DICE), University of Kent, Canterbury.
- Desbiez ALJ. Wildlife conservation in the Pantanal: habitat alteration, invasive species and bushmeat hunting. Thesis ( Doctor of Philosophy in Biodiversity Management) - Durrell Institute of Conservation and Ecology (DICE), University of Kent, Canterbury. 288 f, 2007.
- Dias RAF, Freire RL. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. Semina, Ciênc. Agrárias, 2005, 26(2):239-247.
- Dorny P, Fransen J. Toxoplasmosis in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) Veterinary Record 1989, 125:26-27.
- Dubey J.P. & Desmonts G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet. Med. J. 19:337-339
- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton: CRC Press Inc; 1988.

- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Press 1988, 41-60.
- Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. J Protozool. 1972, 1:155-77.
- Dubey JP, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LM, Vianna MC, Marcet PL, Lehmann T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range-chickens from Amazon, Brazil. J Parasitol. 2006, 92:36-40.
- Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AM, et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. Int J Parasitol. 2002, 32:99-105.
- Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol. 2008, 38:1257-12
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exptl Med 1970, 132:636-662.
- Dubey JP, Moura L, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OC, et al. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. Parasitology. 2009, 136:589-94.
- Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudêncio LB, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range-chickens from Paraná, Brazil. Vet Parasitology 2003, 117:229-34.
- Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. J. Parasitol. 2004, 90:721-6
- Dubey JP, Pas A, Rajendran C et al. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. Veterinary Parasitology 2010, 172: 195-203.
- Dubey JP, Quirk T, Pitt JA et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*procyon lotor*), cats (*felis domesticus*), striped skunk (*mephitis mephitis*), black bear (*ursus americanus*), and cougar (*puma concolor*) from Canada. J. Parasitol 2008, 94(1): 42-45.

- Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, Ferreira LR, Kwok OC, Qu D, et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *Parasitol.* 2010, 96:709-12
- Dubey JP, Sundar N, Nolden CA, Samuel MD, Velmurugan GV, Bandini LA, et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. *J. Parasitology* 2007, 93(6):1524-1527.
- Dubey JP, Weigel RM, Seigel AM, Kitron UD, Mannelli A, Mitchell MA, Mateus-Pinilla NE, Thulliez P, Shen SK, Kwok OCH, Todd KS. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 1995, 81(5):736-741.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1998; 7:1019-24.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. *J Eukaryot.* 2008, 55:46-475.
- Edelhofer R, Prosl H, Kutzer E. Trichinellosis and toxoplasmosis in wild boar from Eastern Austria [in German]. *Winer Tierarztliche Monatsschrift*, 1996, 83: 225-229.
- Edfors-Lilja I, Wattring E, Magnusson U, Fossum C. Genetic variation in parameters reflecting immune competence of swine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1994, 40:1-16.
- Excler JL, Pretai E, Pozzelo B, Charpin B, Garin JP.. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in Burundi. *Trop Med Parasit.* 1988, 39(2):139-141.
- Fajardo HV, D'ávila S, Bastos RR, Cyrino CD, Detoni ML, Garcia JL, Neves LB, Nicolau JL, Amendoeira MRR. Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. *Parasites & Vectors* 2013, 6:191.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? *Trends of Parasitology* 2002, 18:355-9.
- Ferradoni JJ, Marzochi MCA. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e humanos da Amazônia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1980. 75(1-2):99-109.

- Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR - RFLP. *Inf Gen Evolut.* 2006, 6:22-3.
- Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol.* 2008, 118:221-7.
- Fialho CG, Teixeira MC, Araujo FAP. Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2009, 37(1):1-23.
- Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FC. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol.* 2011, 175:33-9.
- Freire RL, Navarro IT, Vidotto O, Tudury EA, Vianna CC. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães atendidos no Hospital Veterinário da UEL-PR. *Semina.* 1992, 13(1): 66-69.
- Frenkel JK, Ruiz A. Endemicity of toxoplasmosis in Costa Rica. *American Journal of Epidemiology* 1981; 113:254-269.
- Friend M. *Disease Emerging and Resurgence: the wildlife-human connection.* Reston Virginia U.S.: Geological Survey, Circular 1285; 2005.
- Furtado MM, Filoni C. Diseases and their role for jaguar conservation. *Cat News Especial–The Jaguar in Brazil* 2008, 4: 35-40.
- Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín JE. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Tropica.* 2006, 97:161-167.
- Garcia JG, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. *Ciência Rural* 1999, 29(1):91-97
- Garcia JL, Navarro IT. Levantamento soropidemiológico da toxoplasmose em moradores da zona rural do município de Guaraci - Paraná - Brasil. *Semina,* 1995. 16:63-67.

