SÉRGIO NETTO VITALIANO

**Isolamento e caracterização biológica e genotípica de
Toxoplasma gondii em animais selvagens do Brasil**

São Paulo

2012

SÉRGIO NETTO VITALIANO

**Isolamento e caracterização biológica e genotípica de
Toxoplasma gondii em animais selvagens do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
24/7/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2626
FMVZ

Vitaliano, Sérgio Netto

Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em
animais selvagens do Brasil / Sérgio Netto Vitaliano. -- 2012.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. Bioensaio. 2. Genotipagem. 3. PCR/RFLP. 4. Marcadores genéticos.
5. Vida-selvagem. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: "Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil", protocolado sob o nº1588/2008, utilizando 100 (cem) espécies variadas de mamíferos e aves, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/02/09.

(We certify that the Research "Isolation and biological and genotypical characterization of *toxoplasma gondii* from Brazilian wild animals", protocol number 1588/2008, utilizing 100 (one hundred) mammals and birds, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/11/09).

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VITALIANO, Sérgio Netto

Título: Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Ao meu amigo e “irmão” Marcos Thalma
do Carmo Freitas Sampaio (*in memoriam*).

Que você tenha encontrado a paz que
tanto procurou.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Solange Maria Gennari pela oportunidade dada, por todos seus ensinamentos e, principalmente, pelo carinho com que fui tratado.

Ao Prof. Dr. Chunlei Su da Universidade do Tennessee pela oportunidade e pela hospitalidade durante minha estada em Knoxville.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira pela realização das análises estatísticas e por sempre estar disposto a ajudar prontamente.

Ao Prof. Dr. Rodrigues Martins Soares pela amizade, oportunidade de parceria e por seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain pela disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (VPS-FMVZ) para a realização de parte deste trabalho.

Aos professores Dr. Marcelo B. Labruna e Dr. Ricardo A. Dias pela amizade, companheirismo e valiosos ensinamentos não restritos ao campo profissional.

À Dr. Hilda Fátima de Jesus Pena pela sua amizade, seus ensinamentos no dia a dia do laboratório e por sua enorme paciência comigo.

Aos professores do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Aos professores Dr. Antônio Humberto H. Minervino (UFOPA), Dr. André Luiz Quagliatto Santos (FAMEV/UFU), Dra. Karin Werther (FCAV/UNESP), Dra. Maria Fernanda V. Marvulo (UFRPE), Dra. Tatiana M. A. Cruvinel (UNIRP) e aos médicos veterinários Daniel B. Siqueira (Zoológico Três Irmãos), Vilma C. Geraldi (DEPAVE) e as suas devidas instituições pela colaboração direta com este trabalho.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho Herbert S. Soares e Aline D. Cabral, sem a ajuda de vocês este trabalho não teria sido feito.

À amiga Julia Lima pelo auxílio na extração dos DNAs e organização das amostras, sem sua ajuda com certeza não teria dado tempo.

À Keats Shwab, aluno de doutorado e à Rachelle Allen e Brietta Lusby do Departamento de Microbiologia da Universidade do Tennessee pela hospitalidade e companheirismo.

A todos os amigos que eu fiz ao longo desses anos e que ajudaram o VPS ser um ótimo lugar para trabalhar.

A todos os funcionários do VPS pelo auxílio sempre que necessário e pela amizade todos os dias.

À minha namorada Thassila C. F. Cintra por seu amor, carinho e companheirismo. Ao seu lado tudo fica mais fácil.

À minha família pelo amor, carinho e por sempre me apoiar dando todo o suporte necessário para que eu possa alcançar meus objetivos.

Aos meus grandes amigos Tiago Mineo, Fabrício Naves e André Escobar por sempre estarem presentes na minha vida.

Aos meus grandes amigos Guilherme Godoy e Tatiana Malfatti por, entre tantas outras coisas, me receber em sua casa quando me mudei para São Paulo.

Ao meu amigo Paulo B. Estoned pela sua grande capacidade de me fazer ver as coisas de um modo diferente.

Ao filósofo Thomas Bronhell por seus sábios ensinamentos que tornam a vida mais leve.

Aos meus amigos e companheiros da banda TomaRock Cristiano Peixoto, Marlon Jaime, André Magnino, Alexandre Scanavez, Rafael Resende e Cláudio Melazzo por momentos inesquecíveis e sonhos realizados.

Ao meu bom e velho Rock n' Roll.

Ao meu clube do coração, São Paulo Futebol Clube, por me ajudar a manter o foco no doutorado não ganhando nenhum título neste período.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ/USP pela atenção e pela ajuda com as normas bibliográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro – Processo nº 2009/00175-0.

“A vida não se trata do quão forte você consegue
bater, mas sim do quanto você consegue apanhar e
continuar seguindo em frente”

Rocky Balboa

RESUMO

VITALIANO, S. N. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil.** [Isolation and biologic and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild animals from Brazil]. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Toxoplasma gondii é um protozoário formador de cistos capaz de infectar diversas espécies de aves e mamíferos domésticos e selvagens, incluindo o homem. Apesar de evidências sorológicas da infecção por *T. gondii* em animais selvagens, pouco se sabe sobre o papel da vida selvagem na cadeia epidemiológica e tampouco a susceptibilidade das variadas espécies a este parasito. O presente trabalho consistiu no isolamento e caracterização genotípica de *T. gondii* de tecidos de animais selvagens, de vida livre e de cativeiro, provenientes de diversas localidades do Brasil e na detecção sorológica de anticorpos contra o parasito nas amostras em que foi possível obter o soro. A sorologia foi realizada em 54 amostras de soros de aves e mamíferos de várias espécies por meio do Teste de Aglutinação Modificado (MAT). Deste total, 18 amostras (cinco de aves e 13 de mamíferos) foram positivas para anticorpos anti-*T. gondii*. Para o isolamento do parasito foi realizado o bioensaio em camundongos. Homogenados de coração e cérebro de cada um dos animais foram submetidos à digestão péptica e inoculados em grupos de cinco camundongos. Tecidos dos camundongos que vinham à óbito eram examinados para constatar a presença de formas de *T. gondii*. Seis semanas após inoculação, foi colhido sangue dos camundongos para a realização de testes sorológicos (MAT) para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e dois meses após a inoculação estes animais foram submetidos à eutanásia para a procura por cistos teciduais do parasito. Por meio desta prova biológica foi possível isolar *T. gondii* em 18 animais selvagens (16 de diversas espécies de mamíferos e duas de aves) provenientes de diferentes localidades. *T. gondii* foi isolado em uma coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*), um pica-pau-de-banda-branca (*Dryocopus lineatus*), um gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), um lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), uma mucura (*Didelphis marsupialis*), uma paca (*Cuniculus paca*), três queixadas (*Tayassu pecari*), uma raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), três tamanduás-mirim (*Tamandua tetradactyla*), três tatus-galinha (*Dasypus novemcinctus*) e dois tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*). Dezesesseis dos 18 isolados obtidos foram letais para 100% dos camundongos infectados. O isolado de um tatu-peba não causou mortalidade em camundongos e o isolado da coruja-buraqueira causou 50% de

mortalidade. A caracterização genotípica dos isolados foi realizada pela técnica de PCR/RFLP utilizando 12 marcadores genotípicos. As amostras primárias dos tecidos provenientes dos animais selvagens que foram positivas na PCR de triagem também foram submetidas à caracterização genotípica. Por meio da PCR/RFLP foi possível obter o genótipo completo de 22 amostras, 15 delas provenientes de isolados e sete de amostras primárias de tecidos. Dos 18 isolados obtidos através do bioensaio, em três (tatu-peba, coruja-buraqueira e mucura) não foi possível obter a caracterização completa de todos os 12 marcadores utilizados. Pela análise das 22 amostras caracterizadas foram observados 17 genótipos diferentes, sendo que 13 deles são inéditos. A mortalidade de camundongos infectados foi comparada com a ocorrência dos diferentes alelos no marcador CS3 nos 15 genótipos provenientes de isolados, dos quais, sete apresentaram o alelo tipo I, seis o alelo tipo II e os alelos u-1 e u-3 foram encontrados em um isolado cada. Todos os isolados apresentaram 100% de mortalidade para os camundongos infectados.

Palavras-chave: Bioensaio. Genotipagem. PCR/RFLP. Marcadores genéticos. Vida-selvagem.

ABSTRACT

VITALIANO, S. N. **Isolation and biologic and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild animals from Brazil** [Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil]. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan parasite that infects almost all warm-blooded animals, including humans. Although studies indicate that wild animals are frequently positive for antibodies anti-*T. gondii*, the role of wild life in the epidemiology of this parasite is not well understood nor the susceptibility of different wild species. The present study aimed to isolate *T. gondii* from free-living and captive wild birds and mammals from different locations from Brazil, to perform the genotypic characterization of *T. gondii* found in the analyzed tissue samples and to detect antibodies anti-*T. gondii* in samples which were possible to obtain the serum. Serology was performed in 54 serum samples from different species of wild birds and mammals by the Modified Agglutination Test (MAT). From this total, 18 samples (five from birds and 13 from mammals) were seropositive for antibodies anti-*T. gondii*. For the isolation of the parasite, mice bioassay was performed. Brain and heart homogenates were submitted to peptic digestion and were inoculated in groups of five mice per animal sampled. Tissues of mice that died were examined for the presence of *T. gondii*. Mice were bled six weeks post-inoculation, and their sera were tested for anti-*T. gondii* antibodies by MAT. Surviving mice were euthanized two months after the inoculation and their brains were examined for the presence of *T. gondii* tissue cysts. *T. gondii* was isolated in 18 wild animals (16 from different species of mammals and two from birds) from different locations. *T. gondii* was isolated from one burrowing owl (*Athene cunicularia*), one lineated woodpecker (*Dryocopus lienatus*), three collared anteater (*Tamandua tetradactyla*), one hoary fox (*Pseudalopex vetulus*), one maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), one oncilla (*Leopardus tigrinus*), one opossum (*Didelphis marsupialis*), one paca (*Cuniculus paca*), three nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*), two six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*) and three white-lipped peccary (*Tayassu pecari*). Sixteen of the 18 isolates were lethal to 100% of inoculated mice. The genotypic characterization was performed using 12 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) Primary tissue samples which were positive in a trial PCR were also submitted to genotypic characterization. It was possible, by PCR/RFLP, to obtain the complete genotype of 22 samples, 15 from isolates and seven from primary tissue samples. It was not possible to accomplish the complete genotypic

characterization in three isolates; one burrowing owl, one opossum and one six-banded armadillo. In this 22 samples characterized, a total of 17 different genotypes were found with 13 of them described for the first time. Mortality of infected mice was compared between the different alleles of the marker CS3 in the 15 genotypes originated from isolates, which seven were type I, six were type II and alleles u-1 and u-3 were found in one isolate each. All the isolates presented 100% of mortality in infected mice.

Keywords: Mice bioassay. Genotyping. PCR/RFLP. genetic markers. Wildlife.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	27
Figura 2 -	Mapa com as localidades de origem das amostras dos animais selvagens do estudo entre os anos de 2009 a 2011.....	53
Figura 3 -	Mapa com as localidades de origem dos isolados de <i>T. gondii</i> (número de isolados por localidade). A*: as amostras obtidas em Jaboticabal eram originárias de Araraquara, Jaborandi e Jaboticabal.....	57
Figura 4 -	Proporção de bioensaio em camundongos realizados entre mamíferos e aves.....	58
Figura 5 -	Proporção de animais de vida livre ou cativeiro entre os isolados obtidos.....	59
Figura 6 -	Proporção de genótipos de <i>T. gondii</i> obtidos completamente dentre o total analisado provenientes de isolados em camundongos e de amostras primárias.....	62
Figura 7 -	Mapa com as localidades de origem (número de genótipos) das amostras de <i>T. gondii</i> que tiveram o genótipo definido pelos 12 marcadores genéticos. *A: as amostras obtidas em Jaboticabal eram originárias de Araraquara, Jaborandi e Jaboticabal.....	63
Figura 8 -	Origem das amostras em que foi possível obter o genótipo completo.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Procedência das amostras obtidas com as devidas siglas e a quantidade de animais analisados por localidade.....	42
Quadro 2 -	Informações referentes aos marcadores genéticos e às endonucleases utilizadas na PCR/RFLP.....	49
Quadro 3 -	Amostras de referência de <i>Toxoplasma gondii</i> utilizadas como controle positivo da reação de PCR/RFLP.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Presença de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (MAT $\geq$ 25) em diferentes ordens de aves e mamíferos selvagens do Brasil....	55
Tabela 2 -	Procedência dos animais, nº de animais que tiveram as amostras analisadas pelo bioensaio em camundongos e número (%) de isolados obtidos.....	56
Tabela 3 -	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> em animais selvagens por meio de bioensaio em camundongos.....	60
Tabela 4 -	Genótipos multilocus dos isolados e das amostras primárias de animais selvagens do Brasil obtidos pela PCR/RFLP e a identidade com outros isolados do Brasil.....	65
Tabela 5 -	Taxa de mortalidade e sobrevida média dos camundongos infectados com os isolados de <i>T. gondii</i> dos animais selvagens, medidos pelo marcador CS3.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma(s)
μL	microlitro(s)
μM	micromolar
BSA	albumina sérica bovina
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	et al.
H_3BO_3	ácido bórico
HCl	ácido clorídrico
<i>Hha</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Hin</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KCl	cloreto de potássio
M	molar
MAT	teste de aglutinação modificado
<i>Mbo</i>	<i>Moraxella bovis</i>
MgCl_2	cloreto de magnésio
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NaH_2PO_4	fosfato de sódio monobásico anidro
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico anidro
NaN_3	azida sódica

<i>n</i> PCR	<i>nested</i> -PCR
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	Concentração de hidrogênio iônico
P.I.	pós-infecção
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
rpm	rotação por minuto
<i>Sau</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	hidroximetilaminometano
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4.2	ANIMAIS.....	41
4.3	EXAME SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i>	43
4.4	DIGESTÃO PÉPTICA DOS TECIDOS.....	44
4.5	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS.....	44
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA.....	45
4.6.1	Lise dos camundongos	45
4.6.2	Extração do DNA	45
4.7	PCR/RFLP 18s rRNA PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS.....	46
4.7.1	PCR e nested-PCR	46
4.7.2	Digestão enzimática	47
4.8	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	47
4.8.1	Marcadores genéticos	47
4.8.2	PCR e nested-PCR	48

4.8.3	RFLP	48
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS	53
5.1	SOROLOGIA DOS ANIMAIS SELVAGENS.....	54
5.2	ISOLAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM ANIMAIS SELVAGENS...	55
5.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Toxoplasma gondii</i> POR PCR/RFLP.....	62
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, com distribuição geográfica cosmopolita, capaz de infectar células nucleadas de uma ampla variedade de mamíferos e aves, inclusive o ser humano, caracterizando seu potencial zoonótico. Entretanto, o parasito produz infecção assintomática na maioria de seus hospedeiros, devido à rápida indução da resposta imune celular, o que resulta no controle da multiplicação dos taquizoítas e estabelecimento de uma infecção crônica (YAP; SHER, 1999).

O parasito foi descrito pela primeira vez em 1908 por Splendore em São Paulo, em coelhos de laboratório, e por Nicole e Manceaux, no mesmo ano, que o encontraram, na Tunísia, no cérebro de um roedor selvagem (*Ctenodactylus gundii*) de origem africana (NICOLE; MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). O nome deste roedor denominou a espécie do parasito (PFEFFERKORN, 1990) e o nome do gênero deriva das palavras gregas *taxon* (arco) e *plasma* (forma), devido à forma alongada e em lua crescente em que o parasito é mais comumente observado (NETO et al., 1995). Em 1909 Nicole e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma* no filo Apicomplexa (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Estima-se que até um terço da população humana tenha sido exposta a *T. gondii* (JACKSON; HUTCHINSON, 1989; ASHBURN, 1992; DUBEY, 1998). No Brasil, a prevalência da infecção por *T. gondii* em humanos é especialmente alta, alcançando até 100% em algumas áreas (DUBEY; BEATTIE, 1988; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; SOBRAL et al., 2005; DE MOURA et al., 2006). Por sua importância médica e veterinária, *T. gondii* tem sido o parasito mais estudado entre os coccídios. No entanto, vários aspectos de sua biologia, ciclo biológico e epidemiologia continuam sendo investigados, destacando-se os métodos moleculares para seu estudo (TENTER; HECKEROTH; WEISS; 2000).

Nos animais, o interesse na avaliação da ocorrência de toxoplasmose é maior em torno das espécies que coabitam com o homem ou que lhe servem de fonte de alimento, porque de uma maneira ou de outra, estes animais podem desempenhar o papel de reservatórios das infecções humanas (SOGORB et al., 1972). A patogenicidade da infecção por *T. gondii* nas diversas espécies varia muito (CANFIELD et al., 1990; CUNNINGHAM et al., 1992; DUBEY et al., 1985; DUBEY et al., 1995), sendo que nas espécies mais vulneráveis como os marsupiais australianos, mais especificamente, os cangurus (*Macropus fuliginosus*) e os coalas

(*Phascolarctus cinereus*), macacos do Novo Mundo e pinguins a doença aguda normalmente é fatal (INNES, 1997). As diferenças de susceptibilidade não estão limitadas apenas entre as diversas espécies, mesmo dentro de uma mesma classe as diferenças podem ser extremas (DUBEY et al., 1995; SEDLÁK et al., 2000; MARTINEZ-CARRASCO et al., 2005).

Embora pesquisas indiquem que os animais selvagens são frequentemente positivos nos testes sorológicos para *T. gondii* (DUBEY; BEATTIE, 1988; DRESSEN, 1990; VITALIANO et al., 2004; SOLORIO et al., 2010; MINERVINO et al., 2010; ANDRÉ et al., 2010; MOLINA-LOPEZ et al., 2011; FORNAZARI et al., 2011), o papel da vida selvagem na transmissão desse agente não é bem conhecido (HUMPHREYS et al., 1995), tampouco qual perfil genotípico de *T. gondii* predomina, de maneira geral, nos animais selvagens infectados nos mais variados ecossistemas.

A constante interferência do homem na natureza tem causado transformações e danos muitas vezes irreparáveis. A expansão de áreas ocupadas pela população humana acarreta em perda de hábitat de espécies selvagens e as obriga a ocupar áreas cada vez menores, levando a uma situação de desequilíbrio. Essa situação não só pode levar à diminuição populacional de várias espécies animais e vegetais podendo chegar à extinção, como também selecionar espécies que se adaptam melhor à presença do homem, espécies sinantrópicas. Estas podem servir como uma interseção entre a vida selvagem e a população humana.

