



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENOTÍPICA**  
**DE *Toxoplasma gondii* DE AVES E MAMÍFEROS SILVESTRES DE**  
**PERNAMBUCO, BRASIL**

**RECIFE**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MARCIO ANDRÉ DA SILVA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENOTÍPICA  
DE *Toxoplasma gondii* DE AVES E MAMÍFEROS SILVESTRES DE  
PERNAMBUCO, BRASIL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva**

**Co-orientadora**

**Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena**

**RECIFE**

**2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENOTÍPICA  
DE *Toxoplasma gondii* DE AVES E MAMÍFEROS SILVESTRES DE  
PERNAMBUCO, BRASIL**

Tese de doutorado elaborada por

**MARCIO ANDRÉ SILVA**

Aprovada em 29/02/2016

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. Vladimir da Mota Silveira Filho

Universidade de Pernambuco – UPE – Campus Garanhuns

Dra. Fernanda Loffler Niemeyer Attademo

CEPENE - ICMBio

Dra. Luciana Carla Rameh de Albuquerque Zanotti

ECOASSOCIADOS

Dedico todo meu esforço à mãe natureza e aos irmãos animais, com uma dedicação especial aos animais de laboratório, que em exemplo de simplicidade e abnegação, doam-se à experimentação científica e salvam milhares de vidas silenciosamente.

## AGRADECIMENTOS

Como diz uma bela canção: “*Life has a funny way of sneaking up on you when you think everything is ok, and everything is going right. And now well, life has a funny way of helping you out when you think everything is going wrong, and everything blows up in your face*”(Ironic – Allanis Morissette). Esta tese foi um empurrão para que eu me lançasse no precipício da vida, em busca de um sonho que se desfez, e curiosamente, ela mesma foi o par de asas que a vida me deu, para me ensinar a voar e ser livre, para hoje viver outros sonhos.

Agradeço ao Prof. Jean Carlos, a orientação, a amizade e o presente que me foram dados com esta tese. Ao Prof. Rinaldo e sua equipe pelo apoio e parceria desde o mestrado. À Profa. Solange Gennari, à Dra. Hilda Pena e toda a equipe da Universidade de São Paulo (USP) pelo auxílio técnico, paciência, acolhimento e troca de conhecimentos que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho. À CPRH e à FACEPE pelo apoio logístico e financeiro.

Agradeço a toda a equipe do Parque Estadual Dois Irmãos, de hoje e de ontem, pelo super auxílio nas atividades de campo e colheita de material, e pela paciência na convivência diária com um chato de carteirinha como eu. Vocês são minha segunda família. E falando em família, não poderia deixar de agradecer a minha primeiríssima família (Mãe, Irmão, Pai, Tios e Tias, Primos e Primas, Cachorros, etc.), pelo apoio incondicional, torcida e por entenderem minhas ausências. Um agradecimento especial à Tia Lourdes, por ser minha segunda mãe sempre que preciso ir a São Paulo trabalhar ou fazer qualquer outra coisa, e aos meus avôs e avós queridos, que de onde estiverem, sei que estão sempre torcendo e velando por mim.

Agradeço aos meus amigos, todos eles, sem citar nomes para não gerar ciúmes, pois são parte importantíssima da minha vida, no apoio psicológico e moral sempre. Em especial, um muito obrigado cheio de carinho aos amigos Herbert Souza e Solange Oliveira pela acolhida e diversão diárias na convivência por um mês nos laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ/USP).

Agradeço aos animais que foram objeto deste estudo, todos que conseguimos salvar, e principalmente os que não conseguimos. E finalmente, agradeço à vida a oportunidade que me foi dada de lutar neste *front*, e dar minha parcela de contribuição para o bem estar de todos, e a todos os presentes e bálsamos recebido ao longo desta existência, fazendo-a mais feliz e produtiva a cada dia.