Garcia JL. 1998. Epidemiologia do *Toxoplasma gondii* na população animal e humana dentro do ecossistema da doença. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Ruiz F, Vicente J, Marco I, Lavin S, Gortazar C, Almería S. Soroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Veterinary Parasitology*, 2005, 131:151-156.

Gennari SM, Canno´n-Franco WA, Yai LEO, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. *Vet. Parasitol.* 2004, 121: 337-340.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Junior M, Silveira S, Camargo ME, Nussenblatt RB, Kaslow RA, Belfort Junior R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal Ophthalmology*. 1992, 114:136-144.

Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 1999, 86:71-75.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*. 2001, 294:161-5.

Hall SM, Ryan M, Buxton D. Epidemiology. In: Joynton D.H.M., editor; Wreghitt T.G., editor. *Toxoplasmosis: A comprehensive clinical guide*. Cambridge University Press; Cambridge, UK: 2001. pp. 58–124.

Hampton J, Spencer PBS, Elliot AD, Thompson RCA. Prevalence of zoonotic pathogens from feral pigs in major public drinking water catchments in Western Australia. *EcoHealth* 2006, 3:103-108.

Herrera HM, Norek A, Freitas TPT, Rademaker V, Fernandez O, Jansen AM. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitological Research* 2005, 96:121-126.

Hessing MJC, Coenen GJ, Vaiman M, Renard C. Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 45:97-113.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect.* 2002, 8:634-40.

- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005, 6:41-61.
- Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. International Journal for Parasitology. 2013, 43:107-113.
- Hill Jr RE, Zimmerman JJ, Wills RW, Patton S, Clark WR. Seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in free-ranging mammals in Iowa. J Wildl Dis 1998, 34(4):811-815.
- Hove T, Mukaratirwa S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostriches and wild game species from Zimbabwe. Acta Tropica 2005, 94(1):49-53.
- Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microb. 1997, 35:1411-14.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995, 172:1561-6.
- Hwang YT, Pitt JA, Quirk TW, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in mesocarnivores of the canadian prairies. J. Parasitol. 2007, 93(6): 1370-1373.
- Ishizuka MM. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta, em suínos de matadouro do município de São Paulo. Rev Fac. Med. Vet. Zootec. 1978, 15(2):151-154.
- Jakubek, EB, Farkas R, Palfi P, et al. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red foxes (*Vulpes vulpes*). Veterinary Parasitology 2007, 144(1-2): 39-44.
- James GS. Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: effects of storage conditions on sensitivity. J Clin Microbiol 1996, 34(6):1572-1575.
- Juliano R, Fioravanti MCS, Sereno JRB, Abreu UGP, Jayme VS, Silva AC, Machado RZ, Britto WMED, Alfieri A, Santos S. Aspectos sanitários dos Núcleos de conservação *in situ* de bovinos pantaneiros. Boletim de Pesquisa n 103, Embrapa Pantanal, 2011, 16p.
- Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, et al. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. PNAS. 2007, 104:14872-77.

- Khan AS, Taylor C, Su AJ, Mackey J, Boyle RH, Cole, et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33: 2980-2992.
- Kikuchi Y, Chomel BB, Kasten RW, Martenson JS, Swift PK, O'Brien SJ. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Vet parasitol* 2004, 120:1-9.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes infect.* 2008, 10:978-84.
- Koolhaas JM. Coping style and immunity in animals: Making sense of individual variation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2008, 22:662–667.
- Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology*, 1997, 73:27-33.
- Luciano DM, Menezes, RC, Ferreira LC, Nicolau JL, das Neves LB, Luciano RM, Dahroug, MAA, Amendoeira MRR. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cattle and pigs slaughtered, State of Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2011, 20(4):350-353.
- Lukesova D, Literak I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 1998, 74(1):1-7.
- Lukesova D, Literak I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 1998, 74(1): 1-7.
- Mattos BC, Patrício LLF, Plugge NF, et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2008, 17(Supl.1): 267-272.
- McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N. Plastid in human parasites. *Nature.* 1996. 381:482.
- Melamed J, Alves LS. Toxoplasmose e Deficiência Visual. Resumos do Congresso Brasileiro de Prevenção da Cegueira. Campinas, 1984.
- Melo C.B, Leite RC, Leite FSC, et al. Serological surveillance on South American wild canids for *Neospora caninum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2002, 54(4): 444-447.
- Millar PR, Sobreiro LG, Bonna ICF, Amendoeira MRR. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. *Semina*, 2008, 29(3): 693-706.