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* através de métodos moleculares tem sido realizada em sua maioria com amostras de humanos, ovinos, caprinos, cães, gatos, aves e com uma menor frequência em animais selvagens (KHAN et al., 2006; PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; PENA et al., 2011; DA SILVA et al., 2011). Entretanto, esforços recentes para genotipar isolados de *T. gondii* provenientes de vida selvagem mostram que os chamados genótipos “exóticos” ou “atípicos” não são anomalias insignificantes na estrutura populacional deste parasito, e sim membros importantes do *pool* de genes que proporcionam uma melhor representação da vasta gama de hospedeiros utilizada por este parasito (WENDTE et al., 2011).

Na América do Norte e Eurásia, a maioria dos isolados de *T. gondii* provenientes de humanos e animais domésticos podem ser agrupados em linhagens clonais quando analisados através do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição (RFLP), por marcadores de microsatélite e por marcadores isoenzimáticos (DARDÉ et al., 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002a,b). Howe e Sibley (1995) mostraram que amostras de *T.*

gondii isoladas do homem e dos animais poderiam ser agrupadas em três linhagens clonais denominadas como tipos I, II e III. Nestas regiões do planeta a linhagem tipo I está relacionada a infecções humanas enquanto que os tipos II e III predominam nos animais (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997; LITERÁK et al., 1998; MONDRAGON et al., 1998; OWEN; TREES, 1999).

Estudos com espécies de lontras marinhas dos EUA (MILLER et al., 2004; CONRAD et al., 2005; SUNDAR et al., 2008) mostraram uma diversidade genética de *T. gondii* ligeiramente maior, inclusive com o aparecimento de novos genótipos. Um estudo recente sobre caracterização genética de *T. gondii* em vida selvagem da América do Norte revelou uma limitada diversidade genética do parasito e o predomínio de uma quarta, e recente, linhagem clonal de *T. gondii*, o tipo 12. Este predomínio foi seguido pelas altas frequências das linhagens tipo II e tipo III fazendo com que dos 169 isolados de animais selvagens existentes nos EUA, 84,6% pertençam a estas três principais linhagens clonais (DUBEY et al., 2011).

Porém, o mesmo comportamento não vem sendo observado na América do Sul com isolados de humanos, animais domésticos e, mesmo com os poucos estudos com animais selvagens. Rajendran et al. (2012), em um estudo utilizando 164 isolados de *T. gondii* provenientes de animais das Américas Central e do Sul, observaram uma alta diversidade genética dentro e entre as populações do parasito. Em Belo Horizonte, MG, Carneiro et al. (2011) isolaram, pela primeira vez no Brasil, *T. gondii* do sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita e identificaram 14 genótipos diferentes, sendo 12 novos genótipos e dois genótipos comumente encontrados no Brasil (BrII e BrIII). Em São Paulo, a investigação das características genéticas, através do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de DNA por Enzimas de Restrição (PCR/RFLP), de *T. gondii* em pacientes humanos revelou a presença de três genótipos distintos (FERREIRA et al., 2011) entre os 20 isolados caracterizados. Em ambos os estudos, não foi observada a presença dos genótipos arquétipos (tipos I, II e III) entre os isolados humanos obtidos.

Diversos estudos realizados neste continente, principalmente no Brasil utilizando galinhas “caipiras”, mostram que os isolados de *T. gondii* encontrados são diferentes biológica e geneticamente dos isolados encontrados na Europa e América do Norte, além de ser observada a presença de genótipos recombinantes e uma maior diversidade genética (DUBEY et al., 2002, 2007a,b,c; LEHMANN et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2007; PENA et al., 2008).

Até o presente momento, poucos estudos sobre caracterização genética de *T. gondii* em animais selvagens, foram realizados na América do Sul. Pena et al., em

2011, isolaram e caracterizaram geneticamente *T. gondii* de um bugio (*Alouatta belzebul*) e de um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), provenientes do zoológico de Recife, e de um gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) capturado da cidade de São Paulo. Apenas o isolado do bugio não foi virulento para camundongos, nenhum dos isolados pertencia às linhagens arquétipo e dois deles (do gato-mourisco e do gambá) ainda não haviam sido descritos. Também no Brasil, em uma extensa análise por PCR/RFLP de 36 isolados de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) encontrou-se um total de 16 genótipos, dos quais sete foram descritos pela primeira vez e apenas cinco puderam ser classificados como pertencentes às linhagens clonais clássicas (YAI et al., 2009). De fato, apenas no Brasil, 88 genótipos únicos foram encontrados baseados na caracterização pela técnica de PCR/RFLP de isolados provenientes de animais (PENA et al., 2011) e com a ampliação desses estudos, novos genótipos devem continuar sendo encontrados, principalmente em vida selvagem.

Além desta incrível diversidade genética observada, a constante expansão da população humana obriga as espécies selvagens a ocuparem áreas cada vez menores, causando um estado de desequilíbrio, ameaçando a existência de diversas espécies e aumentando sobremaneira o contato das populações selvagens remanescentes com o homem e com os animais domésticos. Esta nova realidade certamente favorecerá que amostras de *T. gondii*, antes exclusivas da vida selvagem, tenham a oportunidade de colonizar áreas urbanas, e desta forma, favorecendo uma possível infecção no homem e em animais domésticos.

2 OBJETIVOS

Devido à importância dos animais selvagens como potenciais hospedeiros do *T. gondii* e à falta de informações sobre as características biológicas e genotípicas dos isolados de *T. gondii*, provenientes de animais selvagens no país, o presente estudo tem como objetivos:

- Isolar e caracterizar biologicamente *T. gondii* em tecidos de animais selvagens naturalmente infectados provenientes de diferentes regiões do Brasil, através de bioensaio em camundongos;
- Caracterizar genotipicamente os isolados de *T. gondii* obtidos dos animais selvagens através da utilização da técnica PCR-RFLP, utilizando marcadores genéticos específicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Toxoplasma gondii é um protozoário pertencente ao Reino Protista, Sub Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidia, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *T. gondii*. É um parasito intracelular obrigatório que infecta uma ampla variedade de mamíferos e aves, inclusive o ser humano, caracterizando seu potencial zoonótico. Entretanto, o parasito produz infecção assintomática na maioria de seus hospedeiros, devido à rápida indução da resposta imune celular, o que resulta no controle da multiplicação dos taquizoítas e estabelecimento de uma infecção crônica (YAP; SHER, 1999). Apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita e, possivelmente, é capaz de infectar e se replicar em todas as células nucleadas de mamíferos e aves (WONG; REMINGTON, 1993; DUBEY, 1998), sendo que no caso das aves pode ser observado inclusive nos eritrócitos, por serem células nucleadas (MANWELL, 1941¹ *apud* DUBEY, 2002; WOLFSON, 1941² *apud* DUBEY, 2002).

Foi descrito pela primeira vez em 1908 por Splendore em São Paulo, no Departamento de Bacteriologia do Hospital da Sociedade de Beneficência Portuguesa, em coelhos de laboratório, e por Nicole e Manceaux, no mesmo ano, que o encontraram, na Tunísia, no cérebro de um roedor (*Ctenodactylus gundii*) do Norte da África (NICOLE; MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). De fato, o nome do gênero do parasito foi baseado no nome do gênero deste roedor (PFEFFERKORN, 1990) e o nome da espécie do parasito foi baseada na forma em que o parasito é mais comumente encontrado e deriva das palavras gregas *taxon* e *plasma*, que significam arco e forma, respectivamente (NETO et al., 1995). Em 1909 Nicole e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma* no filo Apicomplexa (DUBEY; BEATTIE, 1988).

O ciclo biológico de *T. gondii* (Figura 1) envolve dois hospedeiros, os definitivos (felídeos) e os intermediários (demais espécies de mamíferos, incluindo os felídeos e as aves) (BLACK; BOOTHROYD, 2000), caracterizando-se, portanto, um ciclo heteroxeno facultativo.

¹MANWELL, R. D. Avian toxoplasmosis with invasion of the erythrocytes. **Journal of Parasitology**, v. 27, p. 245–251, 1941.

² WOLFSON, F. Mammalian *Toxoplasma* in erythrocytes of canaries, ducks, and duck embryos. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 21, p. 653–658, 1941.

A fase sexuada do ciclo reprodutivo de *T. gondii* ocorre no epitélio intestinal dos felinos domésticos ou selvagens, quando os mesmos ingerem oocistos ou cistos teciduais contendo bradizoítos (BLACK; BOOTHROYD, 2000). O termo bradizoíto foi dado por FRENKEL, em 1973, para descrever o organismo se multiplicando lentamente dentro do cisto. Da reprodução sexuada resultam oocistos não-esporulados que são eliminados nas fezes dos felídeos a partir de duas a três semanas após a infecção. Esses oocistos são eliminados por um período que pode variar de sete a 20 dias. No ambiente eles necessitam de no mínimo 24 horas para esporular (SULLIVAN; PARDO, 1993). Após a esporulação, eles são infectantes para qualquer animal de sangue quente, inclusive o ser humano e os próprios felinos. No meio externo, os oocistos esporulados resistem durante vários meses, podendo chegar a anos. Oocistos esporulados são esferoidais e apresentam no seu interior dois esporocistos elipsoidais, cada um com quatro esporozoítos, que se desenvolvem na presença de oxigênio e em temperaturas mais baixas que a corpórea (DUBEY, 1998).

Quando os oocistos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, os esporozoítos são liberados no tubo digestivo e penetram preferencialmente nas células do sistema fagocítico mononuclear. Multiplicam-se rapidamente sob a forma de taquizoítos no interior das células hospedeiras que são lisadas, liberando esses parasitos para o meio extracelular, onde estão livres para invadir novas células (SULLIVAN; PARDO, 1993). Eles invadem as células hospedeiras por penetração ativa, liberando enzimas proteolíticas (FRENKEL, 1988; DUBEY et al., 1998). A seguir, espalham-se pelo resto do corpo do hospedeiro via sangue e linfa. O termo taquizoíto, também dado por FRENKEL em 1973, substitui os termos previamente utilizados trofozoíto e endozoíto (DUBEY, 1987; DUBEY et al., 1998). Os taquizoítos são a principal forma infectante de *T. gondii*. Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais, incluindo pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos neurais e musculares, incluindo o cérebro, olhos e músculos cardíaco e esquelético. Cistos teciduais intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por toda a vida do hospedeiro, em estado de latência, sem causar uma resposta inflamatória (PETRAK; CARPENTER, 1965; HESSLER et al., 1971; DUBEY, 1986; DUBEY et al., 1998).

A transformação de taquizoíto em bradizoíto ocorre no momento em que o hospedeiro começa a desenvolver resposta imune que atua sobre a multiplicação dos taquizoítos, os quais passam a dividir-se mais lentamente, sendo então denominados bradizoítos. Estes encontram-se confinados em cistos, protegidos contra a ação do sistema imune e de drogas. As células hospedeiras podem tolerar uma carga muito maior de bradizoítos do que de taquizoítos (FRENKEL, 1988).

Desta forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítos e a destruição da célula hospedeira (SHARMA, 1990).

A transmissão de *T. gondii* pode ocorrer pela via vertical (congenita) ou horizontal (oral). A infecção congênita pode ocorrer quando uma fêmea gestante é primo-infectada ou por ocasião de reagudização devido à imunossupressão. Durante a parasitemia, *T. gondii* atravessa a placenta e invade os tecidos do feto em desenvolvimento. Embora a infecção transplacentária possa ocorrer em qualquer estágio da gestação, o feto é mais gravemente afetado quando a mãe se infecta durante a primeira metade da gestação (DUBEY, 1986). A transmissão horizontal ocorre pela via oral, através da ingestão de cistos teciduais presentes nos hospedeiros ou ingerindo acidentalmente oocistos presentes no ambiente e em alimentos contaminados com fezes oriundas do hospedeiro definitivo. Os oocistos, após serem ingeridos, são rompidos por digestão química no duodeno liberando esporozoítos que irão colonizar as células intestinais do hospedeiro.

Figura 1 - Ciclo biológico de *T. gondii*

Fonte: Vitaliano, S. N. (2012)

Embora *T. gondii* possa ser transmitido através de transfusão de sangue e transplantes, esses modos de transmissão são menos comuns que a ingestão de oocistos esporulados ou cistos teciduais (DUBEY, 1986; TENTER, 1999). Entretanto, na maioria dos casos, não é conhecido qual dessas vias é epidemiologicamente mais importante. É provável que as fontes principais de infecção por *T. gondii* variem nas diferentes populações humanas, dependendo dos hábitos culturais e alimentares (TENTER, 1999).

Em relação aos animais selvagens mantidos em cativeiro, existe também a possibilidade da disseminação do parasito nos zoológicos através de fômites, ou seja, os equipamentos de uso diário utilizados concomitantemente nos recintos dos felinos e de outros animais, tais como botas, luvas, pás, vassouras e mangueiras (DUBEY, 1986), além da presença de gatos errantes que podem transitar por todo o zoológico.

Os sinais clínicos da toxoplasmose são atribuídos à ruptura celular secundária à replicação do parasito, necrose celular associada à reação de hipersensibilidade tardia e vasculite por imunocomplexos (LAPPIN et al., 1989). Em seres humanos, a infecção adquirida pode ser localizada ou generalizada, sendo a linfadenite a forma mais frequentemente observada. A linfadenopatia pode estar associada à febre, fadiga, mal estar, dor muscular, dor de garganta e dor de cabeça (DUBEY; MORALES; LEHMANN; 2004). Nas mais de 200 espécies de mamíferos e aves selvagens que foram identificadas como hospedeiros intermediários de *T. gondii*, os sinais clínicos incluem: letargia, anorexia, hipertermia, diarreia, dispnéia, incoordenação motora, linfadenite, problemas oculares (retinocoroidite, uveíte), abortos e morte súbita (DOBOS-KAVÁCS et al., 1974; DUBEY, 1986; VIDOTTO, 1992; PATTON, 1993).

Pombos domésticos (*Columba livia*) naturalmente infectados apresentaram anorexia, incoordenação, emaciação, conjuntivite com a presença de organismos no exsudato ocular e convulsões na hora da morte (CARINI, 1911³ *apud* DUBEY, 2002; REIS; NÓBREGA, 1936⁴ *apud* DUBEY, 2002). Em 30 perdizes (*Alectoris rufa*) experimentalmente infectadas, somente duas (6,6%) apresentaram sinais clínicos (anorexia, incoordenação, prostração, eriçamento de penas e diarreia amarelada) e posteriormente vieram a óbito. As demais aves permaneceram clinicamente normais (MARTÍNEZ-CARRASCO et al., 2005). Em lontras marinhas da Califórnia (*Enhydra*

³ CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 4, p. 518–519, 1911.

⁴ REIS, J.; NÓBREGA, P. Toxoplasmose. Tratado de doenças das aves, **Proc. Ed. Inst. Biológico** (São Paulo), p. 302–306, 1936.

lutris nereis) e outros cetáceos como golfinhos, botos e baleias o parasito causa danos ao sistema nervoso central, mudanças comportamentais, abortos e morte fetal e neonatal (DUBEY et al., 2003b; MILLER, 2008). Recentemente, *T. gondii* foi identificado como um importante agente causador de doença em mamíferos marinhos na América do Norte (WENDTE et al., 2011).

Lesões macroscópicas na toxoplasmose incluem hemorragias do intestino e fígado, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia. Microscopicamente são encontradas reações inflamatórias com infiltrado celular predominantemente mononuclear, lesões como necrose de fígado e baço, nefrite, miocardite, congestão e edema pulmonar, pneumonia, enterite, entre outras. Muitas vezes é possível visualizar o parasito nos órgãos infectados (HESSLER et al., 1971; ANDERSON; McCLURE, 1982; FRENKEL, 1989; CUNNINGHAM et al., 1992; DIETZ et al., 1997). Em perdizes experimentalmente infectadas foi encontrado esplenomegalia, hepatomegalia, congestão gastrintestinal e o intestino delgado apresentava-se edematoso com conteúdo amarelo claro (MARTÍNEZ-CARRASCO et al., 2005).

Os tratados clássicos de imunologia referem-se a duas formas de imunidade adquirida: a imunidade humoral e a imunidade celular (ABBAS et al., 2002). No complexo processo de interação do hospedeiro com seus parasitos, a resposta humoral e celular estão intimamente relacionadas, e por isso, devem ser abordadas simultaneamente. A multiplicação ativa dos taquizoítas no interior das células, durante o estágio agudo da infecção, é combatida por ambos mecanismos imunológicos, sendo a resposta imune celular a de maior importância no controle da infecção, a qual apresenta um perfil predominantemente Th1 (INNES, 1997). Durante a fase inicial da doença e antes do desenvolvimento da imunidade específica, *T. gondii* pode ser encontrado em diferentes tecidos e órgãos, e normalmente estão acompanhados por uma reação inflamatória mononuclear em pequenos focos de necrose (OLIVEIRA et al., 2000). A imunidade a *T. gondii* é mediada por células T, junto aos macrófagos e às células exterminadoras naturais (NK). O contato prévio do hospedeiro com o protozoário é indicado pela presença de anticorpos específicos.

No Brasil, a prevalência da infecção por *T. gondii* em humanos é especialmente alta, alcançando até 100% em algumas áreas (DUBEY; BEATTIE, 1988; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; SOBRAL et al., 2005). Em média, 60% das mulheres adultas apresentaram sorologia positiva para o parasito (NETO et al., 1995). A infecção geralmente é assintomática, sendo a infecção primária em gestantes e a infecção em indivíduos imunocomprometidos as formas mais graves da doença. A infecção primária durante a gestação pode resultar em infecção

congênita do feto levando a quadros neurológicos e oculares variados como hidrocefalia, calcificação cerebral, convulsões, retinocoroidite e cegueira (DUBEY; MORALES; LEHMANN; 2004). Em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a toxoplasmose é a causa mais comum de lesões cerebrais e desenvolve em aproximadamente um terço dos pacientes soro-positivos (SHARMA, 1990). Não é conhecida a proporção do total de casos em que a infecção é assintomática, mas provavelmente varia de acordo com a linhagem do parasito (HALL, 1992).

Gattás et al. (2000) relataram no Brasil, em São Carlos no campus da Universidade de São Paulo, um surto de toxoplasmose no qual 113 indivíduos apresentaram sintomas. Em Santa Isabel do Ivaí (PR), foi relatado um surto de toxoplasmose na população, da qual foram examinadas 2884 pessoas, sendo detectados anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 1255 pessoas. Anticorpos IgM e IgG foram detectados em 426 indivíduos. Este surto foi relacionado à ingestão de água de um dos dois reservatórios do município, contaminada com fezes de uma família de gatos portadores de *T. gondii* estabelecida nos arredores do reservatório (DE MOURA et al., 2006). Em Erechim, no Rio Grande do Sul, 17% de 1000 indivíduos selecionados aleatoriamente apresentaram toxoplasmose ocular; sendo a cidade com maior prevalência da forma ocular da doença no mundo (GLASNER et al., 1992). Um estudo epidemiológico controlado, também realizado em Erechim com pessoas que haviam adquirido toxoplasmose ocular recentemente, confirmada pela detecção de anticorpos IgM, indicou que a prática da jardinagem e o hábito de comer carne de cordeiro foram os dois fatores de risco importantes na toxoplasmose adquirida naquele município (JONES et al., 2006).