*'Just because someone stomps and loses their  
way, it doesn't mean they are lost forever.  
Sometimes we all need a little help. We just  
have to show them a better path'.  
Charles Xavier (X-men: Days of Future Past)*

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasito de ampla distribuição mundial e apresenta uma estrutura populacional clonal. Estudos recentes evidenciaram maior variabilidade genética deste protozoário no Brasil em animais domésticos e silvestres, necessitando-se de maiores pesquisas neste último grupo. Objetivou-se isolar e caracterizar genotipicamente *Toxoplasma gondii* em tecidos de mamíferos e aves silvestres naturalmente infectados, provenientes de vida livre e de cativeiro, no estado de Pernambuco e verificar a ocorrência de anticorpos contra o parasito nas amostras em que foi possível obter o soro. De março de 2014 a setembro de 2015, foram colhidas amostras biológicas de 233 animais, sendo 113 aves e 120 mamíferos. Considerando a origem, 77 foram de vida livre e 156 de cativeiro, oriundos de um zoológico e de um Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS). O exame sorológico foi realizado em 165 animais (59 aves e 106 mamíferos) por meio do Teste de Aglutinação Modificado (MAT). Em 105 animais (71 aves e 34 mamíferos) houve colheita de fragmentos de coração, cérebro, músculo esquelético e diafragma. Destas 105 amostras, 32 foram submetidas ao bioensaio em camundongos e 73 foram submetidas a diagnóstico molecular direto por PCR a partir de um fragmento de 155-pb do gene B1. Para a análise de virulência das cepas, os camundongos utilizados nos bioensaios foram avaliados por quatro semanas quanto à manifestação de sinais clínicos de toxoplasmose. As amostras positivas de animais silvestres e camundongos foram submetidas à genotipagem pela técnica de PCR-RFLP, utilizando os marcadores SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 52,7% (87/165) das amostras, com maiores percentuais em animais de cativeiro (61,6%, 78/125) do que em animais de vida livre (22,5%, 9/40). No bioensaio, isolou-se uma amostra não virulenta, do genótipo #13 em um socozinho (*Butorides striata*) de vida livre proveniente de Recife. Das 73 amostras primárias submetidas à PCR, sete foram positivas, com identificação o genótipo Type BrIII em uma lontra (*Lontra longicaudis*) de cativeiro. Os dois genótipos identificados corroboram com a existência da variabilidade genética de *T. gondii* em Pernambuco. Dois macacos-pregos-galegos (*Sapajus flavius*) positivos pela PCR tiveram achados de necropsia compatíveis com óbito por toxoplasmose aguda. O aprimoramento de programas de medicina veterinária preventiva e biossegurança para o controle da toxoplasmose deve ser realizado em instituições que mantêm fauna silvestre *ex situ*.

Palavras chave: toxoplasmose, caracterização gênica, fauna silvestre, Saúde Única.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is a wide world distribution parasite and has a clonal population structure. Recent studies have shown greater genetic variability of this protozoan in Brazil in domestic and wild animals, needing more research with this last group. The aim of this study was to isolate and make genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally infected wild mammals and birds, from free ranging and captivity at Pernambuco, and verify antibodies occurrence against this parasite in samples where sera was obtained. From 2014 March to 2015 September, 233 biological samples were collected from 113 birds and 120 mammals. Considering origin, 77 animals were from free ranging and 156 were from captivity, from a zoo and a wildlife rehabilitation center. Serological exam was performed in 165 animals (59 birds and 106 mammals) by Modified Agglutination Test (MAT). In 105 animals there was gathering of heart, brain, skeletal muscle and diaphragm fragments. From those 105 samples, 32 were submitted to mouse bioassay and 73 were submitted to direct molecular diagnosis by PCR from a fragment of B1 gene 155-pb. For virulence analysis, mice used in bioassays were evaluated for four weeks in search of toxoplasmosis clinical signs. Positive samples of wild animals and mice were submitted to genotyping by PCR-RFLP technique, using markers SAG1, 5'3'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico and CS3. Anti-*T. gondii* antibodies were found in 52,7% (87/165) of the samples, with higher percentages in captivity animals (61,6%, 78/125), than in free ranging ones (22,5%, 9/40). In bioassays, one non virulent sample was isolated, of genotype #13 from a free ranging striated heron (*Butorides striata*) from Recife. From the 73 primary samples submitted to PCR, seven were positive, with identification of genotype *Type* BrIII in a captive tropical otter (*Lontra longicaudis*). Both genotypes identified corroborate with the existence of genetic variability of *T. gondii* in Pernambuco. Two blonde capuchin monkeys (*Sapajus flavius*) positive by PCR had necropsy findings compatible with death by acute toxoplasmosis. The enhancement of preventive veterinary medicine and biosecurity programs for toxoplasmosis must be performed in institutions that keep captive wildlife.