Miller MA, Miller WA, Conrad PA, et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 2008, 38(11):1319-28.

Miller MA, Miller WA, Conrad PA, James ER, Melli CM, Leutenegger CM, Dabritz HA, Packhamb AE, Paradies D, Harris M, Ames J, Jessupa DA, Worcester K, Grigg ME. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology* 2008, 38(11):1319-1328.

Mitchell MA, Hungerford LL, Nixon C, et al. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *Journal of Wildlife Diseases* 1999, 35(2), 1999, pp. 347–355

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004, 363:1965-76.

Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clinical Infectious Diseases.* 1996, 23: 277-282.

Moura AB, Osaki SC, Zulpo DL, Garcia JL, Teixeira EB: Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil.

Mucker EM, Dubey JP, Lovallo MJ, Humphreys JG. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Pennsylvania bobcat (*Lynx rufus rufus*). *J Wildl Dis* 2006, 42(1):188-191.

Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci (Paris).* 1908, 147:763-6.

Norose KF, Aosai F, Mizota A, et al. Deterioration of visual function as examined by electroretinograms in *Toxoplasma gondii*-infected IFN-gamma-knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, 46(1):317-21.

Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2005, 57(3):312-316.

Owen MR, Trees AJ. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *J Parasitol.* 1999; 85:382-4.

Pas A, Dubey JP. Seroprevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Gordon's Wildcat (*Felis silvestris gordonii*) in the Middle East. *J Parasitol* 2008, 94(5):1169.

- Pena HF, Soares RM, Amaku M, Dubey JP, Gennari SM. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Rev Vet Sci* 2006, 81:58-67.
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil, *Int J Parasitol.* 2008, 38:561-9.
- Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009, 4:1363-79.
- Peyron F, Lobry JR., Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE., Petersen E, et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* 2006; 8:2333-40.
- Proença LM, Silva JC, Galera PD, Lion MB, Marinho-Filho JS, Ragozo AM, Gennari SM, Dubey JP, Vasconcellos SA, Souza GO, Pinheiro JW Jr, Santana VL, França GL, Rodrigues FH. Serologic survey of infectious diseases in populations of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Aguas Emendadas Ecological Station, Brazil. *J Zoo Wildl Med.* 2013, 44(1):152-5.
- Rawlins SC, Prabhakar P. Toxoplasmosis in Young Jamaicans. *J Trop Ped.* 1989, 35(5):234-236.
- Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 4<sup>a</sup> ed. W B Saunders Company. 1995, p.140-268.
- Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 6<sup>o</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2005, p947-1091.
- Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant,* 5<sup>th</sup> edn. Philadelphia: WB Saunders. 2001, p.205-346.
- Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004, 42:941-945.
- Rocha FL. 2006. Áreas de uso e seleção de habitats de três espécies de carnívoros de médio porte na Fazenda Nhumirim e arredores, Pantanal da Nhecolândia, MS. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 106p.

- Rosner, B. (2006). *Fundamentals of Biostatistics*. 6th. ed., Duxbury Press, Boston.
- Ruiz-Fons F, Vidal D, Hofle U, Vicente J, Gortazar C. Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. *Veterinary Microbiology* 2007, 120:241-250.
- Ryser-Degiorgis MP, Jakubek EB, af Segerstad CH, Brojer C, Morner T, Jansson DS, et al. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Sweden. *J Wildl Dis* 2006, 42(1): 182-187.
- Santos LMJF, Cademartóri BG, Schreiner A, Dos Santos LSS, Farias NAR, Ruas JL. *Toxoplasma gondii*: Detecção de anticorpos em javalis (*Sus scrofa*) de abatedouro na região sul do Rio Grande do Sul – Brasil. *Anais do XIV ENPOS*. 2012.
- Santos TR. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos, cães e humanos da região sudoeste do estado de Mato Grosso. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal; 2008.
- Shannon LF, Mateus-Pinilla NE, McAllister M, et al. prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in terrestrial wildlife in a natural area. *Journal of Wildlife Diseases* 2011, 47(2): 381-392.
- Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 1992, 359:82-5.
- Silva AV, Bosco SMG, Langoni H, et al. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Veterinary Parasitology* 2006, 135: 81–83
- Silva Filho MF, Tamekuni K, Toledo RS, Dias RCF, Lopis-Moril FMR, Breganó RM, Thomaz-Soccol V, Garcia JL, Freire RL, Vidotto O, Navarro IT. Infection by *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in humans and dogs from rural settlements in Northern Paraná State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. 2012, 33(supl2):3251-3264.
- Silva JC, Ogassawara S, Marvulo MF, Ferreira-Neto JS, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* antibodies in exotic wild felids from Brazilian zoos. *J Zoo Wild Med* 2001, 32(3):349-351.
- Silveira C, Belfort Junior M, Burnier Junior M, Nussenblatt R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *American Journal of Ophthalmology*. 1988, 106:362-364.