Quase todas as espécies de animais são susceptíveis a *T. gondii* e existem variadas taxas de soropositividade e sinais clínicos de toxoplasmose em diferentes hospedeiros (DUBEY; BEATTIE, 1988). Animais domésticos como cães, gatos, equinos e bovinos apresentam evidências de sorologia positiva para *T. gondii*, assim como diversas espécies de animais selvagens (DUBEY; BEATTIE, 1988; DRESSEN, 1990).

Felinos domésticos e selvagens são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos no ciclo de *T. gondii* (DUBEY; BEATTIE, 1988). O processo de transmissão entre animais selvagens foi pouco estudado (HUMPHREYS et al., 1995; LINDSAY et al., 1991). Smith e Frenkel (1995) sugerem a hipótese de que a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em carnívoros seja maior que em onívoros, e esta por sua vez seja maior que em herbívoros, pois o hábito alimentar de carnívoros e onívoros expõe esses animais ao risco de contato com cistos teciduais do parasito.

No Brasil, Sogorb et al. (1977) examinaram 10 espécies de mamíferos quanto à presença de anticorpos anti-*T. gondii* usando o teste Sabin-Feldman, o qual foi positivo para nove espécies, porém apresentando baixa reatividade sorológica. Ferreira et al. (1997), também no Brasil, observaram 27% de soropositividade em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e 12% de soropositivos em veados-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) provenientes do pantanal e do Parque Nacional de Emas, respectivamente. Na Califórnia, uma prevalência de anticorpos de 7% foi relatada em veado-orelhudo (*Odocoileus hemionus*) por Chomel et al. (1994).

Em 1999, Bouer et al. relataram um surto fatal de toxoplasmose em três macacos-barrigudo (*Lagothrix lagotricha*) de um Zoológico no Brasil, com o diagnóstico sendo confirmado por imunoistoquímica. Silva et al. (2001) encontraram uma alta soropositividade para *T. gondii* em felinos selvagens de cativeiro, sugerindo uma ampla exposição ao parasito dos felinos neotropicais nos zoológicos brasileiros. André et al. (2010), em um estudo de soroprevalência em felídeos e canídeos selvagens, encontraram respectivamente 63,4% (102/169) e 50,5% (49/97) de positividade para anticorpos anti-*T. gondii*, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em zoológicos dos estados de São Paulo, Mato Grosso e Distrito Federal. Em zoológicos do Norte e do Nordeste do Brasil, utilizando o teste de aglutinação modificado (MAT), foi possível detectar a presença de anticorpos contra o parasito em 61 de 184 amostras de mamíferos selvagens de várias espécies, sendo o primeiro relato de detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em antas (*Tapirus terrestris*) de cativeiro ou vida livre (MINERVINO et al., 2010).

Dubey et al. (1999) encontraram soropositividade de 59%, 75% e 86% respectivamente para coiote (*Canis latrans*), raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) e raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), no Meio-Oeste americano. Em áreas específicas do Alaska foi encontrado uma soropositividade de 9% para *Canis lupus* (ZARNKE et al., 2000). Gennari et al. (2004) encontraram 35,1% de positividade para anticorpos anti-*T. gondii* em canídeos selvagens brasileiros. Vitaliano et al. (2004) confirmaram que em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) de cativeiro a prevalência de *T. gondii* é maior em adultos do que em jovens e filhotes, chegando a uma prevalência de 74,6% de animais soropositivos para anticorpos contra o parasito. De modo geral, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos aumenta de acordo com a idade, possivelmente devido a um maior tempo de exposição ao parasito (FRANTI et al., 1975).

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* através de métodos moleculares tem sido realizada em sua maioria com amostras de humanos, ovinos, caprinos, cães, gatos, aves e com uma menor frequência em animais

selvagens (KHAN et al., 2006; CAVALVANTE et al., 2007; DUBEY et al., 2007d; DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008; PENA et al., 2011; DA SILVA et al., 2011).

A virulência de *T. gondii* é fortemente influenciada pelo genótipo do parasito. Estudos realizados no hemisfério norte observaram que as amostras de *T. gondii* eram geneticamente muito similares e elas foram divididas em três linhagens clonais distintas (tipos I, II e III) baseadas no polimorfismo do *locus* SAG2 (HOWE; SIBLEY, 1995; MORDUE et al., 2001; ROBBEN et al., 2004; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Embora esta clonalidade seja fortemente evidente na América do Norte e na Europa, uma diversidade genética muito maior, indicando constante recombinação gênica, é característica dos isolados do parasito na América do Sul (KHAN et al., 2006; LEHMANN et al., 2006; PENA et al., 2008).

No hemisfério norte, apesar da limitada diversidade genética, estas três linhagens (tipos I, II e III) manifestam diferentes níveis de virulência em camundongos (ROBBEN et al., 2004). A linhagem I é altamente virulenta para camundongos, tendo uma dose letal com um único parasito viável e está frequentemente associada à toxoplasmose ocular e à toxoplasmose congênita severa, sugerindo que essa linhagem também seja mais patogênica para o homem (MORDUE et al., 2001). As linhagens do tipo II e III são menos virulentas e altamente cistogênicas, resultando em infecções controladas que persistem cronicamente e o surgimento da infecção depende do genótipo do hospedeiro (MORDUE et al., 2001; ROBBEN et al., 2004). No hemisfério Norte, o tipo II é o mais prevalente nos animais e está mais comumente associado com a toxoplasmose humana (HOWE; SIBLEY, 1995; MORDUE et al., 2001; ROBBEN et al., 2004).

No Brasil, diversos estudos mostram uma maior prevalência dos tipos I e III (DUBEY et al., 2003a; DUBEY et al., 2003b; DUBEY et al., 2006; BRANDÃO et al., 2006). Estudos recentes relatam que os isolados de *T. gondii* no Brasil e em outros países da América do Sul são biológica e geneticamente distintos dos isolados encontrados na América do Norte e Europa (DUBEY et al., 2002, 2007a,b; LEHMANN et al., 2006).

Su et al. (2003) estimam que as três linhagens arquétipo teriam divergido a aproximadamente 10.000 anos, período que coincide com a domesticação dos animais de companhia e de produção.

Na América do Norte e Eurásia, a maioria dos isolados de *T. gondii* provenientes de humanos e animais domésticos puderam ser agrupados dentro das três linhagens clonais supracitadas quando analisados através do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição (RFLP), por

marcadores de microsatélite e por marcadores isoenzimáticos (DARDÉ et al., 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002a,b). Para determinar a estrutura populacional de *T. gondii* e avaliar a correlação entre genótipo do parasito e toxoplasmose humana e animal, Howe e Sibley (1995) analisaram 106 amostras isoladas de várias espécies de hospedeiros, de diversas regiões geográficas, localizadas primariamente na América do Norte e Europa. Foram utilizados como marcadores genéticos (*SAG1*, *SAG2*, *ROP1*, *850*, *L328* e *62*) e os resultados obtidos por análise de RFLP mostraram que *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional altamente clonal, 95% dos isolados puderam ser definidos em um dos três genótipos altamente similares, linhagens dos tipos I, II e III. Somente poucas amostras apresentaram genótipos muito variados, indicando que a recombinação entre gametas das três linhagens é muito rara nestas populações. Curiosamente, as amostras que apresentaram esse perfil genotípico variado eram provenientes de animais selvagens. Correlacionando o genótipo do parasito e o hospedeiro, os autores verificaram que houve uma predominância de amostras do tipo II na toxoplasmose humana. Amostras do tipo I estavam mais associadas com toxoplasmose humana congênita do que com infecções em animais, enquanto a frequência do tipo III foi significativamente mais alta em animais. Em 34 isolados de animais, foram encontrados 44% do tipo II e 47% do tipo III e somente 9% do tipo I.

Mondragon et al. (1998) analisaram 43 amostras isoladas de suínos abatidos no Iowa (EUA), através da RFLP, nos *loci* *SAG1* e *SAG2*. Amostras do tipo II foram mais prevalentes, constituindo 83,7% das amostras e o genótipo III foi encontrado em 16,3% dos isolados. A alta prevalência da linhagem tipo II nas amostras de suínos foi concordante com a alta prevalência encontrada em isolados de humanos com toxoplasmose (81% do tipo II) por Howe et al. (1997). Como os suínos são considerados fonte primária de infecção por *T. gondii* para os humanos nos EUA, os autores sugeriram que a associação entre o genótipo II e a infecção humana era, em parte, devido à elevada prevalência destas amostras em suínos.

Na França, Richomme et al. (2009) estudaram 21 isolados de javalis selvagens (*Sus scrofa*) de duas regiões do país. A genotipagem dos isolados foi realizada utilizando três marcados genéticos de RFLP (*SAG 1*, *SAG2* e *GRA7*) e seis marcadores de microsatélite (*TUB2*, *TgM-A*, *W35*, *B17*, *B18* e *M33*) e os resultados revelaram que todos os 21 isolados pertenciam à linhagem arquétipo tipo II. No mesmo país, isolados de nove raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), 12 corças (*Capreolus capreolus*), um cervo-nobre (*Cervus elaphus*), um muflão (*Ovis gmelini musimon*) e um pato real (*Anas platyrhynchos*) submetidos à análises moleculares utilizando os mesmos marcadores genéticos de RFLP e de microsatélite pertenciam

também ao genótipo tipo II (AUBERT et al., 2010). O resultado desses estudos indicam que pelo menos na França, os genótipos circulantes em vida selvagem não diferem das amostras circulantes em ambiente urbano (RICHOMME et al., 2009).

Na Bélgica, um estudo sobre a infecção por *T. gondii* e *Neopora caninum* em vida selvagem, utilizando métodos sorológicos (MAT) e moleculares identificou ambos os parasitos em diferentes espécies de cervídeos e em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), as prevalências encontradas foram consideradas altas quando comparadas ao restante da Europa. Vinte e seis isolados de *T. gondii* de raposas vermelhas foram submetidos à caracterização genética por marcadores de microsatélite, destes, 25 foram caracterizadas como pertencentes à linhagem clonal tipo II e uma foi caracterizada como a linhagem tipo III (DE CRAEYE et al., 2011). Estudos de caracterização genética de *T. gondii* em lebres selvagens na Finlândia detectou, na população estudada, apenas a presença do genótipo tipo II (JOKELAINEN et al., 2011).

Na América do Norte, vários genótipos geneticamente diversos têm sido identificados circulando em vida selvagem (WENDTE et al., 2011) porém, em um estudo recente, Khan et al. (2011) revelaram o aparecimento de um quarto tipo clonal, o genótipo 12 que apresentou ampla distribuição geográfica e alta prevalência entre os isolados estudados. Este estudo sugeriu que as amostras de *T. gondii* presentes em vida selvagem na América do Norte tenham uma baixa diversidade genética, ocorrendo apenas alguns dos principais tipos clonais. Dubey et al. (2011), também na América do Norte, realizaram a caracterização de *T. gondii* por meio da PCR/RFLP utilizando 12 marcadores genéticos (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1*, *Apico* e *NEW SAG2*) em amostras de animais selvagens de vida livre. Dos 169 isolados de várias espécies de aves e mamíferos selvagens obtidos observou-se o predomínio das linhagens clonais. Nesse estudo, os genótipos tipo 12, tipo II e tipo III representaram 84,6% do total de isolados.

Estudos com lontras marinhas nos EUA (MILLER et al., 2004; CONRAD et al., 2005; SUNDAR et al., 2008) mostraram uma diversidade genética de *T. gondii* ligeiramente maior à encontrada em humanos e animais domésticos. Sundar et al. (2008) encontraram um novo genótipo, o genótipo A, além do também novo genótipo X, que já havia sido encontrado exclusivamente em lontras marinhas por Conrad et al. (2005) e por Miller et al. (2004). Na Califórnia, o genótipo X também foi encontrado em felídeos e canídeos selvagens que vivem em regiões costeiras, em outras espécies de lontras e em moluscos bivalves destas mesmas regiões (MILLER et al., 2008). Análises recentes mostram que os genótipos A e X têm perfis de RFLP

idênticos e ambos pertencem à linhagem clonal do tipo 12 (KHAN et al., 2011), aumentando a importância do tipo 12 entre os animais selvagens nos EUA.

Di Guardo et al. (2011) relataram a presença de *T. gondii* no cérebro de três golfinhos riscados (*Stenella coeruleoalba*) encontrados encalhados na costa do mar da Ligúria, na Itália, entre 2007 e 2008. Os animais apresentavam um quadro severo de meningo-encefalite não-purulenta multifocal e a análise genotípica de fragmentos de cérebro destes animais identificou a ocorrência de isolado tipo II em um animal e de genótipos atípicos originários da linhagem tipo II nos outros dois golfinhos.

Até o presente momento, pouco se sabe a cerca do perfil genotípico de *T. gondii* circulante no continente africano. Velmurugan et al. (2008) genotiparam 19 isolados de galinhas provenientes de seis países africanos (Egito, Quênia, Nigéria, Congo, Mali e Burkina Faso) utilizando 10 marcadores de PCR/RFLP (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* e *Apico*) e obtiveram 13 isolados do tipo III, cinco do tipo II e apenas um genótipo atípico. Estes resultados indicam uma baixa frequência de linhagens não clonais na África e que as linhagens clonais clássicas, assim como na América do Norte e Europa, também predominam neste continente. Entretanto, um estudo recente de caracterização genética de *T. gondii*, utilizando 13 marcadores de microssatélite, em animais de áreas urbanas e rurais do Gabão identificou uma maior diversidade genética e a existência de dois novos haplogrupos (AFRICA 1 e 3), até o momento, exclusivos deste continente (MERCIER et al., 2010).

Porém o mesmo não acontece na América do Sul com isolados de humanos, animais domésticos e mesmo com os poucos estudos com animais selvagens realizados nesta parte do mundo. Estudos recentes realizados no continente sulamericano, principalmente no Brasil, mostram que os isolados de *T. gondii* encontrados são diferentes biologicamente e geneticamente dos isolados encontrados na Europa e América do Norte, além da presença de genótipos recombinantes e de uma maior diversidade genética (DUBEY et al., 2002, 2007a,b,c; LEHMANN et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2007, PENA et al., 2008). Rajendran et al. (2012) observaram uma alta diversidade genética com predomínio da linhagem tipo III dentro e entre as populações de *T. gondii* de vários países das Américas Central e do Sul, com exceção do Chile. Neste país, houve um predomínio da linhagem do tipo II, a qual não foi encontrada nos outros países deste estudo. Essa sensível diferença pode ser explicada pelo fato do Chile ser uma estreita faixa costeira isolada do resto do continente pela cordilheira dos Andes.

Em Belo Horizonte, MG, Carneiro et al. (2011) isolaram, pela primeira vez no Brasil, *T. gondii* do sangue de recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Através do bioensaio em camundongos foram obtidos 27 isolados de *T. gondii*. A variabilidade genética dos isolados foi analisada por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) em 12 *locus* (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico). O genótipo completo foi obtido em 25 (92,6%) dos 27 isolados. Quatorze genótipos diferentes foram identificados, sendo doze novos genótipos, e um isolado com infecção mista. Dois genótipos encontrados são comuns no Brasil (BrII e BrIII).

Ferreira et al. (2011) investigaram as características genéticas de amostras de *T. gondii* coletadas de 62 pacientes com toxoplasmose no estado de São Paulo. Amostras de DNA foram isoladas de sangue, líquido céfalo-raquidiano e líquido amniótico de 25 pacientes com toxoplasmose cerebral e AIDS, dois pacientes com toxoplasmose aguda, 12 pacientes com toxoplasmose ocular, seis recém-nascidos com toxoplasmose congênita e 17 mulheres grávidas com infecção aguda. A genotipagem foi realizada por multilocus PCR-RFLP, incluindo SAG1, SAG2 (5'-e 3'-SAG2, alt.SAG2) SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1 e APICO. Entre as 62 amostras clínicas, 20 (32%) foram genotipadas com sucesso em oito ou mais loci gênicos, sendo agrupados em três genótipos distintos. Dezoito amostras pertencem ao genótipo ToxoDB # 65 (TgCatBr82) e as outras duas amostras foram identificadas com os genótipos ToxoDB # 6 (TgCatBr12) e # 71 (TgCkBr26), respectivamente originadas de gato e galinha brasileiros.

Pena et al. (2008) estudaram as características genéticas de 125 isolados brasileiros provenientes de galinhas, cães e gatos de diferentes estados usando 11 marcadores na PCR-RFLP multilocus, incluindo SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e um novo SAG2. Os dados combinados revelaram 48 genótipos, entre os quais 26 correspondiam a um único isolado. Desses 48 genótipos, quatro foram considerados as linhagens clonais comuns no Brasil. Essas linhagens foram designadas como Tipo BrI, Tipo BrII, Tipo BrIII e Tipo BrIV. A virulência destas linhagens foi avaliada pela taxa de mortalidade em camundongos infectados e foi possível observar que os isolados tipo BrI são virulentos, os isolados tipo BrIII não são virulentos e os isolados tipo BrII e BrIV possuem um grau intermediário de virulência.

Isolados de galinhas assintomáticas oriundas do Brasil foram mais patogênicos em camundongos do que isolados da Europa ou da América do Norte, independentemente do genótipo (DUBEY et al., 2006). Além disso, a maioria dos

isolados provenientes do Brasil não eram clonais e também foi observada a ausência do genótipo tipo II (DUBEY et al., 2007). Corroborando os dados sobre patogenicidade em camundongos, Yai et al. (2008), em um trabalho com capivaras, e Cavalcante et al. (2007) em um estudo com caprinos, encontraram a maioria dos isolados virulentos, em camundongos, a partir das amostras obtidas das espécies em questão.

No Brasil foram realizados vários estudos com galinhas de diversas regiões do país como uma forma de medir a contaminação do solo por *T. gondii*, devido ao hábito de se alimentarem do chão. De 24 isolados da região Amazônica, 14 eram do tipo I e 10 do tipo III (DUBEY et al., 2006); no Rio de Janeiro, de 48 isolados 34 eram tipo I e 13 tipo III (DUBEY et al., 2003a); e de 13 isolados do Paraná, sete eram do tipo I e seis do tipo III (DUBEY et al., 2003b), embora nestes três primeiros estudos com galinhas somente o marcador *SAG2* foi utilizado. Entretanto estes estudos chamaram a atenção pela alta mortalidade dos camundongos no bioensaio e pela ausência do tipo II, o mais comumente isolado no hemisfério norte.