Keywords: toxoplasmosis, genetic characterization, wildlife, One Health.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Lista de Figuras

- Figura 1 - Mapa dos municípios do estado de Pernambuco onde foram realizadas colheitas de material biológico (sangue e tecidos) de aves e mamíferos silvestres, 2014-2015 ..... Pág. 30
- Figura 2 - Inoculação subcutânea do homogenado de tecidos de aves e mamíferos silvestres para bioensaio em camundongos *Swiss* ..... Pág. 45
- Figura 3 - Mapa com os municípios de origem das amostras de tecidos de 59 aves e mamíferos silvestres de vida livre do estado de Pernambuco, encaminhadas para diagnóstico molecular direto ou bioensaio em camundongos. 2014 – 2015 ..... Pág. 59
- Figura 4 - Mapa com os municípios de origem das amostras de tecidos de 46 aves e mamíferos silvestres de cativeiro do estado de Pernambuco, encaminhadas para diagnóstico molecular direto ou bioensaio em camundongos. 2014 – 2015 ..... Pág. 59
- Figura 5 - Padrão de banda forte e clara dos números 188, 189 e 190, referentes à amplificação de DNA de *T. gondii* a partir de amostras primárias de diafragma, coração e músculo da lontra (*Lontra longicaudis*) nº 55, respectivamente ..... Pág. 60

### Lista de Gráficos

- Gráfico 1 - Número de indivíduos de aves e mamíferos silvestres de vida livre por município. Pernambuco, 2014-2015 ..... Pág. 31
- Gráfico 2 - Número de indivíduos de aves e mamíferos silvestres de cativeiro por município. Pernambuco, 2014-2015 ..... Pág. 31

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação das 40 aves e mamíferos silvestres de vida livre que foram submetidos ao teste sorológico para detecção de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> , segundo nome comum, nome científico, total de indivíduos e instituição. Pernambuco, 2014 – 2015 .....	Pág. 33
Quadro 2 - Relação das 125 aves e mamíferos silvestres de cativeiro que foram submetidos ao teste sorológico para detecção de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> , segundo nome comum, nome científico, total de indivíduos e instituição. Pernambuco, 2014 – 2015 .....	Pág. 34
Quadro 3 - Relação das 32 aves e mamíferos silvestres cujas amostras de tecidos foram submetidos a bioensaio em camundongos, segundo nome comum, nome científico, total de indivíduos, origem e instituição. Pernambuco, 2014 – 2015 ...	Pág. 37
Quadro 4 - Relação das 73 aves e mamíferos silvestres cujas amostras primárias de tecidos foram submetidos ao diagnóstico biomolecular direto por PCR, segundo nome comum, nome científico, total de indivíduos, origem e instituição. Pernambuco, 2014 – 2015 .....	Pág. 39
Quadro 5 - Informações referentes aos marcadores genéticos e às endonucleases utilizadas na PCR-RFLP .....	Pág. 49
Quadro 6 - Amostras de referência de <i>Toxoplasma gondii</i> utilizadas como controle positivo da reação de PCR simples, PCR <i>multiplex</i> e PCR-RFLP .....	Pág. 50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Levantamentos sorológicos da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em aves e mamíferos silvestres em cativeiro e vida livre no Brasil, segundo grupo animal, porcentagem de animais positivos, teste sorológico, origem e localização .....	Pág. 19
Tabela 2 - Número amostral segundo associações possíveis entre exame sorológico (MAT), diagnóstico biomolecular direto (PCR) e bioensaio em camundongos .....	Pág. 32
Tabela 3 - Resultado dos exames sorológicos da ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por meio de teste de aglutinação modificado (MAT), segundo o grupo animal, classe, ordens, e espécies de aves e mamíferos silvestres de cativeiro e vida livre de Pernambuco. 2014 – 2015 .....	Pág. 54
Tabela 4 - Amostras de tecidos positivas para <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR simples em aves e mamíferos silvestres de vida livre e cativeiro em Pernambuco. 2014 – 2015 .....	Pág. 61
Tabela 5 - Genótipos <i>multilocus</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> do isolado do socozinho ( <i>Butorides striata</i> ) de vida livre e da amostra primária da lontra ( <i>Lontra longicaudis</i> ) de cativeiro, obtidos por PCR-RFLP. Recife, Pernambuco. 2014 – 2015 .....	Pág. 61
Tabela 6 - Resultados obtidos na associação de métodos para diagnóstico de <i>T. gondii</i> (MAT + bioensaio e MAT + PCR) em aves e mamíferos silvestres de vida livre e cativeiro em Pernambuco. 2014 – 2015 .....	Pág. 62