- Sobral CA, Amendoeira MRR, Teva A, Patel BN, Klein CH. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous brazilian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2005, 72(1):37–41.
- Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol.* 2010, 169:24-8.
- Souza SLP, Gennari SM, Yai LEO, D’auria SRN, Cardoso SMS, Guimarães Júnior JS, Dubey JP. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from dogs of the urban and rural areas from Brasil. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária.* 2003, 12(1):1-3.
- Spagnol FH, Paranhos EB, Oliveira LLS, Medeiros SM, Lopes CWG, Albuquerque GR. Prevalência de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em bovinos abatidos em matadouros do estado da Bahia, Brasil. *Rev Bras Parasitol.*, 2009, Vet. 18:42-45.
- Spencer JA, Higginbotham MJ, Blagburn BL. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. *J Zoo Wildl Med* 2003, 34(3):246-249.
- Sreekumar C, Graham DH, Dahl E, Lehmann T, Raman M, Bhalerao DP, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. *Vet Parasitol.* 2003, 118:187-94.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka Jw Sibley LD. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science.* 2003, 299:414-6.
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 2010, 137:1-11.
- Su C, Zhang X., Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol.* 2006, 36:841-8.
- Tian Y-M, Dai F-Y, Huang S-Y, Deng Z-H, Duan G, Zhou D-H, Yang J-F, Weng Y-B, Zhu X-Q, Zou F-C. First report of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in peafowls in Yunnan Province. Southwestern China. *Parasit Vectors.* 2012, 5:205
- Tibayrenc M. Populations genetics of parasitic protozoa and others microorganisms. *Adv Parasitol.* 1995, 36:47-115.

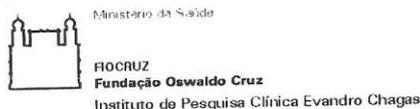
- Tsutsui VS, Navarro IT, Freire RL, Freitas JC, Prudencio LB, Delbem ACB, Marana ERM (2003) Seroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos no norte do Paraná. Arch. Vet. Sci. 8(2):27-34.
- Vallochi A, Muccioli C, Martins M, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo L. The genotype of strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. Am. J. Ophthalmol. 2005, 139:350-1.
- Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, et al. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. J Infect Dis. 2010, 202:1226-33.
- Vidotto O, Navarro IT, Giraldo N, Mitsuka R, Freire RL. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina, PR. Semina 1990, 11(1):53-59.
- Vitaliano SN, Silva DAO, Mineo TWP, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. Veterinary Parasitology 2004, 122(4): 253-260.
- Vitaliano SN, Soares HS, Pena HF, Dubey JP, Gennari SM. Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. J Zoo Wildl Med. 2014, 45(1):197-9.
- Wang Q, Jiang W, Chen Y-J, Liu C-Y, Shi J-l, Li X-t. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies, circulating antigens and DNA in stray cats in Shanghai, China. Parasit Vectors. 2012, 5:190
- Wanha K, Edelhofer R, Glaber-Eduardo C, et al. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. Veterinary Parasitology 2005, 128(3-4): 189-193.
- Whiteman CW, Matushima ER, Confalonieri UEC, Palha MDC, Silva ASL, Monteiro VC. Human and domestic animal populations as a potential threat to wild carnivore conservation in a fragmented landscape from the Eastern Brazilian Amazon. Biological Conservation 2007, 138:290-296.

Yai LE, Ragozo AM, Soares RM, Pena HF, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of from Brazil. *Vet Parasitol.* 2009, 162:332-7.