Dubey et al. (2007a), em um estudo com galinhas do Pará e do Rio Grande do Sul (estados separados por aproximadamente 3500 Km de distância) utilizando 11 marcadores genéticos encontraram uma grande diversidade de *T. gondii* com o isolamento de 18 genótipos diferentes a partir de 34 isolados. No Pará foram encontrados 11 genótipos entre 15 isolados e no Rio Grande do Sul foram encontrados sete genótipos entre 19 isolados, além de apresentarem populações totalmente distintas entre as duas localizações. Em 2008, Dubey et al., caracterizaram novamente 151 isolados de galinhas de diversas localidades do Brasil. A genotipagem destas amostras revelou a presença de 58 genótipos, dos quais, a metade (29/58) apresentou apenas um isolado como representante e com perfis nunca antes observados. Apenas um dos isolados apresentou o perfil da linhagem clonal tipo I, cinco foram caracterizados como a linhagem clonal tipo III. O genótipo clonal tipo II foi ausente, apesar de uma das amostras apresentar o perfil da linhagem II em nove dos 10 marcadores genéticos utilizados.

Soares et al. (2011), em um estudo de isolamento e genotipagem de *T. gondii* em galinhas da região do Pantanal, observaram uma alta variabilidade genética do parasito confirmada pela identificação de 11 genótipos diferentes em apenas 22 isolados. Por outro lado, Dubey et al. (2010), em um estudo com galinhas do arquipélago de Fernando de Noronha, encontraram uma diversidade genética do parasito sensivelmente mais baixa além da identificação da presença do genótipo II (raramente encontrado no Brasil). Os resultados deste estudo indicam que, a população de *T. gondii* presente nesta ilha é constituída por genótipos únicos, bem

como os genótipos clonais que são dominante na Europa e América do Norte. A linhagem clonal tipo II foi novamente isolada no Brasil em uma galinha d'angola (*Numida meleagris*) de Minas Gerais naturalmente infectada, sendo o primeiro relato desta espécie como hospedeira de *T. gondii* (DUBEY et al., 2011).

Os ovinos são importante fonte de infecção de *T. gondii* para os humanos, e não obstante, nesta espécie, a infecção pelo parasito é uma grande causa de abortos em todo o mundo. No estado de São Paulo, Ragozo et al. (2008) testaram o soro de 495 ovinos de 36 municípios para anticorpos anti-*T. gondii* pelo MAT e encontraram 120 animais soropositivos. Deste total, 82 animais soropositivos foram submetidos ao bioensaio em camundongos e *T. gondii* foi isolado de 16 animais. Posteriormente, estes isolados foram submetidos, juntamente com 12 isolados de caprinos, à caracterização genética pela PCR/RFLP utilizando marcadores genéticos: *SAG1*, *SAG2* (5'–3' *SAG2* e *alt.SAG2*), *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *L358*, *c22-8*, *c29-6*, *PK1*, *Apico* e *CS3*. O resultado da genotipagem identificou o aparecimento de seis novos genótipos em 13 isolados, além de oito isolados (quatro de ovinos e quatro de caprinos) classificados dentro da linhagem clonal BrI, um isolado classificado como BrIII e cinco isolados identificados em três genótipos previamente descritos (RAGOZO et al., 2010).

A tipificação de 13 isolados de ovinos obtidos em abatedouros brasileiros revelou nove genótipos diferentes. Pela primeira vez foram confirmados Isolados tipo II no Brasil além do aparecimento de quatro novos genótipos atípicos, demonstrando assim, mais uma vez, uma alta diversidade do parasito em pequenos ruminantes. A caracterização genética destes isoladas foi realizada pela técnica de PCR/RFLP utilizando 12 marcadores genéticos: *SAG1*, *SAG2* (5' –3' *SAG2* e *alt.SAG2*), *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *L358*, *c22-8*, *c29-6*, *PK1*, *Apico* e *CS3* (DA SILVA et al., 2011).

Poucos dados estão disponíveis na literatura sobre qual é o perfil genético de *T. gondii* circulante em vida selvagem no Brasil e na América do Sul, portanto, existe a necessidade da realização de mais estudos sobre o perfil genotípico dos isolados de *T. gondii* dos animais selvagens desta região. Neste sentido, Yai et al. (2009) realizaram a genotipagem de 36 isolados de capivaras provenientes de seis municípios de estado de São Paulo. Dezesesseis genótipos foram identificados utilizando 12 marcadores genéticos de RFLP (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29- 2*, *L358*, *PK1*, *Apico* e *CS3*). Não foram encontrados isolados pertencentes às linhagens clonais clássicas tipo I e tipo II, porém oito dos 36 isolados puderam ser classificados dentro das linhagens clonais comuns do Brasil: BrI, BrII e BrIII. Sete dos 16 genótipos foram descritos pela primeira vez no Brasil e três dos 36 isolados apresentaram infecções mistas. Assim como em estudos

anteriores, os isolados tipo Brl apresentaram alta virulência, os isolados tipo BrII virulência intermediária e os isolados tipo BrIII não foram virulentos para os camundongos infectados.

Pena et al. (2010) isolaram, por meio de bioensaio em camundongos, *T. gondii* de homogenados de tecidos de um Bugio (*Alouatta belzebul*), de um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) e de um gambá de orelha preta (*Didelphis aurita*). A caracterização genotípica dos isolados foi realizada através da técnica de PCR-RFLP utilizando 12 marcadores genéticos e os resultados indicaram a presença de três genótipos distintos e que os genótipos isolados no gato-mourisco e no gambá foram detectados no Brasil pela primeira vez. O genótipo isolado no bugio já foi detectado anteriormente em uma cabra e em 10 galinhas provenientes do nordeste do Brasil, resultado que sugere a existência de uma linhagem comum a esta região.

Na Guiana Francesa, um estudo avaliou o impacto da antropização de ambientes naturais na variabilidade genética das populações de *T. gondii*. A análise genotípica foi realizada utilizando 15 marcadores de microssatélite e revelou uma menor diversidade genética do parasito em ambientes antropizados em relação aos ambientes tidos como “selvagem”. Existe uma diferenciação genética clara entre as amostras de ambientes antropizados e aquelas encontradas na natureza, porém foi constatado a ocorrência de um certo grau de hibridização entre as amostras dos diferentes ambientes. Sabe-se que as populações de *T. gondii* das áreas selvagens da Guiana Francesa apresentam vários genótipos atípicos com alta variabilidade genética e possuem alta patogenicidade para humanos. Por outro lado, a antropização do ambiente parece ser acompanhada por uma perda de variabilidade genética de *T. gondii* associada a uma maior estruturação populacional do parasito (MERCIER et al., 2011).

A riqueza crescente de dados genéticos disponíveis de diversas localidades geográficas tem facilitado várias reavaliações da estrutura global da população de *T. gondii*. O resultado de diversos estudos mostra que esta variada gama de genótipos pode ser classificada em quatro sub-populações distintas: duas sub-populações exclusivas da América do Sul, uma sub-população encontrada em todos os continentes amostrados com exceção da América do Sul e outra encontrada em todo o mundo (LEHMANN et al., 2006).

Os recentes esforços em isolar *T. gondii* em vida selvagem deixa claro que a presença de genótipos chamados “exóticos” ou “atípicos” não são anormalidades insignificantes na estrutura populacional deste parasito, pelo contrário, são membros importantes do conjunto de genes que fornecem uma melhor representação da vasta gama de hospedeiros utilizados por este parasito (WENDTE et al., 2011). Esta

afirmação pode ser extrapolada de uma maneira geral para o Brasil e para o continente Sul-Americano, pois diversos trabalhos (DUBEY et al., 2007a, b, c, d; DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008; SOARES et al., 2011) relatam alta variabilidade genética e a presença de genótipos “atípicos” também em espécies domésticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi realizado após consulta técnica junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Todo o procedimento experimental foi realizado nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ/USP e nos laboratórios do Departamento de Microbiologia da Universidade do Tennessee, Knoxville, EUA.

4.2 ANIMAIS

Amostras biológicas (fragmentos de cérebro e coração) provenientes de mamíferos e aves selvagens de vida livre e de cativeiro foram obtidas de diferentes localidades do Brasil segundo o quadro 1. As amostras foram catalogadas e denominadas por uma sigla composta por letras e números, na qual as letras determinam a origem da amostra e o número determina a ordem de recebimento da amostra (ex. J1; primeira amostra proveniente de Jaboticabal), salvo as exceções das amostras provenientes de Cáceres, MT e Adrianópolis, PR, cedidas de outros experimentos e, portanto, as siglas não seguem esta norma.

As amostras provenientes de São Paulo foram coletados junto ao Depave, a Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo de Fauna da Prefeitura de São Paulo, e portanto, foram denominadas com a sigla “D”. As amostras de Jaboticabal foram cedidas pelo Ambulatório de Animais Selvagens do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp campus de Jaboticabal (FCAV/Unesp) que presta atendimento a diversas espécies de animais de Jaboticabal e região. As amostras provenientes de Uberlândia e São José do Rio Preto são originárias dos Hospitais Veterinários da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV/UFU) e do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Rio Preto (UNIRP), respectivamente. As

amostras de Recife são originárias do Zoológico Parque Dois Irmãos e as amostras das demais localidades foram obtidas por meio de parcerias com pesquisadores.

Neste experimento foram avaliadas espécies com comportamento sinantrópico, animais selvagens de vida livre ou de cativeiro, provenientes das localidades citadas (Quadro 1) independente da *causa mortis*. Foi elaborada uma ficha na qual os dados disponíveis (espécie, sexo, peso, idade, origem) de cada animal foram anotados. Entretanto, para efeito de análise somente os dados disponíveis para todos os animais amostrados, que foram espécie, origem (vida livre ou cativeiro) e localidade foram avaliados

Quadro 1 - Procedência das amostras obtidas com as devidas siglas e a quantidade de animais analisados por localidade

Procedência	Sigla	Nº de animais analisados
Acre		
Assis Brasil	A	4
Mato Grosso		
Cáceres	SM	1
Minas Gerais		
Uberlândia	U	43
Pará		
Santarém	S	60
Paraná		
Adrianópolis (Vale do Ribeira)	VRR	3
Pernambuco		
Fernando de Noronha	FN	5
Recife	R	13
São Paulo		
Jaboticabal	J	100
Peruíbe	P	5
São José do Rio Preto	SJ	1
São Paulo	D	17
Total		252

Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram provenientes de um único indivíduo (animal), com exceção das amostras FN5 e FN6, originárias de Fernando de Noronha, que foram obtidas a partir de um *pool* de cinco animais cada. Em ambos os casos, o *pool* foi composto de animais da mesma espécie.

As amostras foram enviadas de agosto de 2009 a março de 2011. Com exceção das amostras originárias da cidade de São Paulo, de Cáceres e de Adrianópolis, o envio foi realizado pelo correio (Sedex).

4.3 EXAME SOROLÓGICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Toxoplasma gondii*

Para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, os soros dos animais selvagens foram examinados através do MAT (DUBEY; DESMONTS, 1987).

A diluição dos soros foi feita em microplaca (96 poços), usando solução salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH₂PO₄ 0,0026M; Na₂HPO₄ 0,008M), filtrada em membrana de policarbonato com 0,45 µm de porosidade.

Em seguida, 120µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5mL de solução alcalina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de Mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Essa mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço. Os soros diluídos foram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (v/v). A placa foi selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada durante a noite em estufa a 37°C.

A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa foi anotado como resultado negativo; um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido foi anotado como positivo (DESMONTS; REMINGTON, 1980).

Os animais com títulos maiores ou iguais a 25 foram considerados positivos (SILVA et al., 2002). Inicialmente, para a triagem dos animais, foram feitas diluições seriadas na base dois de 1:25 a 1:200. Os soros dos animais com títulos maiores ou iguais a 200 foram novamente diluídos seriadamente e testados até chegar ao título

máximo da reação.

Em todas as reações foram usados controles positivo e negativo previamente conhecidos e controle do antígeno. O antígeno foi fornecido pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviado por via aérea.

Os soros foram mantidos em freezer a -20°C até o momento das análises.

4.4 DIGESTÃO PÉPTICA DOS TECIDOS

Os tecidos (cérebro, coração e músculo esquelético) dos animais selvagens foram cortados em pequenos pedaços, sendo removidos a gordura e o tecido conjuntivo. Foi realizado um “pool”, de aproximadamente 50g, com os tecidos e o mesmo foi homogenizado em solução salina com o auxílio de um homogeneizador doméstico. O homogenizado de cada animal foi dividido em duas alíquotas, uma utilizada para o bioensaio em camundongos e, portanto, acrescida de uma solução de pepsina ácida e a outra alíquota foi armazenada em tubos e congelada a -70°C até o processamento das amostras para a extração do DNA.

4.5 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

O material dos tecidos de cada um dos animais formava um grupo de camundongos. Cada grupo foi constituído por cinco camundongos identificados individualmente e alojados na mesma caixa. Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0 a 1,2 mL do “pool” de tecidos digeridos e após a inoculação os animais eram observados diariamente.

Os camundongos inoculados que vieram a óbito foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* no cérebro e nos pulmões. Os animais que sobreviveram até seis semanas pós-inoculação (PI) foram examinados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997). Para isso, a colheita do sangue foi realizada pelo plexo venoso mandibular após os camundongos serem contidos fisicamente.

Os camundongos sobreviventes foram mantidos no ensaio por até dois meses P.I, quando então foram submetidos à eutanásia e examinados para a presença de cistos teciduais de *T. gondii* no cérebro.

Foram colhidos cérebro e/ou pulmões de todos os camundongos examinados. Os órgãos foram macerados e homogenizados em 1,5 mL de solução salina e, então, armazenados separadamente em tubos e congelados a -70° C até o processamento das amostras para a extração do DNA.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA de *T. gondii* foi extraído dos tecidos dos camundongos infectados e do “pool” de tecidos digeridos provenientes dos animais selvagens (amostra primária) através de um kit de extração comercial. Após o descongelamento das amostras, uma alíquota de 300 µL foi separada. As amostras foram lavadas três a quatro vezes com tampão TE (q.s.p. 1.000 µL), pH 8,0 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), centrifugando-se a 15.000g por 5 minutos. O kit de extração utilizado foi o Wizard® DNA Clean-Up System (Cat. A7280 – Promega, Madison, USA) .

4.6.1 Lise dos homogenados

Cerca de 250 µL do homogenado dos tecidos foi acondicionado em um microtubo de 1,5 mL e acrescido de 700 µL da solução de lise adicionada de 12,5 µL de Proteinase K. A solução foi passada no Vortex e incubada *overnight* a 37°C no termobloco programado para agitar as amostras por 15 segundos a cada 15 minutos durante toda a noite. O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante cinco minutos. Uma alíquota de 300 µL do sobrenadante foi transferida para um novo microtubo para a realização dos demais passos da extração de DNA.

4.6.2 Extração do DNA

O lisado foi colocado a 70°C e adicionado de 1 mL de resina (kit), em seguida, agitado para homogeneizar a solução. O lisado adicionado da resina foi transferido para uma seringa acoplada à coluna (kit) e bombeado através da coluna. Em seguida, a coluna foi transferida para um microtubo e juntamente com o precipitado contido nela foram lavados com 2 mL de isopropanol a 80% e centrifugados a 12000

rpm por um minuto. A coluna foi novamente transferida para um novo microtubo e foi acrescido 50 µL de TE a 70°C. A coluna foi deixada em repouso, e então, novamente centrifugada a 12000 rpm por 30 segundos. O filtrado foi transferido para um novo microtubo devidamente identificado e foi armazenado a -20°C até o momento da realização da genotipagem.

4.7 PCR/RFLP 18s rRNA PARA TRIAGEM DAS AMOSTRAS

Para a detecção e triagem de *T. gondii* nas amostras primárias de tecidos dos animais selvagens foi realizado uma PCR/RFLP do gene 18s do RNA ribossomal de acordo com a conduta empregada na rotina dos laboratórios do Departamento de Microbiologia da Universidade do Tennessee. O protocolo da PCR/RFLP 18S rRNA é capaz de detectar e diferenciar *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi* e *Sarcocystis neurona*, por meio de digestões enzimáticas.

4.7.1 PCR e nested-PCR

As sequências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas por multiplex PCR usando 25µM dos primers externos, Tg18s48F (5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC3') e Tg18s359R (5'GTTACCCGTCCTGACCAC3'), seguido de nested-PCR, utilizando 50 µM dos primers internos, Tg18s58F (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3') e Tg18s348R (5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3') segundo da Silva et al. (2009).

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação em 25µL: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 200µM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,3µM de cada primer, 2mM de MgCl₂, 0,75 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1,5µL de DNA extraído. Na nested-PCR foi utilizada a mesma mistura e 1,5 µL da amostra amplificada. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura estéril.

A mistura de reação da PCR foi submetida a uma desnaturação inicial (95°C 4'), seguida de 25 ciclos de desnaturação (94°C 30"), hibridização (55°C 30") e extensão (72°C 1.5'). A mistura de reação da nested-PCR foi submetida a uma

desnaturação inicial (95°C 4'), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C 30"), hibridização (60°C 1') e extensão 72°C 2').

4.7.2 Digestão enzimática

A fim de investigar a espécie de parasito encontrada em cada amostra, 3µL de cada produto de nested-PCR foram misturados em 17µL de reação de digestão contendo tampão NE (1x), 0,1mg/ml de BSA, e uma unidade de cada enzima de restrição, *Ddel*, *Hpy188III* e *Mspl*. As amostras foram incubadas a 37°C durante 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 3,0%, contendo 0,3µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA,USA).

4.8 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii*

4.8.1 Marcadores

Foram utilizados 12 marcadores capazes de distinguir, sem ambigüidade, as três linhagens clonais (tipo I, tipo II e III) após a amplificação do DNA alvo e tratamento com uma ou duas enzimas de restrição (Su, 2006). No quadro 2, podem ser visualizadas as informações referentes aos marcadores que foram utilizados, localização, oligonucleotídeos iniciadores (primers), tamanho dos produtos obtidos e enzimas de restrição.

4.8.2 PCR e nested-PCR

As seqüências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas por multiplex PCR usando primers externos para todos os marcadores, seguido de nested-PCR para os marcadores individualmente.

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação em 25 μ L: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 200 μ M de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,3 μ M de cada primer, 2mM de MgCl₂, 0,75 unidades de *Taq* DNA polimerase e 1,5 μ L de DNA extraído. Na nested-PCR foi utilizada a mesma mistura e 1,5 μ L da amostra amplificada. A genotipagem dos controles positivos e das amostras de referência utilizados em todas as corridas de PCR pode ser visualizada no Quadro 3. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura estéril.

A mistura de reação da PCR foi submetida a uma desnaturação inicial (95°C 4'), seguida de 25 ciclos de desnaturação (94°C 30"), hibridização (55°C 30") e extensão (72°C 1.5'). A mistura de reação da nested-PCR foi submetida a uma desnaturação inicial (95°C 4'), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C 30"), hibridização (60°C 1') e extensão 72°C 2').