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 Objetivo Geral .....	15
1.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 ESTUDOS SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> EM ANIMAIS SILVESTRES .....	17
2.2 OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>Toxoplasma gondii</i> EM ANIMAIS SILVESTRES .....	22
2.2.1 Diagnóstico Histopatológico e Imunohistoquímico .....	22
2.2.2 Prova Biológica para Isolamento do Agente .....	22
2.2.3 Diagnóstico Biomolecular e Caracterização Gênica de <i>Toxoplasma gondii</i> em Animais Silvestres no Brasil e no Mundo .....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 ANIMAIS, ÁREA DE ESTUDO E PROCEDIMENTOS CLÍNICOS DE TRIAGEM .....	29
3.2 COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	32
3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS .....	42
3.3.1 Exame Sorológico para Pesquisa de Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	42
3.3.2 Isolamento de Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	43
3.3.3 Diagnóstico Biomolecular Direto a Partir de Amostras Primárias de Tecidos de Aves e Mamíferos Silvestres .....	46
3.3.4 Caracterização Genética dos Isolados e das Amostras Primárias de <i>T. gondii</i> ...	47
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS OBSERVADOS NAS AVES E MAMÍFEROS SILVESTRES .....	51
4.2 EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> .....	53
4.3 ISOLAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM ANIMAIS SILVESTRES E ANÁLISE DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS EM CAMUNDONGOS .....	58
4.4 DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR DE <i>Toxoplasma gondii</i> POR PCR SIMPLES A PARTIR DE AMOSTRAS PRIMÁRIAS .....	58

<b>4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Toxoplasma gondii</i> POR PCR-RFLP</b>	<b>58</b>
<b>4.6 RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E OS DIAGNÓSTICOS BIOMOLECULAR E POR ISOLAMENTO .....</b>	<b>62</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* possui distribuição cosmopolita sendo um dos protozoários parasitas mais adaptados a diversos ambientes (DUBEY, 2010). Os felídeos domésticos e silvestres são seus únicos hospedeiros definitivos (FRENKEL et al., 1970) e possivelmente todos os animais endotérmicos são considerados hospedeiros intermediários (DUBEY, 2010). A transmissão deste agente pode ocorrer pela ingestão de oocistos esporulados em água e alimentos contaminados, por carnivorismo quando da ingestão de tecidos animais contendo cistos teciduais (bradizoítos), ou ainda por via transplacentária (transmissão vertical) por meio de taquizoítos (DUBEY, 2010).