Zakimi S, Kyan H, Oshiro M, Sugimoto C, Xuenan X, Fujisaki K. Genetic characterization of GRA6 genes from *Toxoplasma gondii* from pigs in Okinawa, Japan. *J Vet Med Sci.* 2006, 68:1105-07.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Paracer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



#### Comitê de Ética em Pesquisa

### PARECER CONSUBSTANCIADO – 018/2011

CAAE 4865.0.000.009-10

#### 1. Identificação:

**Título do Projeto:** "Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e comunidades rurais da região de Nhumirim, Pantanal, Brasil".

**Pesquisador Responsável:** Maria Regina Reis Amendoeira (IOC).

**Doutoranda:** Magyda Arabia Arábia Araji Dahroug.

**Instituição Responsável:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

**Data de Apresentação ao CEP:** 21/09/2010.

#### 2. Sumário:

Visa a determinar a prevalência da toxoplasmose em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e população humana, em um mesmo intervalo de tempo, na região de Nhecolândia, Pantanal, utilizando métodos de diagnóstico sorológicos, moleculares e análise genotípica do polimorfismo para IFN gama. Tem como objetivos: 1) Descrever a prevalência da toxoplasmose, através de métodos parasitológicos e moleculares, caracterizando a genotipagem (Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3), do *T. gondii*, em felídeos silvestres e outros mamíferos silvestres de vida livre; 2) Descrever a prevalência de toxoplasmose, através do diagnóstico sorológico em bovinos, ovinos e suínos criados para o abate e consumo humano em propriedades, próximas ao contato com animais silvestres; 3) Descrever a prevalência de toxoplasmose nas populações das propriedades rurais, através do diagnóstico sorológico. Analisar a ocorrência de polimorfismos no gene que codifica o IFN- $\gamma$ , posição +874, entre os indivíduos com toxoplasmose ocular e indivíduos soro reagentes para *T. gondii* sem lesões oculares; 4) Correlacionar a prevalência entre animais silvestres, bovinos e humanos; 5) Caracterizar os fatores de risco associados com a infecção de animais domésticos de produção e humana através de um questionário. As amostras serão coletadas na região de Nhecolândia, na Fazenda Nhumirim, situado no Pantanal sul-matogrossense, Brasil. Serão avaliados nesse estudo os principais animais silvestres situados no bioma Pantanal pertencentes a diferentes famílias. Dentre os felídeos habitantes desse bioma estão as onças pintadas, onças pardas, jaguatiricas e outros felinos selvagens. Serão também capturados canídeos, suídeos (porco-monteiro), roedores entre outros mamíferos silvestres da região. Através de amostragem aleatória, serão coletados sangues dos animais: bovinos, ovinos e suínos, cuja criação seja destinada ao consumo humano e criados na região. O soro desses animais será submetido à RIFI com o objetivo de conhecer a soroprevalência da toxoplasmose na população estudada. Um questionário a fim de investigar dados acerca do manejo produtivo, sanitário e reprodutivo será aplicado ao responsável pelos animais. Será coletado sangue de moradores das propriedades rurais acima de 18 anos de idade, para realização do estudo de soroprevalência da toxoplasmose e análise do polimorfismo do gene que codifica o TNF gama. Simultaneamente será aplicado um questionário objetivando informações acerca de hábitos alimentares, tratamento de água e outros aspectos epidemiológicos. Todos os funcionários da EMBRAPA Pantanal serão convidados a participar do projeto.

"Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e comunidades rurais da região de Nhumirim, Pantanal, Brasil"

**3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).**

Projeto com delineamento adequado. Faz parte integrante deste estudo: 1) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Humanos); 2) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Exame Oftalmológico (Humanos); 3) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Animais de Produção); 4) Questionário Epidemiológico (Humanos); 5) Questionário Epidemiológico (Animais Domésticos); 6) Formulário - Exame Oftalmológico); 7) Termo de Compromisso e Responsabilidade do pesquisador onde o pesquisador responsável se compromete a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto em qualquer publicação resultante deste estudo. A origem da verba utilizada nesse estudo será do Laboratório de Toxoplasmose do IOC/Fiocruz.

**4. Diligências:**

Sim. Foram satisfeitas.

**5. Parecer: APROVADO.**

**Data: 06 de abril de 2011.**

**Assinatura do Coordenador:**

  
**Dr.ª Léa Camillo-Coura**  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
IPEC/FIOCRUZ

## Anexo 2. Paracer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

**LICENÇA****LW-35/13**

Certificamos que o protocolo (P-75/11-7), intitulado "Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e comunidades rurais da região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil.