4.8.3 RFLP

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3 μ L de cada produto de nested-PCR foram misturados em 17 μ L de reação de digestão contendo tampão NE (1x), 0,1mg/ml de BSA, e uma unidade de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima. Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,0-3,0%, contendo 0,3 μ g de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA,USA).

Quadro 2 - Informações referentes aos marcadores genéticos e às endonucleases utilizadas na PCR/RFLP

(continua)

Marcador	Nº cromossomo	PCR primers	Tamanho (bp)	Enzimas de Restrição	Digestão enzimática e eletroforese	Referência
c22-8	1b	c22-8F:TCTCTCTACGTG-GACGCC c22-8R:AGGTGCTTG-GATATTCGC	521	<i>BsmAI</i> , <i>MbolI</i>	NEB2, BSA, 37°C 30 min 55°C 30 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
c29-2	III	c29-2F:AGTTCTGCA-GAGTGTCTGC c29-2R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	<i>HpyCH4IV</i> , <i>RsaI</i>	NEB1, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
L358	V	L358-F2:AGGAGGCG-TAGCGCAAGT L358-R2:CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	<i>HaeIII</i> , <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
PK1	VI	PK1-F:CGCAAAGGGAGA-CAATCAGT PK1-R:TCATCGCT-GAATCTCATTGC	903	<i>AvaI</i> , <i>RsaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
SAG1	VIII	SAG1-F:GTTCTAACCACGCACCCTG AG SAG1-R:AAGAGTGGGAGGCTCTGTG A	390	<i>Sau96I</i> , <i>HaeII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	GrlgG et al. (2001)
5'3' SAG2	VIII	SAG2-F:TCTTGTCTCCGAAGTGACT CC SAG2-R:TCAAAGCGTGCATTATCGC	222	<i>HhaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)

(conclusão)

alt.	VIII	SAG2Fa:ACCCATCTGCGAA- GAAAACG SAG2-Ra:ATTTC- GACCAGCGGGAGCAC	546	<i>Hinf</i> I, <i>Taq</i> I	NEB3, BSA, 37°C 30 min, 65°C 30 min 2.5% gel	Lehmann et al. (2000) Su et al. (2006)
BTUB	IX	SAG2-Fa:ACCCATCTGCGAA- GAAAACG SAG2-Ra:ATTTC- GACCAGCGGGAGCAC	411	<i>Bsi</i> CI, <i>Taq</i> I	NEB4, BSA, 60°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
GRA6	X	GRA6-F1:TTTCCGAG- CAGGTGACCT GRA6- R1x:TCGCCGAAGAGTTGA- CATAG	344	<i>Mse</i> I	NEB2, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Fazaeli et al. (2000) Su et al. (2006)
SAG3	XII	P43S1:CAACTCTCAC- CATTCCACCC-3 P43AS1:GCGCGTTGTTAGA- CAAGACA	311	<i>Nci</i> I	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	GrlgG et al. (2001)
Apico	Plastídeo	P43S1:CAACTCTCAC- CATTCCACCC-3 P43AS1:GCGCGTTGTTAGA- CAAGACA	640	<i>Afl</i> II, <i>Dde</i> I	NEB2, BSA, 37°C 60 min 3% gel	Su et al. (2006)
CS3	VIIa	CS3- F:GTGTATCTCCGAGGGGGTC T CS3- R:TGTGACTTCTTCGCATCGA C	557	<i>Mbo</i> I, <i>Nla</i> III	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2.5% gel	Khan et al. (2005)

^a Número do cromossomo

Quadro 3 - Amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controle positivo da reação de PCR/RFLP

Marcadores genéticos												
Genótipos de referencia	SAG1*	5'3'SAG2 [†]	Alt. SAG2 [§]	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO	CS3
RH88 (tipo I)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
PTG (tipo II)	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
CTG (tipo III)	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
TgCgCa1 (Cougar)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II

*No locus SAG1 Não é possível distinguir entre os tipos II e III

[†]Marcador SAG2 baseado na terminação 5' e 3' do gene (HOWE et al., 1997)

[§]Novo marcador SAG2 baseado na terminação 5' da sequência do gene (SU et al., 2006)

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tempo médio de sobrevivência dos camundongos infectados no bioensaio foi comparado com a ocorrência dos genótipos I ou II no marcador CS3 utilizando-se o teste T de student. Foi utilizado o programa estatístico MINITABTM (MINITAB INC.) e considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Durante o período de coleta, de agosto de 2009 a março de 2011, foi possível obter material biológico de 252 animais selvagens, tanto aves quanto mamíferos, de vida livre e de cativeiro de diferentes localidades do Brasil. A localização geográfica dos pontos de obtenção das amostras está ilustrada na figura 2.

Figura 2 - Mapa com as localidades de origem das amostras dos animais selvagens do estudo entre os anos de 2009 a 2011

Do total de amostras recebidas foi possível realizar a sorologia de 54 animais e o bioensaio em camundongos de 226 animais.

5.1 SOROLOGIA DOS ANIMAIS SELVAGENS

A maioria das amostras analisadas, 81,48% (n=44) eram de animais de vida livre e 18,52% (n=10) eram de animais de cativeiro. Foram analisadas 27 amostras provenientes de aves, sendo 25 (92,59%) de vida livre e duas (7,41%) de cativeiro e 27 amostras de mamíferos, sendo 21 (77,77%) amostras oriundas de animais de vida livre e seis (22,23%) de cativeiro.

Dos 54 soros testados, 18 (33,33%) foram positivos para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* pelo MAT (≥ 25).

Cinco (18,52%) das 27 aves examinadas foram soropositivas e todas eram exemplares de vida livre; enquanto que no caso dos mamíferos, 13 (48,15%) dos 27 animais foram positivos e destes, 11 (84,61%) eram originários de vida livre e dois (15,38%) de cativeiro. Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* variaram de 25 a 800. A tabela 1 ilustra os resultados obtidos com as aves e mamíferos, respectivamente. O resultado do inquérito sorológico de todos os animais do estudo está expresso no Apêndice A.

Tabela 1 - Presença de anticorpos anti-*T. gondii* (MAT $\geq$ 25) em diferentes ordens de aves e mamíferos selvagens do Brasil

Espécie	Nº de animais examinados (positivos)		Título
	Vida livre	Cativeiro	
AVES			
Cariameforme			
Seriema (<i>Cariama cristata</i>)	1 (1)	—	100
Ciconiiforme			
Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	2 (2)	—	25, 100
Columbiforme			
Asa-branca (<i>Patagioenas picazuro</i>)	3 (1)	—	25
Strigiforme			
Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	5 (1)	—	50
MAMÍFEROS			
Carnivora			
Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	3 (2)	—	25, 400
Raposa-do-campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	1 (1)	—	200
Edentata			
Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	2 (1)	—	400
Tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	2 (2)	—	100, 800
Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	1 (1)	—	800
Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	1 (1)	—	25
Cervidae			
Cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>)	—	1 (1)	50
Veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i>)	3 (2)	—	25, 100
Marsupialia			
Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	3 (1)	—	50
Primates			
Macaco-prego (<i>Cebus apella</i>)	—	1 (1)	25

5.2 ISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS SELVAGENS

Foram realizados 226 bioensaios em camundongos dentre as 251 amostras de aves e mamíferos selvagens coletadas em diversas localidades do Brasil (Tabela

2 e Figura 3). Deste total, 62% (n=139) eram provenientes de mamíferos e 38% (n=87) de aves.

Dos 226 bioensaios realizados foi possível isolar *T. gondii* em 18 (7,96%) amostras, sendo 16 (88,88%) amostras de mamíferos e duas (11,12%) de aves (Figura 4). De modo geral, os isolados apresentaram um perfil de alta virulência para os camundongos infectados. Dos 90 camundongos inoculados, 72 (80%) foram infectados por *T. gondii*.

Tabela 2 - Procedência dos animais, nº de animais que tiveram as amostras analisadas pelo bioensaio em camundongos e número (%) de isolados obtidos

Procedência	Sigla	Bioensaios realizados	Nº de isolados obtidos	% de isolados
Acre				
Assis Brasil	A	4	0	0
Mato Grosso				
Cáceres	SM	0	0	0
Minas Gerais				
Uberlândia	U	27	2	7,4
Pará				
Santarém	S	60	10	16,78
Paraná				
Adrianópolis (Vale do Ribeira)	VRR	3	0	0
Pernambuco				
Fernando de Noronha	FN	5	0	0
Recife	R	13	2	15,38
São Paulo				
Jaboticabal	J	94	3	3,19
Peruíbe	P	2	0	0
São José do Rio Preto	SJ	1	0	0
São Paulo	D	17	1	5,88
Total		226	18	7,96

Os óbitos dos camundongos ocorreram do 7º ao 40º dia pós-infecção (DPI) com a maioria das mortes se concentrando entre o 11º e o 18º DPI. Dos 72 camundongos que se infectaram, 68 vieram à óbito em decorrência da infecção por *T. gondii*, representando 75,56% dos camundongos inoculados e 94,44% dos camundongos infectados. Os dados do bioensaio em camundongos estão expressos na Tabela 3. Entre todos os 18 isolados obtidos, apenas dois não foram letais para 100% dos camundongos infectados e somente um deles não foi capaz de causar óbito em nenhum dos camundongos infectados.

Figura 3 - Mapa com as localidades de origem dos isolados de *T. gondii* (número de isolados por localidade). A*: as amostras obtidas em Jaboticabal eram originárias de Araraquara, Jaborandi e Jaboticabal

Dentre as aves, os isolados do pica-pau-de-banda-branca (D1) e o da coruja-buraqueira (U33) foram letais para 100% e 50% dos camundongos infectados,

respectivamente. O isolado da coruja obteve, entre todos os isolados, o óbito de camundongos mais precoce, ocorrido no 7º DPI. No isolado do pica-pau o período de mortalidade dos camundongos variou de 22 a 24 DPI.

Figura 4 - Proporção de bioensaio em camundongos realizados entre mamíferos e aves

Dos 16 isolados de mamíferos obtidos, apenas um (6,25%), o isolado de um tatu-peba (R3) não foi letal para nenhum dos camundongos infectados. Os 15 isolados restantes foram letais para 100% dos camundongos infectados e os óbitos ocorreram entre o 11º e o 34º DPI.

Dezessete (94,45%) dos 18 isolados obtidos foram provenientes de animais de vida livre. Os dois isolados de aves (D1 e U33) e 15 dos 16 isolados de mamíferos (93,75%) foram obtidos de animais de vida livre (Figura 5). Apenas uma

amostra, o isolado do gato-do-mato-pequeno (R9), foi originária um de animal cativo (Tabela 3).

Toxoplasma gondii foi isolado em 2,3% (n=2) das 87 aves e em 11,51% (n=16) dos 139 mamíferos submetidos ao bioensaio em camundongos.

Figura 5 - Proporção de animais de vida livre ou cativo entre os isolados obtidos.

Tabela 3 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens por meio de bioensaio em camundongos

(continua)

Procedência	ID	Espécie	Origem	Título (MAT)	Bioensaio em camundongos ^s		
					Nº óbitos / Nº infectados	% óbitos	Sobrevida (DPI)
Minas Gerais							
Uberlândia	U16	Tatu-peba (<i>Euphractus sexcincticus</i>)	VL	25	5/5 ^T	100	15,15, 17, 17, 30
	U33	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	VL	neg	1/2	50	7
Pará							
Santarém	S22	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	VL	NR	5/5	100	14, 15, 16, 16, 16
	S28	Mucura (<i>Didelphis marsupialis</i>)	VL	NR	4/4	100	11, 12, 12, 18
	S31	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	VL	NR	5/5	100	13, 14, 14, 14, 29
	S33	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	VL	NR	5/5	100	11, 11, 12, 13, 13
	S37	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	VL	NR	4/4	100	14, 17, 21, 22
	S43	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	VL	NR	5/5	100	14, 15, 16, 16, 17

							(conclusão)
Santarém	S44	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	VL	NR	3/3	100	15, 15, 34
	S47	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	VL	NR	4/4	100	13, 14, 16, 16
	S59	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	VL	NR	5/5	100	10, 11, 11, 11, 13
	S60	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	VL	NR	5/5	100	12, 12, 12, 18, 18
Pernambuco							
Recife	R3	Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	VL	NR	0/3*	0	—
	R9	Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	C	NR	5/5 [†]	100	15, 15, 15, 18, 23
São Paulo							
Araraquara	J83	Raposa-do-campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	VL	200	2/2	100	13, 18
Jaborandi	J8	Lobo-guará (<i>Chrysocyon bracyurus</i>)	VL	400	3/3	100	23, 24, 28
Jaboticabal	J15	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	VL	400	3/3 [†]	100	17, 18, 18
São Paulo	D1	Pica-pau-da-banda-branca (<i>Dryocopus lineatus</i>)	VL	NR	4/4 [†]	100	22, 23, 23, 24

ID = Identificação da amostra; NR = sorologia não realizada; neg = negativo; § Cinco camundongos inoculados por grupo; [†] Em um ou mais dos camundongos mortos não foi possível visualizar *T. gondii*; * Os camundongos foram soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*; MAT – Teste de Aglutinação Modificado; DPI = Dias Pós-Infecção

5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Toxoplasma gondii* POR PCR/RFLP

A caracterização genotípica de *T. gondii* pela PCR/RFLP foi realizada nos 18 isolados de *T. gondii* obtidos dos animais selvagens pelo bioensaio em camundongos e em 28 amostras primárias obtidas à partir da PCR de triagem (foram selecionadas para a genotipagem as amostras positivas para *T. gondii* que possuíam um padrão de banda positiva forte e clara). Por meio da PCR/RFLP, foi possível a caracterização genotípica completa, isto é, a análise dos 12 marcadores, de 22 (47,82%) amostras de diversas localidades do Brasil sendo 15 (68,18%) de isolados e sete (31,82%) de amostras primárias (Figuras 6 e 7). As amostras positivas para *T. gondii* na triagem estão descritas no Apêndice B.

Figura 6 - Proporção de genótipos de *T. gondii* obtidos completamente dentre o total analisado provenientes de isolados em camundongos e de amostras primárias

Figura 7 - Mapa com as localidades de origem (número de genótipos) das amostras de *T. gondii* que tiveram o genótipo definido pelos 12 marcadores genéticos. *A: as amostras obtidas em Jaboticabal eram originárias de Araraquara, Jaborandi e Jaboticabal

Em três isolados, todos de animais de vida livre, uma mucura oriunda de Santarém (S28), uma coruja-buraqueira de Uberlândia (U33) e um tatu-peba do Recife (R3), somente foi possível a obtenção de genótipos parciais, impossibilitando a caracterização genotípica destas amostras. Em relação as amostras primárias, em 15 das 28 foi possível somente a obtenção do genótipo parcial (Apêndice C) e em seis não foi possível nenhuma análise.

A genotipagem das 22 amostras evidenciou a presença de 17 genótipos distintos, dos quais 13 nunca foram descritos anteriormente. Além destes, foram obtidos mais um da linhagem clonal BrI, dois da linhagem clonal BrII, uma amostra proveniente de São Paulo apresentou um genótipo já identificado em capivaras (TgCpBr25) do mesmo estado e duas amostras provenientes de Fernando de Noronha apresentaram um genótipo já identificado em galinhas da mesma região (#59 – TgCkBr210). Dos 13 novos genótipos observados, apenas dois apresentaram mais de uma amostra com o mesmo perfil (NOVO 1

com dois isolados e NOVO 3 com três isolados). Todos os novos isolados com perfil semelhante tiveram foram obtidos de animais com a mesma procedência.

O resultado da caracterização genotípica dos isolados e das amostras primárias de animais selvagens está expresso na Tabela 4.

Das 22 amostras genotipadas, quatro (18,18%) foram de aves e 18 (81,82%) foram de mamíferos. Deste total, 19 (86,36%) animais eram de vida livre (três aves e 16 mamíferos) e três (13,64%) animais eram oriundos de cativeiro, uma ave e dois mamíferos, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Origem das amostras em que foi possível obter o genótipo completo

Tabela 4 - Genótipos multilocus dos isolados e das amostras primárias de animais selvagens do Brasil obtidos pela PCR/RFLP e a identidade com outros isolados do Brasil (continua)

ID ¹ AMOSTRA	Genótipo pela PCR-RFLP												Espécie	Localização	Origem ²	Ref. ³
	SAG1	5' + 3' SAG2	NEW SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3				
S59	I	I	II	I	III	II	II	III	I	III	I	II	Tatu galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 1
S60													Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Santarém - AM	VL	
S43	I	I	II	I	III	III	II	I	III	u-1	III	II	Queixada (<i>Tayassui pecari</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 2
S47	I	I	II	I	III	III	II	I	III	III	III	I	Tatu galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 3
S33													Tatu galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - AM	VL	
S57#													Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	Santarém - AM	VL	
S31	I	I	II	I	III	III	II	I	III	III	I	I	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 4
R9	I	III	III	III	I	III	u-1	I	I	I		I	Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	Recife - PE	C	NOVO 5
J83	I	III	III	III	III	III	I	III	I	u-1	III	u-1	Raposinha do campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	Araraquara - SP	VL	NOVO 6
S14#	I	I	II	I	III	III	I	I	III	III	I	II	Tatu galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 7
J92#	I	I	I	III	I	II	I	III	I	II	III	III	Perdiz (<i>Rynchotus rufescens</i>)	Jaboticabal - SP	C	NOVO 8
S44	I	I	II	I	III	III	II	III	III	u-2	I	u-3	Queixada (<i>Tayassui pecari</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 9
SM114#	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	III	u-1	Tatu peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	Cáceres - MT	VL	NOVO 10

																(conclusão)
S22	I	I	II	I	III	III	II	I	I	u-2	I	I	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO 11
S37	I	I	II	I	III	III	III	I	III	III	III	II	Queixada (<i>Tayassui pecari</i>)	Santarém - AM	VL	NOVO12
J15	u-1	I	II	III	III	III	III	I	I	III	III	II	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Jaboticabal - SP	VL	NOVO 13
D1	u-1	I	II	III	III	III	III	I	I	u-1	I	II	Pica-pau-de-banda-branca (<i>Dryocopus lineatus</i>)	São Paulo - SP	VL	TgCpBr25
U16	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I	Tatu peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	Uberlândia - MG	VL	BrI
J8-3	I	I	II	III	III	III	I	III	I		III	I	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Jaborandi - SP	VL	BrII
D7#													Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	São Paulo - SP	C	
FN5#	I	I	I	III	II	II	I	III	III	II	III	III	Garça boiadeira (<i>Pool - 5 aves</i>) (<i>Bubulcus ibis</i>)	Fernando de Noronha - PE	VL	(#59) TgCkBr210
FN6#													Garça boiadeira (<i>Pool - 5 aves</i>) (<i>Bubulcus ibis</i>)	Fernando de Noronha - PE	VL	

¹ID AMOSTRA: Identidade da amostra, ²ORIGEM: VL = Vida livre / C = Cativo, ³Ref.: Referência, #Genótipos obtidos de amostras primária

A mortalidade e o período de sobrevida dos camundongos infectados foi comparada com os alelos do marcador CS3 nos 15 isolados com o genótipo completo (Tabela 5). Sete isolados apresentaram o alelo tipo I, seis apresentaram o alelo tipo II e os alelos u-1 e u-3 foram encontrados em um isolado cada. Todos os isolados, independentemente do alelo identificado no marcador CS3, apresentaram 100% de mortalidade entre os camundongos infectados e o período médio de sobrevida não variou de forma significativa ($p=0,86$).

Tabela 5 - Taxa de mortalidade e sobrevida média dos camundongos infectados com os isolados de *T. gondii* dos animais selvagens, medidos pelo marcador CS3

Alelos do marcador CS3	I	II	u-1	u-3
Nº de isolados	7	6	1	1
Nº da camundongos infectados	32	27	2	3
Nº de camundongos mortos 30 DPI	32	27	2	3
Mortalidade acumulada (%)	100	100	100	100
Sobrevida média dos camundongos (dias)	17,13	16,72	15,5	21,33

O alelo u-2 não foi detectado no locus CS3 em nenhuma das amostras analisadas e o alelo tipo III somente foi detectado, no mesmo locus, em amostras primárias e não em isolados.

6 DISCUSSÃO

A constante expansão das populações humanas e a ocupação desenfreada de novos territórios diminui sobremaneira as áreas destinadas à vida selvagem causando um grande desequilíbrio que pode levar, e tem levado, várias espécies ao risco de extinção, além de selecionar involuntariamente aquelas mais adaptáveis à presença humana, as sinantrópicas, fazendo com que várias espécies selvagens se tornem pragas urbanas. Outra consequência dessa diminuição de habitat provocada pelo homem é o maior contato entre os animais selvagens, os animais domésticos e o homem. Este contato mais íntimo faz com que haja um maior intercâmbio entre as diferentes linhagens de parasitos circulantes em vida selvagem e em meio urbano, entre eles o *T. gondii*, podendo gerar graves quadros clínicos de doenças em humanos.

Após o período de 19 meses de coleta foi possível a obtenção de material biológico de 252 animais selvagens. Deste total, 226 amostras foram submetidas ao bioensayo em camundongos e em 54 amostras (27 aves e 27 mamíferos) foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* no soro. Das 54 amostras analisadas sorologicamente, 18 (33,33%) foram positivas corroborando com os achados de Minervino et al. (2010), em um inquérito sorológico em animais selvagens de zoológicos de diversas localidades do Nordeste do Brasil, com o encontro de 30,04% de positividade. No mesmo estudo, anticorpos anti-*T. gondii* não foram detectados nas aves amostradas, somente nos mamíferos. No presente estudo a ocorrência de anticorpos nos mamíferos examinados foi superior a 48,15% porém se avaliar-se a ocorrência de anticorpos somente dos animais de cativeiro esse valor muda para 22,22%.

Desde o final dos anos 70 (SOGORB et al., 1977), estudos de soroprevalência de *T. gondii* em animais selvagens de vida livre e cativeiro no Brasil têm mostrado que o parasito é capaz de infectar uma vasta gama de hospedeiros selvagens e valores distintos de ocorrência entre animais de vida livre e de cativeiro vêm sendo observados. A ocorrência foi desde 12% em veados-campeiro provenientes do Parque Nacional de Emas e 27% em cervos-do-pantanal do pantanal Matogrossense (FERREIRA et al., 1997) até 50,5% e 63,4%, respectivamente em canídeos e felídeos selvagens de zoológicos dos estados de São Paulo, Mato Grosso e Distrito Federal (ANDRE et al., 2010), ou mesmo, 74,6% de soropositividade em lobos guará de cativeiro das regiões Sudeste e Centroeste do Brasil (VITALIANO et al., 2004).

Vitaliano et al. (2004) observaram que a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* variou de 0 a 100% nos sete locais de coleta, sendo zero em uma área de reserva ambiental estudada a até 100% em alguns dos zoológicos avaliados. Os animais da reserva viviam em uma condição de semi-confinamento, mais próxima das condições encontradas em vida livre, enquanto que os animais dos seis zoológicos restantes viviam confinados em recintos fechados, indicando que o cativeiro favorece a infecção dos animais pelo *T. gondii*. No presente estudo, a maioria das amostras analisadas (81,48%) são provenientes de animais de vida livre ficando difícil a comparação entre a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* nos dois ambientes analisados, entretanto 100% das aves e 84,61% dos mamíferos soropositivos eram procedentes de vida livre, indicando que o parasito está presente em vários dos ecossistemas brasileiros, infectando os animais que lá habitam.

No presente trabalho, a presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi detectada em cinco (18,52%) das 27 aves examinadas sendo duas curicacas, uma pomba asa-branca, uma seriema e uma coruja-buraqueira. Este é o primeiro relato da detecção de anticorpos contra *T. gondii* nestas espécies de aves.

Entre as aves, os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* variaram de 25 a 100, títulos já descritos em outras aves como sumarizado por Dubey (2002), em uma vasta revisão de toxoplasmose em aves selvagens. A ocorrência do parasito nas aves (18,52%) foi notadamente mais baixa que nos mamíferos (48,15%). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que em algumas aves já se sabe que existe uma baixa correlação entre resultados sorológicos positivos e infecção, e portanto, a prevalência real de *T. gondii* é provavelmente subestimada (FRENKEL, 1981). Miller et al. (1972) observaram que algumas espécies de aves apresentam baixos títulos ou até mesmo falham em produzir anticorpos anti-*T. gondii*. Testes sorológicos para a detecção de *T. gondii* aplicados em aves podem ser relativamente insensíveis contrastando com o que ocorre nos mamíferos (FRENKEL, 1981). Reforçando esta afirmação, estudos de infecção experimental em aves selvagens (perdizes e carcarás) observaram, na cinética da produção de anticorpos, uma tendência de queda na produção dos anticorpos após a soroconversão e ao pico de produção. Tendência esta, que em alguns indivíduos, fez com que os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* passassem novamente a ser indetectáveis após pouco mais de 60 dias pós-infecção (MARTINEZ-CARRASCO et al., 2004; VITALIANO et al., 2010). Não foi possível a obtenção, pelo bioensaio em camundongos, de nenhum isolado das aves sorologicamente positivas.

Nos mamíferos, anticorpos foram detectados em 13 (48,15%) dos 27 animais amostrados, dos quais apenas dois (7,4%) eram provenientes de cativeiro. Os anticorpos foram detectados em dois lobos guará, uma raposa-do-campo, um tamanduá-mirim, dois tamanduás-bandeira, um tatu-galinha, um tatu-peba, dois

veados-catingueiro e um gambá-de-orelha-branca, todos de vida livre e em um cervo-do-pantanal e um macaco-prego de cativeiro. Este é o primeiro relato da detecção de anticorpos contra o parasito em tamanduás-mirim e tamanduás-bandeira de vida livre ou cativeiro. Nas outras espécies a presença de anticorpos contra esse coccídio já foi previamente descrita (VITALIANO et al., 2004; CURI et al., 2010; ANDRÉ et al., 2010; DE THOISY et al., 2003; DA SILVA et al., 2006; DA SILVA et al., 2008).

Os títulos de anticorpos nos mamíferos variaram de 25 a 800, atingindo níveis mais altos do que nas aves (25 a 100). Minervino et al. (2010) encontraram uma maior variação nos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, utilizando a mesma técnica aqui realizada, em animais selvagens de cativeiro no Brasil confirmando a discussão feita anteriormente que indica que animais de cativeiro parecem estar mais expostos à infecção por *T. gondii* do que os animais de vida livre. Entre os mamíferos analisados, os títulos de anticorpos variaram de 50 a 102.400.

Em um estudo de soroprevalência (n=456) de anticorpos anti-*T. gondii* em 18 espécies de animais selvagens de vida livre da Guiana Francesa, utilizando o Teste de Aglutinação Direta, foi observado uma positividade que variou de 0 a 71% nas diversas espécies de mamíferos avaliados (DE THOISY et al., 2003). Os animais positivos no inquérito sorológico em questão pertenciam às mesmas ordens de mamíferos (Carnivora, Edentata, Cervidae, Marsupialia e Primatas) que a dos animais soropositivos do presente estudo, entretanto devido a diferenças no número de animais amostrados entre as duas avaliações é difícil comparar os resultados.

A soropositividade para anticorpos contra *T. gondii* em canídeos selvagens brasileiros de cativeiro já foi relatada, inclusive nas espécies que aqui também mostraram-se positivas, utilizando diversas técnicas sorológicas (GENNARI et al., 2004; VITALIANO et al., 2004; ANDRÉ et al., 2010). Em vida livre, Curi et al. (2010) encontraram uma soropositividade de 68%, pelo MAT, em canídeos selvagens do Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. Seis de sete lobos guará avaliados foram positivos para anticorpos contra o parasito, o mesmo ocorrendo em sete de dez cachorros-do-mato. Diferentemente dos resultados aqui obtidos, Curi et al. (2010) não detectaram anticorpos contra *T. gondii* em nenhuma das raposas-do-campo amostradas e neste estudo, o único espécime avaliado, do município de Araraquara, SP, apresentou sorologia positiva para *T. gondii*.

O presente estudo detectou anticorpos anti-*T. gondii* em um tatu-galinha e em um tatu-peba, ambos de vida livre com títulos de 800 e 25, respectivamente. Da Silva et al. (2006), utilizando o MAT, encontraram anticorpos contra o parasito em dois tatus-galinha e em um tatu-peba de vida livre, os títulos apresentados foram de 512 para os dois tatus-galinha e de 236 para o tatu-peba. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados, também pelo MAT, em quatro tatus-galinha de vida livre

capturados na região noroeste do estado de São Paulo e três dos animais apresentaram títulos de 1.024 e um apresentou título de 256 (DA SILVA et al., 2008). Vários trabalhos mostraram a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* no soro de diferentes espécies de tatu (SCHENK et al., 1976; RAMIREZ et al., 1984; SALATA et al., 1985; DE THOISY et al., 2003) corroborando os achados do presente estudo.

Neste estudo, em cervídeos, anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em três animais, em um cervo-do-pantanal de cativeiro e em dois veados-catingueiro de vida livre com os respectivos títulos de 50, 25 e 100. Ferreira et al. (1997), utilizando diferentes testes sorológicos, detectaram anticorpos anti-*T. gondii* em cervos-do-pantanal e em veados-campeiro provenientes do pantanal e do Parque Nacional de Emas, respectivamente. Em cativeiro, Minervino et al. (2010) detectaram, pelo MAT, anticorpos contra o parasito em quatro veados-mateiro (*Mazama americana*) com títulos de anticorpos mais altos do que os encontrados no presente estudo. Na Guiana Francesa, um estudo de soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em diversas espécies de mamíferos selvagens de vida livre detectou uma soropositividade de 40% em 15 cervídeos do gênero *Mazama* examinados (DE THOISY et al., 2003), resultados que indicam que nesta espécie *T. gondii* apresenta uma prevalência que pode ser considerada alta na América do Sul.

Existem poucos estudos a cerca da infecção por *T. gondii* em marsupiais sul-americanos. Fornazari et al. (2011) encontraram, pelo MAT, em gambás-de-orelha-branca capturados na cidade de Botucatu, SP, uma soropositividade de 5,5% (n=4) entre 72 animais analisados com títulos variando de 25 a 100. Título semelhante foi encontrado no gambá-de-orelha-branca do presente estudo (título de 50). Pena et al. (2011) detectaram em um gambá-de-orelha-preta anticorpos anti-*T. gondii*, pelo MAT, com título de 100. Na Guiana Francesa, 20% dos 15 gambás-de-orelha-branca avaliados também estavam positivos (DE THOISY et al., 2003).

Primatas do Novo Mundo, normalmente são susceptíveis à infecção por *T. gondii* (EPIPHANIO et al., 2000). Minervino et al. (2010) encontraram macacos-prego de cativeiro soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* pelo MAT alcançando títulos de até 52.600, diferindo do presente estudo que encontrou no macaco-prego soropositivo o título de 25. Este era um animal de cativeiro. Em vida livre, Garcia et al. (2005) encontraram 30,2% de positividade em macacos do gênero *Cebus* do estado do Paraná com títulos de 16, valores mais próximos ao título encontrado no macaco-prego do presente estudo.

Dos 226 bioensaios em camundongo realizados, foi possível a obtenção de 18 (7,96%) isolados de *T. gondii* proveniente dos animais selvagens amostrados. Foram isoladas duas (11,12%) amostras de aves e 16 (88,88%) amostras de mamíferos selvagens. Entre as aves, todas eram provenientes de vida livre e entre

os mamíferos, apenas um gato-do-mato-pequeno, do zoológico do Recife era originário de cativeiro.

O isolamento de amostras de animais de vida livre fornece informações sobre a epidemiologia do *T. gondii* no meio selvagem, sendo estas informações muito valiosas e raras. Existem pouquíssimos dados disponíveis em literatura sobre o isolamento de *T. gondii* em animais selvagens, principalmente, em animais sul-americanos. O presente estudo representa a maior coleção de isolados de *T. gondii* de animais selvagens da América do Sul e relata pela primeira vez o isolamento de *T. gondii* nessas espécies.

Em geral, os isolados obtidos apresentaram um perfil de alta virulência para os camundongos infectados com 72 dos 90 (80%) camundongos inoculados se infectando por *T. gondii* e destes, 94,44% (n=68) vieram à óbito devido a infecção pelo parasito, confirmando a alta patogenicidade dos isolados brasileiros observada em estudos com diferentes espécies de animais domésticos (DUBEY et al., 2002; BRANDÃO et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2006; DUBEY et al., 2006; DUBEY et al., 2007a; DUBEY et al., 2007b; PENA et al 2008). Dos 18 isolados, somente dois, um de tatu-peba e o da coruja-buraqueira, não apresentaram 100% de mortalidade dos camundongos infectados. Estes isolados apresentaram taxas de mortalidade em camundongos de zero e 50%, respectivamente.

Um estudo de isolamento de *T. gondii* de capivaras de vida livre e cativeiro de diferentes regiões do estado de São Paulo, de 64 animais avaliados, 36 isolados foram obtidos, dos quais 17 foram letais para 100% dos camundongos infectados, 11 causaram mortalidade em 25-90% dos camundongos infectados e oito não foram patogênicos para os camundongos (YAI et al., 2008). Pena et al. (2011) isolaram *T. gondii* de um bugio e de um gato-mourisco de cativeiro e de um gambá-de-orelha-preta de vida livre, todos originários do Brasil. O isolado do bugio não causou morte em camundongos e os isolados do gato-mourisco e do gambá-de-orelha-preta foram letais para todos os camundongos infectados. A letalidade observada nos ensaios biológicos em camundongo vem se mostrando tão elevada nos animais selvagens quanto já amplamente observada nos animais domésticos dos estudos brasileiros.

Em contraste, a maioria dos isolados de *T. gondii* de animais provenientes da Europa, Ásia e América do Norte não são patogênicos para camundongos (DUBEY et al., 2007c). Nos EUA, *T. gondii* foi isolado de 30 animais selvagens de diversas espécies (*Buteo jamaicensis*, *Canis latrans*, *Canis lupus*, *Didelphis virginiana*, *Enhydra lutris*, *Haliaeetus leucophthalmus*, *Macropus eugenii*, *Neotoma microtus*, *Tursiops truncatus*, *Ursus arctos horribilis*, *Vulpes argopus*, *Vulpes vulpes*) de vida livre e de cativeiro. Dentre todos os isolados, apenas um de lobo (*Canis lupus*) foi patogênico para os camundongos (DUBEY et al., 2011). Richomme et al. (2009)

isolaram *T. gondii* de javalis de vida livre da França, obtiveram 21 isolados e nenhum deles foi letal para os camundongos inoculados.

Em aves, o isolamento em camundongos pode ser uma boa ferramenta para a detecção de *T. gondii*, pois o soro das aves pode não reagir nos testes sorológicos da mesma forma que o soro de mamíferos, sendo mais comum os casos de falso negativos (Frenkel, 1981). Lindsay et al. (1993) isolaram, por meio do bioensaio em camundongos, *T. gondii* de 27 aves de rapina de diversas espécies no estado do Alabama, EUA. Apenas três (11,1%) dos 27 isolados foram patogênicos para camundongos. No presente estudo, *T. gondii* foi isolado de um pica-pau-da-banda-branca e de uma coruja-buraqueira, ambos os isolados foram patogênicos para camundongos com taxas de mortalidade de 100 e 50%, respectivamente.

Diversos estudos de isolamento de *T. gondii* em galinhas, realizados no Brasil, corroboram os resultados sobre virulência em camundongos aqui encontrados nos isolados das aves (DUBEY et al., 2002; BRANDÃO et al., 2006; DUBEY et al., 2006; DUBEY et al., 2007a; SOARES et al., 2011). Apesar do perfil geral de alta virulência dos isolados de *T. gondii* obtidos no Brasil, em Fernando de Noronha, Dubey et al. (2010) isolaram o parasito à partir de galinhas oriundas da ilha e todos os 24 isolados não foram virulentos para camundongos, mostrando a diversidade dos isolados desta ilha em relação aos estudos feitos na área continental do país.

Em canídeos selvagens, o parasito já foi isolado em lobos, coiotes, raposas vermelhas e raposas do ártico de vida livre de diversas localidades da América do Norte (DUBEY et al., 2011). Nesse estudo de Dubey et al. (2011) parte dos bioensaios foi realizado em camundongos *knock out*, dificultando inferências sobre virulência em camundongos. No presente estudo, o parasito foi isolado de um lobo-guará e de uma raposa-do-campo, ambos de vida livre e os isolados apresentaram um perfil de alta virulência em camundongos, com 100% de mortalidade.

Em edentatas, da Silva et al. (2006) não conseguiram obter o isolamento direto de *T. gondii* em tatus-peba, porém, alguns dos camundongos inoculados com homogenados destes tatus apresentaram anticorpos contra *T. gondii* após a inoculação. No presente estudo, *T. gondii* foi isolado de três tamanduás-mirim, dois tatus-peba e três tatus-galinha, todos de vida livre. Este relato, é o primeiro em literatura do isolamento direto de *T. gondii* nas espécies de edentata em questão, tanto em vida livre quanto em cativeiro.