", sob a responsabilidade de MARIA REGINA REIS AMENDOEIRA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 20/05/2016 e inclui o uso total de :

*Nasua nasua*  
- 27 Machos.  
- 20 Fêmeas.

*Akodon montensis*  
- 4 Machos.  
- 2 Fêmeas.

*Cercopithecus thomasi*  
- 20 Machos.  
- 15 Fêmeas.

*Leopardus pardalis*  
- 2 Fêmeas.

*Trichomys*  
- 20 Machos.  
- 16 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 20 de maio de 2013

  
Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA

OCTAVIO A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04626550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4030 - Pólo da Expansão - sala 250 - Marquês - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3862.9121 e-mail: ceua@fioz.u.br

## Anexo 3. Parecer SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade)



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 27103-1	<b>Data da Emissão:</b> 08/08/2011 11:52
<b>Dados do titular</b>	
<b>Nome:</b> MAGYDA ARABIA ARAJI DAHROUG	<b>CPF:</b> 701.852.471-72
<b>Título do Projeto:</b> Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos, ovinos, suínos e população humana na região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil	
<b>Nome da Instituição:</b> FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	<b>CNPJ:</b> 33.781.055/0001-35

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO DE ANIMAIS SILVESTRES DA REGIÃO DE NHECOLÂNDIA	04/2011	07/2012

De acordo com o art. 33 de IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

## Observações e ressalvas

1	As atividades de campo excetadas por pesca natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa de, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possuidor ou morador de área dentro dos limites de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa (SAMA nº 154/2007) ou na Instrução Normativa (ICMBio nº 10/2010), no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.icmbio.gov.br">www.icmbio.gov.br</a> (link: "Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES"). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio/menu/Exportacao">www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação</a> .
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições <i>in situ</i> .
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gigen">www.mma.gov.br/gigen</a> .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contatar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobrepescaçadas ou ameaçadas de sobrepescação.

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Ana Lúcia Quintella do Couto Akiko	Colaboradora nos exames clínicos	036.233.077-85	52673697 cremerj-RJ	Brasileira
2	Ubaitan Pivovarov	Colaborador no estudo com porcos montão	144.569.046-31	1032243 SSP-DF	Brasileira
3	Raquel Soares Juliano	Coordenadora e colaboradora no estudo com bovinos e ovinos	481.507.361-34	14910225 SSP-SP	Brasileira
4	Maria Regina Reis Amendoeira	Coordenadora do projeto	309.662.417-34	02722.395-1 IPR-RJ	Brasileira
5	João Leonardo Nicolau	COLABORADOR	066.704.537-03	-	Brasileira
6	Maira Cavalcanti de Albuquerque	Colaboradora na análise do polimorfismo genético	095.197.367-35	112424676 IPR-RJ	Brasileira
7	Paula Magesa Felix	Captura e coleta de material biológico	063.756.399-71	89613787 SSP-PR	Brasileira
8	Leandro Batista das Neves	Técnico laboratorial	099.025.877-05	0003246436 Detran-RJ	Brasileira
9	GUILHERME DE MIRANDA MOURÃO	Colaborador no estudo de animais silvestres	488.045.506-78	418663 SSP-MS	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 71982613



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27103-1		Data da Emissão: 09/08/2011 11:52		
<b>Dados do titular</b>				
Nome: MAQYDA ARABIA ARAJI DAHROUG		CPF: 701.852.471-72		
Título do Projeto: Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em bovinos, ovinos, suínos e população humana na região de Nhecolândia, Pantanal, Brasil				
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35		
<b>Locais onde as atividades de campo serão executadas</b>				
#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORUMBA	MS	FAZENDA NHUMPRM NHECOLÂNCIA	Faz de UC
<b>Atividades X Taxons</b>				
#	Atividade	Taxons		
1	Captura de animais silvestres in situ	Procyonidae, Mustelidae, Mephitidae, Felidae, Canidae		
2	Coleta/recoleta de amostras biológicas in situ	Procyonidae, Mustelidae, Rodentia, Felidae, Canidae, Mephitidae		
3	Marcação de animais silvestres in situ	Felidae, Mephitidae, Mustelidae, Procyonidae, Canidae		
<b>Material e métodos</b>				
#	Amostras biológicas (Carionívoros)	Equipamento, Utens, Biscoito, Pêlo, Fezes, Animal morto ou partes (carcaça/osso/pele)		
1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal morto ou partes (carcaça/osso/pele)		
2	Método de captura/coleita (Carionívoros)	Armadilha tipo gaiola com estrição por lâmina ("box trap"/Tomahawk/Sherman)		
3	Método de marcação (Carionívoros)	Microchip, Foto-identificação, Brincos		
<b>Destino do material biológico coletado</b>				
#	Nome local destino	Tipo Destino		
1	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	INSTITUIÇÃO DE PESQUISA		