Em felinos selvagens brasileiros, o isolamento de *T. gondii* já foi realizado em um gato-mourisco de cativeiro, proveniente do zoológico de Recife e este isolado apresentou 100% de mortalidade em camundongos (PENA et al., 2011). No presente estudo, o isolamento de *T. gondii* em um gato-do-mato-pequeno foi obtido sendo o primeiro relato do isolamento do parasito nesta espécie de felino selvagem

brasileiro. Assim como no estudo de Pena et al. (2011), o isolado do gato-do-mato-pequeno foi letal para 100% dos camundongos infectados. *T. gondii* já foi isolado em gatos domésticos do Brasil e estes isolados, em sua maioria, também apresentaram um perfil de alta virulência para camundongos (PENA et al., 2006).

O presente estudo foi o primeiro relato do isolamento de *T. gondii* em mucuras, até então, o parasito já havia sido isolado em um gambá-de-orelha-preta capturado em Sorocaba, SP, isolado este que foi letal para o camundongo infectado (PENA et al., 2011) e em um gambá (*Didelphis virginiana*) de vida livre nos EUA (DUBEY et al., 2011). O isolado de mucura aqui obtido também foi virulento, sendo letal para 100% dos camundongos infectados.

Em roedores selvagens sul-americanos, *T. gondii* já foi isolado em capivaras de vida livre e de cativeiro (YAI et al., 2008) e os isolados apresentaram, em geral, um perfil de alta virulência em camundongos. O único isolado de roedor obtido no presente trabalho, foi de uma paca de vida livre, originária de Santarém, PA, Amazonia Legal. Assim como no estudo de Yai et al. (2008), com capivaras, o isolado da paca apresentou um perfil de alta virulência para camundongos e foi letal para todos os cinco camundongos infectados.

Pela primeira vez, *T. gondii* foi isolado em suídeos selvagens brasileiros. No presente estudo, o parasito foi isolado de três queixadas de vida livre também provenientes de Santarém, PA. Os três isolados foram letais para 100% dos camundongos infectados. Em contraste, Richomme et al. (2009) isolaram *T. gondii* de javalis (*Sus scrofa*) de vida livre na França e dos 21 isolados obtidos nenhum foi virulento para camundongos. Todos os achados do presente estudo com animais selvagens reforçam a alta letalidade dos isolados brasileiros para camundongos.

A caracterização genotípica de isolados de *T. gondii*, por métodos moleculares, tem sido realizada principalmente em amostras provenientes de animais domésticos e humanos, porém alguns estudos recentes foram feitos com amostras de animais selvagens. Na América do Norte, um vasto estudo sobre a caracterização genotípica de *T. gondii* em vida selvagem, observou a existência de uma quarta linhagem clonal (tipo 12), até o momento, exclusiva de vida selvagem e que foi predominante nas amostras avaliadas e ressaltou a baixa variabilidade genética de *T. gondii* em vida selvagem da América do Norte (DUBEY et al., 2011). Na Europa, foram realizados vários estudos de caracterização genética de *T. gondii* em diversas espécies de animais selvagens, em todos os estudos pode-se observar o predomínio absoluto da linhagem tipo II (RICHOMME et al., 2009; AUBERT et al., 2010; DE CRAEYE et al., 2011; JOKELAINEN et al., 2011).

No Brasil, existem apenas dois estudos sobre a caracterização genotípica de *T. gondii* de animais selvagens. O primeiro deles de Yai et al. (2009) que caracterizaram genotípicamente 36 isolados de capivaras de vida livre e de cativeiro

e obtiveram 16 genótipos diferentes sendo sete deles descritos pela primeira vez em literatura. As linhagens clonais do Brasil, BrI, BrII e BrIII estavam presentes entre os 36 isolados genotipados. Outro estudo realizou a caracterização genotípica de um isolado de bugio e de um isolado de gato-mourisco, ambos de cativeiro, do mesmo zoológico e de um isolado de gambá-de-orelha-preta de vida livre. O genótipo do isolado do bugio já havia sido descrito anteriormente em um caprino e em galinhas da região amostrada (Recife, PE) e os genótipos dos isolados do gato-mourisco e do gambá-de-orelha-preta nunca haviam sido relatados anteriormente (PENA et al., 2011).

O presente estudo caracterizou genotípicamente amostras de 22 animais sendo quatro aves e 18 mamíferos selvagens, em sua maioria de vida livre (n=19), de diversas localidades do Brasil. Deste total, 15 são provenientes dos bioensaios em camundongos e sete são provenientes das amostras primárias dos tecidos dos animais selvagens. Além disso, em outras 18 amostras (15 amostras primárias e três isolados obtidos pelo bioensaio – mucura, coruja-buraqueira e tatu-peba) somente foi possível a obtenção de genótipos parciais, caracterizados pela falha na detecção de um ou mais marcadores genéticos utilizados. A genotipagem das 22 amostras evidenciou a presença de 17 genótipos distintos, dos quais 13 nunca haviam sido descritos anteriormente, além desses encontrou-se uma amostra tipo BrI, duas tipo BrII e duas amostras de Fernando de Noronha que apresentaram um genótipo já identificado na região em galinhas (BrCkBr210) por Dubey et al. (2010). Estes resultados mostram uma grande variabilidade genética de *T. gondii* entre os animais amostrados e corroboram os dados obtidos nos recentes estudos em animais selvagens (YAI et al., 2009; PENA et al., 2011) e os dados de estudos realizados em humanos (CARNEIRO et al., 2011; FERREIRA et al., 2011) e em animais domésticos (DUBEY et al., 2002, 2007a,b,c; LEHMANN et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2007, PENA et al., 2008), mostrando que, no Brasil, a variabilidade genética de *T. gondii* é alta, independente da espécie de hospeiro estudada ou mesmo do ambiente onde estas vivem.

De todas as localidades estudadas, Santarém, PA foi a que forneceu a maior porcentagem de genótipos obtidos (50%) e Cáceres, MT e Uberlândia, MG foram as que forneceram as menores porcentagens (4,5%). De Adrianópolis-PR, Assis Brasil-AC, Peruíbe-SP e São José do Rio Preto-SP nenhum genótipo foi obtido.

Dos 22 genótipos obtidos, 11 são originários de Santarém, PA, que está localizado dentro da Amazonia Legal e todos são de animais de vida livre, trazendo assim, informações importantes sobre o perfil genotípico de *T. gondii* na região amazônica. Todos os 11 genótipos de Santarém apresentaram uma notada similaridade no perfil genotípico, diferindo nos alelos de um a no máximo cinco dos 12 marcadores genéticos avaliados, porém para maiores inferências a respeito da

proximidade genética entre os genótipos seria necessário a realização de estudos filogenéticos.

Ao todo, 13 genótipos inéditos foram identificados no presente estudo e apenas dois (NOVO 1 e NOVO 3) possuem mais de um isolado. O NOVO 1 foi observado no isolado de um tatu-galinha e de um tamanduá-mirim, ambos de vida livre, de Santarém e pertencentes à ordem Edentata. O genótipo NOVO 3 foi observado em dois tatus-galinha e em uma paca, todos de vida livre e também provenientes de Santarém.

O isolado de um pica-pau-de-banda-branca de vida livre de São Paulo apresentou o mesmo genótipo observado em uma capivara (TgCpBr25) também de São Paulo (YAI et al., 2009). Os genótipos Brl e Brll foram identificados respectivamente nos isolados de um tatu-peba de vida livre de Uberlândia, MG e de um lobo-guará, também de vida livre, de Jaborandi, SP. Isolados Brl e Brll já foram anteriormente encontrados em animais domésticos do mesmo estado (PENA et al., 2008), além de terem sido descritos também em animais domésticos dos estados do Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio de Janeiro e Rondônia (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008; SOARES et al., 2011) e em humanos do estado de São Paulo (FERREIRA et al., 2011).

Os dois genótipos obtidos em Fernando de Noronha eram originários de amostras primárias de aves de vida livre. Cada amostra era composta por um homogenado feito a partir de órgãos de cinco garças-boiadeira, aves originárias da África que migraram para o Brasil a mais de 100 anos se distribuindo por todo território nacional. Apesar de terem sido feitos à partir de um *pool* de amostras, nenhuma delas apresentou sinais de infecção mista e ambas apresentaram o mesmo genótipo (TgCkBr210), o qual já havia sido descrito em diversas galinhas da ilha (DUBEY et al., 2010), indicando que provavelmente estas aves adquiriram a infecção na ilha. Entretanto, por se tratar de uma espécie animal de grande mobilidade, é impossível afirmar com certeza que as garças tenham se infectado em Fernando de Noronha.

No presente estudo, houve uma correlação positiva entre a ocorrência dos alelos I e II no *locus* do marcador CS3 e a virulência em camundongos, confirmada pela taxa de 100% de mortalidade dos camundongos infectados nos isolados com os alelos I e II no marcador em questão, corroborando os achados de Pena et al. (2008) em um estudo sobre a estrutura populacional e virulência em camundongos de isolados de *T. gondii* do Brasil e indicando que este marcador parece ser útil em estudos de virulência de isolados de *T. gondii*. Pela primeira vez, foi identificado um alelo u-3 em CS3, porém devido ao número restrito de amostras não é possível relacionar a ocorrência do alelo com virulência para camundongos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir:

- *T. gondii* encontra-se bem distribuído no território nacional e é capaz de infectar uma vasta gama de aves e mamíferos selvagens provenientes de diferentes regiões brasileiras.
- Pela primeira vez na literatura foram obtidos isolados de *T. gondii* de coruja-buraqueira, gato-do-mato-pequeno, lobo-guará, mucura, paca, pica-pau-da-banda-branca, queixada, raposa-do-campo, tamanduá-bandeira, tamanduá-mirim, tatu-galinha e tatu-peba.
- Os isolados de *T. gondii* provenientes de animais selvagens do Brasil apresentam um perfil de alta virulência em camundongos.
- A variabilidade genética de *T. gondii* encontrada nos animais selvagens do Brasil é extremamente alta.
- A obtenção do genótipo de *T. gondii* à partir de amostras primárias de tecidos de animais selvagens é possível, entretanto apresenta menor eficiência quando comparada às amostras originadas de bioensaio em camundongos.
- A associação entre a ocorrência dos alelos I e II no *locus* do marcados CS3 e a virulência em camundongos foi confirmada nas amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda., 2002. 544 p.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 684–689, 2002a.
- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 27–38, 2002b.
- ANDERSON, D. C.; McCLURE, H. M. Acute Disseminated Fatal Toxoplasmosis in a Squirrel Monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 11, p. 1363-1366, 1982.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; BORTOLLI, C. P. DE; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Captive Neotropical and Exotic Wild Canids and Felids. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1007–1009, 2010.
- ASHBURN, D. History and general epidemiology. In: HO-YEN, D.O.; JOSS, A.W.L. (Ed.). **Human toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p.1-25.
- AUBERT, D.; AJZENBERG, D.; RICHOMME, C.; GILOT-FROMONT, E.; TERRIER, M. E.; DE GEVIGNEY, C.; GAME, Y.; MAILLARD, D.; GIBERT, P.; DARDÉ, M. L.; VILLENA, I. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 346-349, 2010.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55–62, 2003.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.
- BOUER, A.; WERTHER, K.; CATÃO-DIAS, J. L.; NUNES, A. L. V. Outbreak of Toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. **Folia Primatologica**, v. 70, p. 282-285, 1999.
- BRANDAO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, n. 2, p. 143-149, 2006.
- CANFIELD, P. J.; HARTLEY, W. J AND DUBEY, J. P. Lesions of toxoplasmosis in Australian marsupials. **Journal of Comparative Pathology**, v. 103, p. 159- 167, 1990.

- CARNEIRO, A. C. A. V.; ANDRADE, G. M. Q.; JANUÁRIO, J. N.; CARELLOS, E. V. M.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. M.; PINHEIRO, B. V.; COSTA, J. G. L.; VÍTOR, R. W. A. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* obtido de casos humanos de toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 2, p. 30 2011. Trabalho apresentado no XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 12., 2011, São Paulo.
- CAVALCANTE, A. C. R.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; FUX, B.; BRANDÃO, G. P.; VÍTOR, R. W. A. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 69, p. 79-82, 2007.
- CHOMEL, B. B.; CARNICIU, M. L.; KASTEN, R. W.; CASTELLI, P. M.; WORK, T. M.; JESSUP, D. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 51-59, 1994.
- CONRAD, P. A.; MILLER, M. A.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MAZET, J.; DABRITZ, H.; JESSUP, D. A.; GULLAND, F.; GRIGG, M. E. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters assentinel of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1155–1168, 2005.
- CUNNINGHAM, A. A.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 107, p. 207-219, 1992.
- CURI, N. H. A.; ARAÚJO, A. S.; CAMPOS, F. S.; LOBATO, Z. I. P.; GENNARI, S. M.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. C. R.; TALAMONI, S. A. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, p. 3513–3524, 2010.
- DA SILVA, A. V.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H. BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 81–83, 2006.
- DA SILVA, R. C.; ZETUN, C. B.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ROSA, P. S.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. infection in free-ranging armadillos. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 291–293, 2008.
- DA SILVA, R. C.; SU, C.; LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 332–336, 2009.
- DA SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; DA SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 173–177, 2011.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PERSTREAL, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiologic implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 909–912, 1992.
- DE CRAEYE, S.; SPEYBROECK, N.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COLLINETE, F.; TAVERNIER, P.; VAN GUCHT, S.; DORNY, P.; DIERICK, K. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 64-69, 2011.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M. T.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne outbreak of toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 326–329, 2006.

DE THOISY, B.; DEMAR, M.; AZNAR, C.; CARME, B. Ecologic Correlates of *Toxoplasma gondii* Exposure in Free-ranging Neotropical Mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 2, p. 456–459, 2003.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562-568, 1980.

DI GUARDO, G.; DI CESARE, A.; OTRANTO, D.; CASALONE, C.; IULINI, B.; MIGNONE, W.; TITTARELLI, C.; MELONI, S.; CASTAGNA, G.; FORSTER, F.; KENNEDY, S.; TRAVERSO, D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 31-36, 2011.

DIETZ, H. H.; HENRIKSEN, P.; BILLE-HANSEN, V.; HENRIKSEN, S.A. Toxoplasmosis in a colony of NEW World Monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 299-304, 1997.

DRESSEN, D. W. *Toxoplasma gondii* infections in wildlife. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 274-276, 1990.

DOBOS-KOVÁCS, M.; MESZAROS, J.; PELLERDY, L.; BALSAL, A. Enzootische Toxoplasmosen bei Kangurus (*Wallabia eugenii*). In: INTERNATIONALES SYMPOSIUM ÜBER DIE ERKRANKUNGEN DER ZOOTIERE, 16, 1974, Erfurt. **Proceedings...** p. 323-325

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in dogs. **Canine Practice**, v. 12, n. 6, p. 7-20, 25-28, 1985.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 2, p. 166-170, 1986.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 17, n. 6, p. 1389-1405, 1987.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E.J.L.; SIMPSON, D.J.H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, p.579-597, 1998.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 121–153, 2002.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1988. 220 p.

DUBEY, J. P.; DESMONTES, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J. P.; GOODWIN, M. A.; RUFF, M. D.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; WILKINS, G. C.; THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in chukar partridges (*Alectoris graeca*) **Avian Pathology**, v. 24, p. 95-107, 1995.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; STORANDT, S. T.; KWOK, O. C.; THULLIEZ, P.; KAZACOS, K. R. *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally exposed wild coyotes, red foxes, and gray foxes and serologic diagnosis of Toxoplasmosis in red foxes fed *T. gondii* oocysts and tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 240-243, 1999.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: Unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocysts shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003a.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003b.

DUBEY, J. P.; MORALES, E. S.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 411-413, 2004.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; L. M.; VIANNA, M. C.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36-40, 2006.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 182-188, 2007a.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C. B.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E. O.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 60-64, 2007b.

DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C. H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, p. 1559-1566, 2007c.

DUBEY, J. P.; CORTÉS-VECINO, J. A.; VARGAS-DUARTE, J. J.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. M.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; KWOK, O. C.; SMITH, T.; SU, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 45-50, 2007d.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F. J.; NUNES DE OLIVEIRA, L.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M. G.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 299-305, 2008.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. New *Toxoplasma gondii* Genotypes Isolated from Free-Range Chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected Findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, N. 4, p. 709-712, 2010.

DUBEY, J. P.; PASSOS, L. M. F.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L. R.; GENNARI, S. M.; SU, C. Isolation of Viable *Toxoplasma gondii* from Feral Guinea Fowl (*Numida meleagris*) and Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 842-845, 2011.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P. A.; MCFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E. B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1139–1147, 2011.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATÃO-DIAS, J. L. Pathology of Toxoplasmosis in Captive New World Primates. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 196-204, 2003.

FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; DE MATTOS, C. C. B.; DE MATTOS, L. C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 190–195, 2011.

FERREIRA R. A.; MINEO, J. R.; DUARTE, J. M.; SILVA, D. A. O.; PATARROYO, J. H. Toxoplasmosis in Naturally Infected Deer from Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 4, p. 896-899, 1997.

FORNAZARI, F.; TEIXEIRA, C. R.; DA SILVA, R. C.; LEIVA, M.; ALMEIDA, S. C.; LANGONI, H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 238–241, 2011.

FRANTI, C. E.; CONNALLY, G. E.; RIEMANN, H. P.; BEHYMER, D. E.; RUPPANNER, R.; WILLADSEN, C. M. AND LONGHURST, W. A survey for *Toxoplasma gondii* antibodies in deer and other wildlife on a sheep range. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, p.565-568, 1975.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology, and immunity. In: HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. (Ed.). *The coccidia*. Baltimore: University Park, 1973.

FRENKEL, J. K. False-negative serologic test for *Toxoplasma* in birds. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 952-953, 1981.

FRENKEL, J. K. Pathophysiology of Toxoplasmosis. **Parasitology Today**, v. 4, n. 10, p. 273-278, 1988.

FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p.230-233, 1989.

GARCIA, J. L.; SVOBODA, W. K.; CHRYSSAFIDIS, A. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; AGUIAR, L. M.; TEIXEIRA, G. M.; LUDWIG, G.; DA SILVA, L. R.; HILST, C.; NAVARRO, I.T. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 133, p. 307-311, 2005.

GATTÁS, V. L.; NUNES, E. M.; SOARES, A. L. B.; PIRES, M. A.; PINTO, P. L. S.; ANDRADE JR, H. F. Acute toxoplasmosis outbreak at Campus of the University of São Paulo related to food or water oocyst contamination. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2000, Atlanta, Georgia, USA. 2000. p. 135.

GENNARI, S. M.; CAÑON-FRANCO, W. A.; YAI, L. E. O.; DE SOUZA, S. L. P.; SANTOS, L. C.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J.; ROSSI, S. W.; GOMES, A. A. B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 337-340, 2004.

GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M. C.; BURNIER, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M. E.; NUSSENBLATT, R. B.; KASLOW, R. A.; BELFORT, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, p. 136-144, 1992.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.

HESSLER, J. R.; WOODARD, J. C.; TUCEK, P. C. Lethal toxoplasmosis in a Woolly Monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, n. 11, p. 1588-1594, 1971.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HOWE, D.K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, 1997.

HUMPHREYS, J. G.; STEWART, R. L.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of hunter-killed White-Tailed deer in Pennsylvania. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p.172-173, 1995.

INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 131-138, 1997.

JACKSON, M. H.; HUTCHINSON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.

JOKELAINEN, P.; ISOMURSU, M.; NÄREAHO, A.; OKSANEN, A. Natural *Toxoplasma gondii* infections in European brown hares and mountain hares in Finland: proportional mortality rate, antibody prevalence, and genetic characterization. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 1, p. 154-63, 2011.

JONES, J. L.; MUCCIOLI, C.; BELFORT, R.; HOLLAND, G. N.; ROBERTS, J. M.; SILVEIRA, C. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 582–587, 2006.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A. J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, E. R.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROSS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980-2992, 2005.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT, R. JR.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 6, p. 942-949, 2006.

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 645–655, 2011.

LAPPIN, M. R.; GREENE C. E.; WINSTON, S.; TOLL, S. L.; EPSTEIN, M. E. Clinical feline toxoplasmosis. Serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 3, p. 139-143, 1989.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11423–11428, 2006.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; BLAGBURN, B. L. *Toxoplasma gondii* infection in Red-Tailed hawks inoculated orally with tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 2, p.222-225, 1991.

LINDSAY, D. S.; SMITH, P. C.; HOERR, F. J.; BLAGBURN, B. L. Prevalence of encysted *Toxoplasma gondii* in raptors from Alabama. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 870-873, 1993.

LITERÁK, I.; RYCILÍK, I.; SVOBODOVÁ, V.; POSPÍSIL, Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1367–74, 1998.

MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; ORTIZ, J. M.; BERNABÉ, A.; RUIZ DE YBÁÑEZ, M.R.; GARIJO, M.; ALONSO, F.D. Serologic response of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 143–149, 2004.

MARTÍNEZ-CARRASCO, C.; BERNABÉ, A.; ORTIZ, J. M.; ALONSO, F.D. Experimental toxoplasmosis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 55-60, 2005.

MERCIER, A.; DEVILLARD, S.; NGOUBANGOYE, B.; BONNABU, H.; BAÑULS, A. L.; DURAND, P.; SALLE, B.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L. Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, e876. doi:10.1371/journal.pntd.0000876

MERCIER, A.; AJZENBERG, D.; DEVILLARD, S.; DEMAR, M. P.; DE THOISY, B.; BONNABAU, H.; COLLINET, F.; BOUKHARI, R.; BLANCHET, D.; SIMON, S.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. **Infection Genetics and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 1378-1387, 2011.

MILLER, M. A.; GRIGG, M. E.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; CROSBIE, P. R.; JESSUP, D. A.; BOOTHROOYD, J. C.; BROWNSTEIN, D.; CONRAD, P. A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 275–284, 2004.

MILLER, M. A.; MILLER, W. A.; CONRAD, P. A.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; LEUTENEGGER, C. M.; DABRITZ, H. A.; PACKHAM, A. E.; PARADIES, D.; HARRIS, M.; AMES, J.; JESSUP, D. A.; WORCESTER, K.; GRIGG, M. E. 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**, v. 38, n. 11, p. 1319–1328, 2008.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and birds. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; JESUS PENA, H. F.; ORTOLANI, E. L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 3, p. 572–574, 2010 .

MOLINA-LÓPEZ, R.; CABEZÓN, O.; PABÓN, M.; DARWICH, L.; OBÓN, E.; LOPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the Common raven (*Corvus corax*) in the Northeast of Spain. **Research in Veterinary Science**, 2011 (Available on line).

MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 639-641, 1998.

MORDUE, D. G.; MONROY, F.; REGINA, M.; DINARELLO, C. A.; SIBLEY, L. D. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 4574-4584, 2001.

NETO, V. A.; MEDEIROS, E. A. S.; LEVI, G. C.; DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. 4 Ed. São Paulo: Sarvier, p. 154, 1995.

NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, I. Sur une infection à corps de Leishmann (organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**. Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.

OLIVEIRA, M. A. P.; SANTIAGO, H. C.; LISBOA, C. R.; CERAVOLLO, I. P.; TRINCHIERI, G.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. *Leishmania* sp: Comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and INF- γ synthesis. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 96-105, 2000.

OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v. 85, p. 382-384, 1999.

PATTON, S. Toxoplasmosis in the zoological park. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1993, Saint Louis. **Proceedings...** 1993. p. 189-191.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo State, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, n. 81, p. 58-67, 2006.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F.; MARVULO, M. F.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P. A.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 377-381, 2011.

PETRAK, M.; CARPENTER, J. Feline toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 146, n. 7, p. 728-734, 1965.

PFEFFERKORN, E. The Cell Biology of *Toxoplasma gondii*. IN: WYLER, D.J.(Ed.) "Modern Parasite Biology: Cellular Immunological and Molecular Aspects", Freeman, NEW York, p. 26-50, 1990.

RAGOZO, A. M. A.; YAI, L. E. O.; OLIVEIRA, N. R.; DIAS, R. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence and Isolation of *Toxoplasma gondii* from Sheep from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p.1259-1263, 2008.

RAGOZO, A. M. A.; PENA, H. F. J.; YAI, L. E. O.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 307-312, 2010.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J. P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, p. 359-368, 2012.

RAMIREZ, M. M.; RESOAGLI, E. H.; MARTINEZ, A. R.; Detection de toxoplasmosis en armadillos. **Veterinaria Argentina**, v. 1, p. 135-134, 1984.

RICHOMME, C.; AUBERT, D.; GILOT-FROMONT, E.; AJZENBERG, D.; MERCIER, A.; DUCROT, C.; FERTÉ, H.; DELORME, D.; VILLENA, I. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 296-300, 2009.

ROBBEN, P. M.; MORDUE, D. G.; TRUSCOTT, S. M.; KIYOSHI, T.; SHIZUO, A.; SIBLEY, L. D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. **Immunology**, v. 172, p. 3686-3694, 2004.

SALATA, E.; YOSHIDA, E. L.; PEREIRA, E. A.; CORREA, F. M. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos na região de Botucatu, do Estado São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 20-22, 1985.

SEDLÁK, K.; LITERÁK, I.; VITULA, F.; BENÁK, J. High susceptibility of partridges (*Perdix perdix*) to toxoplasmosis compared with other gallinaceous birds. **Avian Pathology**, n. 29, p. 563– 569, 2000.

SHARMA, S. D. Immunology of Toxoplasmosis. In: WYLER, D. J. (Ed). **Modern Parasite Biology-Cellular, Immunological and Molecular Aspects**, NEW York: W. H. Freeman, p. 184-199, 1990.

SCHENK, M. A. M.; ÁVILA, F. A.; LIMA, J. D.; SCHENK, J. A. P. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados em Minas Gerais, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 28, p. 33-35, 1976.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 51, p. 291-300, 1992.

SILVA, J. C; OGASSAWARA, S; ADANIA, C. H; FERREIRA, F; GENNARI, S. M; DUBEY, J. P; FERREIRA-NETO, J. S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 217-224, 2001.

SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 1995.

SOARES, R. M.; SILVEIRA, L. H.; DA SILVA, A. V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E. G.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal área of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 29-34, 2011.

SOBRAL, C. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; TEVA, A.; PATEL, B. N.; KLEIN, C. H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 37–41, 2005.

SOGORB, F. S.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C.. DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 314-320, 1972.

SOGORB, F. S.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, p.191-194, 1977.

SOLORIO, M. R.; GENNARI, S. M.; SOARES, H. S.; DUBEY, J. P.; HARTLEY, A. C. Z.; FERREIRA, F. *Toxoplasma gondii* Antibodies in Wild White-Lipped Peccary (*Tayassu pecari*) From Peru. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1232, 2010

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. **Revista Sociedade Scientifica São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841-848, 2006.

SULLIVAN, P. S.; PARDO, A. D. Challenging cases internal medicine. What's your diagnosis? **Veterinary Medicine**, v. 88, n.4, p. 309-320, 1993.

SUNDAR, N.; COLE, R. A.; THOMAS, N. J.; MAJUMDAR, D.; DUBEY, J. P.; SU, C. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 125-132, 2008.

TENTER, A. M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, p. 391, 1999.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

VELMURUGAN, G. V.; DUBEY, J. P.; SU, C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 314-318, 2008.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 1992.

VITALIANO, S. N.; MINEO, T. W. P.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z.; MINEO, J. R.; WERTHER, K. Experimental infection of Crested Caracara (*Caracara plancus*) with *Toxoplasma gondii* simulating natural conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 71-75, 2010.

VITALIANO, S. N.; SILVA, D. A. O.; MINEO, T. W. P.; FERREIRA, R. A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 253-260, 2004.

WENDTE, J. M.; GIBSON, A. K.; GRIGG, M. E. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 96-111, 2011 doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.018

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v. 7, p. 299-316, 1993.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; AGUIAR, D. M.; DAMACENO, J. T.; OLIVEIRA, L. N.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Isolation of *Toxoplasma gondii* from capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo state, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1060-1063, 2008.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M.; SOARES, R. M.; PENA, H. F.; SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332-337, 2009.

YAP, G. S.; SHER, A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 201, p. 240-247, 1999.

ZARNKE. L.; DUBEY, J. P.; KWOK, O. C.; VER HOEF, J. M. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in selected wildlife species from Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 219-224, 2000.

(continua)

APÊNDICES

Apêndice A: Inquérito sorológico para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (MAT $\geq$ 25) das amostras recebidas de animais selvagens de vida livre e cativeiro de diferentes localidades do Brasil no período de agosto de 2009 a março de 2011

Amostra	Espécie	Origem (VL/C) ¹	Procedência	Título
J1	Cachorro do mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	VL	Matão, SP	neg
J2	Veado-catingueiro (<i>Mazama goazoubira</i>)	VL	Santa Cruz da Esperança, SP	neg
J4	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	VL	Barretos, SP	25
J8*	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	VL	Jaborandi, SP	400
J9	Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	VL	Jaboticabal, SP	25
J13	Pomba amargosa (<i>Zenaida auriculata</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J15*	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	VL	Jaboticabal, SP	400
J17	Asa-branca (<i>Patagioenas picazuro</i>)	VL	Jaboticabal, SP	25
J19	Tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	VL	Matão, SP	100
J20	Veado-mateiro (<i>Mazama americana</i>)	C	Jaboticabal, SP	neg
J22	Cervo-do-pantanal (<i>Blastocerus dichotomus</i>)	C	Jaboticabal, SP	50
J29	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J31	Lebre (<i>Leprus</i> sp.)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J39	Veado-catingueiro (<i>Mazama goazoubira</i>)	VL	São Simão, SP	25

(continuação)

J43	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J46	Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	C	Ribeirão Preto, SP	neg
J49	Perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>)	C	Jaboticabal, SP	neg
J52	Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J53	Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J54	Asa-branca (<i>Patagioenas picazuro</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J68	Papagaio verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	C	Jaboticabal, SP	neg
J69	Seriema (<i>Cariama cristata</i>)	VL	Jaboticabal, SP	100
J72	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	VL	Jaboticabal, SP	50
J74	Gato-mourisco (<i>Puma yagouaroundi</i>)	VL	Ribeirão Preto, SP	neg
J76	Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J77	Pomba amargosa (<i>Zenaida auriculata</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J81	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J82	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	VL	Jaboticabal, SP	50
J83*	Raposa-do-campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	VL	Araraquara, SP	200
J86	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	C	Itirapina, SP	neg
J88	Gato-do-mato-pequeno (<i>Leopardus tigrinus</i>)	VL	Taquaritinga, SP	neg
J89	Macaco sauá (<i>Callicebus personatus</i>)	VL	Santa Rita do Passa Quatro, SP	neg

(continuação)

J90	Trinca-ferro (<i>Saltator similis</i>)	C	Jaboticabal, SP	neg
J93	Tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	VL	Taquaritinga, SP	800
J95	Carcará (<i>Caracara plancus</i>)	VL	Monte Alto, SP	neg
J96	Veado-catingueiro (<i>Mazama goazoubira</i>)	VL	Ribeirão Preto, SP	100
J97	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	VL	Ribeirão Preto, SP	800
J99	Maritaca (<i>Aratinga leucophthalmus</i>)	VL	Jaboticabal, SP	neg
J103	Macaco-prego (<i>Cebus apella</i>)	C	Jaboticabal, SP	25
J104	Papagario verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	C	Jaboticabal, SP	neg
U13	Asa-branca (<i>Patagioenas picazuro</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U15	Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	VL	Uberlândia, MG	100
U16*	Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	VL	Uberlândia, MG	25
U18	Cachorro do mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U23	Murucututu da cara preta (<i>Pulsatrix perspicillata</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U25	Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U26	Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U29	Suindara (<i>Tito alba</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U30	Carcará (<i>Caracara plancus</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U31	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg

(conclusão)				
U32	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U33*	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg
U34	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	VL	Uberlândia, MG	neg

* Animais em que foi possível obter o isolamento por meio do bioensaio em camundongos

Apêndice B: Relação das amostras positivas para *T. gondii* na PCR de triagem.

(continua)

Amostra	Espécie	Localização	Origem*
S9	Jaguaririca (<i>Leopardus pardalis</i>)	Santarém - PA	VL
S14	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - PA	VL
A30	Mucura (<i>Didelphis marsupialis</i>)	Santarém - PA	VL
S22	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	Santarém - PA	VL
S25	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - PA	VL
S26	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Santarém - PA	VL
S31	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Santarém - PA	VL
S33	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - PA	VL
S34	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - PA	VL
D1	Pica-pau-da-banda-branca (<i>Dryocopus lineatus</i>)	São Paulo - SP	VL
D3	Coruja-orelhuda (<i>Pseudocups clamator</i>)	São Paulo - SP	VL
D4	Gavião-carijó (<i>Rupornis magnirostris</i>)	São Paulo - SP	VL
D7	Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	São Paulo - SP	C
D9	Corujinha-do-mato (<i>Megascops choliba</i>)	São Paulo - SP	VL
D11	Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	São Paulo - SP	VL
D15	Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	São Paulo - SP	C

(continuação)			
D16	Bugio (<i>Alouatta caraya</i>)	São Paulo - SP	VL
FN3	Roedor de espécie desconhecida	Fernando de Noronha - PE	VL
FN4	Roedor de espécie desconhecida	Fernando de Noronha - PE	VL
FN5	Ibis (<i>Bulbulculus ibis</i>) Pool 5 aves	Fernando de Noronha - PE	VL
FN6	Ibis (<i>Bulbulculus ibis</i>) Pool 5 aves	Fernando de Noronha - PE	VL
J8	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Jaborandi - SP	VL
J15	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J16	Suindara (<i>Tito alba</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J29	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J39	Veado-catingueiro (<i>Mazama goazoubira</i>)	São Simão - SP	VL
J48	Tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J54	Pomba Asa-branca (<i>Patagioenas picazuro</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J56	Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J59	Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	Jaboticabal - SP	C
J65	Jacu (<i>Penelope</i> sp)	Jaboticabal - SP	VL
J72	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J73	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Jaboticabal - SP	VL

(continuação)			
J74	Gato-mourisco (<i>Puma yagouaroundi</i>)	Ribeirão Preto - SP	VL
J81	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Jaboticabal - SP	VL
J83	Raposa-do-campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	Araraquara - SP	VL
J86	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Itirapina - SP	C
J92	Perdiz (<i>Rinchorus rufescens</i>)	Jaboticabal - SP	C
J93	Tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)	Taquaritinga - SP	VL
J94	Veado-catingueiro (<i>Mazama goazoubira</i>)	Jaboticabal - SP	VL
P1	Oxymycterus sp. (roedor)	Peruíbe - SP	VL
S37	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	Santarém - PA	VL
S43	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	Santarém - PA	VL
S44	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	Santarém - PA	VL
S45	Queixada (<i>Tayassu pecari</i>)	Santarém - PA	VL
R6	Arara-canindé (<i>Ara ararauna</i>)	Recife - PE	C
R7	Gato-do-mato (<i>Leopardus tigrinus</i>)	Recife - PE	C
R10	Ararajuba (<i>Guaruba guarouba</i>)	Recife - PE	C
P2	Oxymycterus sp. (roedor)	Peruíbe - SP	VL
P3	Oxymycterus sp. (roedor)	Peruíbe - SP	VL

(continuação)			
P4	Oxymycterus sp. (roedor)	Peruíbe - SP	VL
S47	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - PA	VL
S48	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	Santarém - PA	VL
S49	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	Santarém - PA	VL
S50	Mucura (<i>Didelphis marsupialis</i>)	Santarém - PA	VL
S53	Macaco-Guariba (<i>Alouatta fusca</i>)	Santarém - PA	VL
S57	Paca (<i>Cuniculus paca</i>)	Santarém - PA	VL
S59	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Santarém - PA	VL
S60	Tamanduá-mirim (<i>Tamandua tetradactyla</i>)	Santarém - PA	VL
SM114	Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	Mato Grosso - MT	VL
U10	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Uberlândia - MG	VL
U12	Coruja-buraqueira (<i>Athene cunicularia</i>)	Uberlândia - MG	VL
U15	Curicaca (<i>Theristicus caudatus</i>)	Uberlândia - MG	VL
U16	Tatu-peba (<i>Euphractus sexcinctus</i>)	Uberlândia - MG	VL
U30	Carcará (<i>Caracara plancus</i>)	Uberlândia - MG	VL
U35	Ouriço-cacheiro (<i>Coendu prehensilis</i>)	Uberlândia - MG	VL
U36	Tatu-galinha (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Uberlândia - MG	VL

(conclusão)			
U37	Lontra (<i>Lutra longicaudis</i>)	Uberlândia - MG	VL
U43	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Uberlândia - MG	VL
U44	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Uberlândia - MG	VL
U45	Gambá-de-orelha-branca (<i>Didelphis albiventris</i>)	Uberlândia - MG	VL

Origem*: VL = Vida Livre, C = Cativo

Genótipo pela PCR/RFLP												
Amostras	SAG1	5'+3' SAG2	NEW SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3
S28 ^S			I									
U33 ^S		III	I	III	III			III	I		III	u-1
R3 ^S			I									
U43 ^T		III	III				III					
S25 ^T	I											
S26 ^T						II						II
U15 ^T	I					III						
D3 ^T			I									
J93 ^T									III			
S48 ^T	I		II	I				I	II			
S49 ^T	I				III				II			
S50 ^T										III		
S34 ^T	I			I								

(conclusão)												
J65 [†]	II/III											
U12 [†]	III											
U37 [†]	II I I											
D5 [†]	I	I	I	III	I	II	u-1	I		I	I	I
D15 [†]	III											

§Genótipos parciais provenientes de isolados, †Genótipos parciais provenientes de amostras primárias