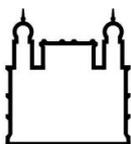
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 71982613



Página 2/3

## Anexo 4. Termos de consentimento Livre e esclarecido



**FIOCRUZ      LABORATÓRIO DE TOXOPLASMOSES – IOC**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO N.º \_\_\_\_\_**

**Projeto:** Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e comunidades rurais da região do Pantanal, Brasil

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) de RG \_\_\_\_\_, fui informado(a) que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre a toxoplasmose. Dessa forma, consenti a coleta do meu sangue para testes sorológicos e se necessário submeterei ao tratamento específico para toxoplasmose, como normalmente é usado nesses casos, assim como fornecer dados sobre alguns dos meus hábitos e costume. Os resultados deste estudo me beneficiarão diretamente, assim como, no futuro poderão beneficiar outras pessoas que venham adquirir a infecção por *Toxoplasma gondii*.

O procedimento será o seguinte: será coletado um volume de cinco a dez mL de sangue por punção da veia do antebraço, podendo em algum outro momento da pesquisa ser solicitada uma nova coleta de material. Possíveis riscos e desconforto, se ocorrerem, relacionados à coleta de sangue, serão dor local e/ou hematoma, que desaparecerá em três a cinco dias. Esta coleta poderá ser realizada por um (a) médico (a), um (a) enfermeiro (a) ou técnico (a) habilitado (a) para este tipo de trabalho, da Fundação Oswaldo Cruz ou da Secretaria de Saúde da cidade.

Todos os cuidados de biossegurança serão tomados, como uso de seringas e agulhas estéreis e descartáveis, gaze descartável e álcool para assepsia local.

Os resultados deste estudo serão relatados à mim e considerados confidenciais, podendo os mesmos serem divulgados na forma de comunicação científica, entretanto, não será permitido a identificação, garantindo a minha privacidade.

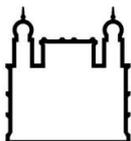
O material biológico coletado, após os exames, será estocado, podendo ser usado em outras pesquisas com fins semelhantes, mas somente após a avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa, que poderá dispensar a assinatura de um novo termo de consentimento livre e esclarecido, mantendo sempre o sigilo da minha identidade.

O (a) pesquisador (a) esclareceu todas as informações aqui citadas, estando a disposição para atender minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar os demais colaboradores envolvidos neste estudo.

A minha participação neste projeto é inteiramente voluntária, e sou livre para recusar a participação em qualquer fase da pesquisa.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pelo presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Testemunha: \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_  
 Pesquisador: \_\_\_\_\_ (Telefone para contato: Dra Maria Regina R. Amendoeira – (21) 25621844/1839)



FIOCRUZ

LABORATÓRIO DE TOXOPLASMOSES – IOC

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

N.º \_\_\_\_\_

**Projeto:** Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e comunidades rurais da região do Pantanal, Brasil

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado(a) que esse estudo é para obter mais conhecimentos sobre a toxoplasmose ocular, que é uma infecção ocular causada por um protozoário chamado *Toxoplasma gondii* e que pode levar a diminuição da visão em alguns casos. Estou ciente que os procedimentos listados a seguir serão realizados por médico oftalmologista, podendo contar com a ajuda de outros profissionais ligados à pesquisa. Procedimento para exame oftalmológico:

- 1) Medida da visão através de tabelas com letras de diferentes tamanhos; 2) Exame com luz, realizado num aparelho chamado lâmpada de fenda, para excluir pessoas que não possam pingar colírio para dilatar a pupila; 3) Instilação de colírio para dilatar a pupila (Mydriacyl), 1 gota em cada olho, três vezes com intervalo de 5 minutos; 4) Espera de 30 minutos para obtenção do efeito do colírio e 5) Exame de fundo de olho e sua fotografia através da luz de um aparelho chamado oftalmoscópio e retinógrafo.

Fui informado que o colírio para dilatar a pupila vai causar desconforto ao me expor à luz e vai dificultar minha visão para perto nas próximas 3 ou 4 horas. Ficando impossibilitado de dirigir veículos ou máquinas pesadas, de marcenaria ou de operação perigosa nas referidas 3 ou 4 horas de efeito do colírio.

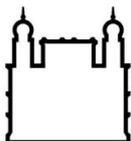
Serei informado quanto a qualquer alteração e ou doença encontrada no exame e serei encaminhado para que possa ser devidamente tratado. Todas as informações fornecidas por mim são consideradas confidenciais, sendo somente divulgadas sem identificação pessoal através de publicações científicas, garantindo minha total privacidade e sigilo médico. Caso seja necessário o tratamento da toxoplasmose será igual ao normalmente utilizado ambulatório de Oftalmologia do IPEC-FIOCRUZ.

O profissional que ora me apresenta este termo esclareceu minhas dúvidas e as informações aqui citadas, além de me informar que posso recorrer a qualquer membro da equipe de pesquisa para quaisquer outras dúvidas que surgirem em qualquer momento. Declaro ter entendido perfeitamente as informações contidas neste documento e que minha participação neste projeto é inteiramente voluntária, estando livre para recusá-la ou retirar-me em qualquer fase da pesquisa, sem que isso possa afetar ou prejudicar o cuidado médico a que devo receber. Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pelo presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima citados sejam em mim realizados.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Testemunha \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_ (Telefone para contato: Dra Maria Regina R. Amendoeira, Me Ana Luisa Quintella do Couto Aleixo, Me Magyda Arabia Araji Dahroug, – (21) 2562 1844/1839).



FIOCRUZ

LABORATÓRIO DE TOXOPLASMOSES – IOC

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

N.º \_\_\_\_\_

**Projeto:** “Estudo clínico, laboratorial e epidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais silvestres, bovinos, ovinos, suínos e comunidades rurais da região do Pantanal, Brasil”

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do RG \_\_\_\_\_, fui informado(a) que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre a toxoplasmose ocular, que é uma infecção ocular causada por um protozoário chamado *Toxoplasma gondii* e que pode levar a diminuição da visão em alguns casos. Estou ciente que os procedimentos listados a seguir serão realizados por médicos oftalmologistas com a ajuda de outros profissionais ligados à pesquisa e tecnicamente habilitados para a sua perfeita realização. Procedimento para exame oftalmológico: 1) Medida da visão através de tabelas com letras de diferentes tamanhos; 2) Exame com luz, realizado num aparelho chamado lâmpada de fenda, para excluir pessoas que não possam pingar colírio para dilatar a pupila; 3) Instilação de colírio para dilatar a pupila (Mydriacyl), 1 gota em cada olho, três vezes com intervalo de 5 minutos; 4) Espera de 30 minutos para obtenção do efeito do colírio e 5) Exame de fundo de olho e sua fotografia através da luz de um aparelho chamado oftalmoscópio e retinógrafo.

Fui informado que o colírio para dilatar a pupila vai causar desconforto ao me expor à luz e vai dificultar minha visão para perto nas próximas 3 ou 4 horas. Ficando impossibilitado de dirigir veículos ou máquinas pesadas, de marcenaria ou de operação perigosa nas referidas 3 ou 4 horas de efeito do colírio.

Serei informado quanto a qualquer alteração e ou doença encontrada no exame e serei encaminhado para que possa ser devidamente tratado. Todas as informações fornecidas por mim são consideradas confidenciais, sendo somente divulgadas sem identificação pessoal através de publicações científicas, garantindo minha total privacidade e sigilo médico. Caso seja necessário o tratamento da toxoplasmose serei encaminhado para tratamento no Serviço de Oftalmologia de Mato grosso do Sul-MS.

O profissional que ora me apresenta este termo esclareceu minhas dúvidas e as informações aqui citadas, além de me informar que posso recorrer a qualquer membro da equipe de pesquisa para quaisquer outras dúvidas que surgirem em qualquer momento. Declaro ter entendido perfeitamente as informações contidas neste documento e que minha participação neste projeto é inteiramente voluntária, estando livre para recusá-la ou retirar-me em qualquer fase da pesquisa, sem que isso possa afetar ou prejudicar o cuidado médico a que devo receber. Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pelo presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima citados sejam em mim realizados.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Testemunha \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_ (Telefone para contato: Dra Maria Regina R. Amendoeira, Me Ana Luisa Quintella do Couto Aleixo, Me Magyda Arabia Araji Dahroug, – (21) 2562 1844/1839).