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* por meio de métodos moleculares tem sido realizada com amostras de humanos, mamíferos e aves, domésticos e silvestres (DUBEY, 2010). A maioria das amostras de *T. gondii* isoladas de homens e dos animais na Europa e na América do Norte foi agrupada em três linhagens clonais distribuídas mundialmente, denominadas como tipos I, II e III (HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002). Entretanto, estudos recentes descreveram que isolados destes parasitas no Brasil foram biologicamente e geneticamente diferentes dos isolados do Velho Mundo (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008; PENA et al., 2011; CABRAL et al., 2013; CAÑON-FRANCO et al., 2013; VITALIANO et al., 2014b).

Em nosso país, pouco se conhece sobre genótipos de *T. gondii* isolados de animais silvestres. Além disso, o Brasil possui uma expressiva diversidade de espécies silvestres, sendo uma das maiores diversidades biológicas do mundo (ANDRIOLO, 2007). Algumas destas espécies são consideradas cinegéticas, ou seja, normalmente caçadas, dentre outros fins, para consumo humano, o que pode acarretar em riscos de transmissão de enfermidades zoonóticas diversas, dentre elas a toxoplasmose (CHIARELLO, 2000; MARVULO e CARVALHO, 2014; ALVES et al., 2012).

Embora 88 genótipos já tenham sido identificados de uma variedade de hospedeiros animais no Brasil, novos genótipos têm sido continuamente identificados de diferentes espécies animais, indicando uma diversidade extremamente alta de cepas de *T. gondii* na população animal nacional (PENA et al., 2011). Recentemente, foram identificados 16 genótipos de 36 isolados de *T. gondii* em tecidos de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) no estado de São Paulo, Brasil (YAI et al., 2009). Neste estado, o agente também foi isolado e

geneticamente caracterizado em tecidos de um gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) e no estado de Pernambuco dois isolados de *T. gondii* foram caracterizados geneticamente em tecidos de um bugio-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul*) e de um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) no zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos em Recife (PENA et al., 2011). No arquipélago de Fernando de Noronha, PE, também foram isoladas e caracterizadas molecularmente 23 amostras de *T. gondii* de tecidos de galos e galinhas de subsistência (DUBEY et al., 2010). Os genótipos clonais isolados destas aves foram similares aos prevalentes na Europa e na América do Norte, representando resultados inesperados.

Os estudos no estado de Pernambuco relacionados com a infecção por *T. gondii* em animais silvestres de vida livre foram realizados apenas com levantamentos sorológicos nos seguintes espécies e grupos animais: felídeos neotropicais (SILVA et al., 2001a), cracídeos (LEITE et al., 2007), garças-vaqueiras (*Bubulcus ibis*) (COSTA et al., 2012), carnívoros (CUNHA, 2012), marsupiais e roedores (SIQUEIRA et al., 2013), primatas (FERREIRA et al., 2015) e peixe-boi marinho (ATTADEMO et al., 2016). A alta ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* encontrada nesses estudos justifica a realização de pesquisas visando o isolamento e caracterização molecular de cepas de *T. gondii* no estado de Pernambuco.

Diante do exposto, a ampla diversidade genética de *T. gondii* no Brasil e possivelmente no estado de Pernambuco, poderá proporcionar a pesquisa e o isolamento de cepas deste agente com genótipos diferenciados em aves e mamíferos silvestres, podendo haver diferenças também em sua virulência. Estes resultados poderão ser úteis para a realização de estudos epidemiológicos e parasitológicos deste agente do ponto de vista da clínica médica de animais silvestres e da saúde pública, além de compor importante ferramenta para a educação ambiental, educação em saúde, saúde única e o combate à caça de predatória de espécies silvestres.

## 1.1 Objetivo Geral

- a) Isolar e caracterizar biológica e genotipicamente *Toxoplasma gondii* em tecidos de mamíferos e aves silvestres naturalmente infectados provenientes de vida livre e de cativeiro no Estado de Pernambuco, utilizando bioensaio em camundongos.

## 1.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em aves e mamíferos silvestres.
- b) Realizar o isolamento de cepas de *T. gondii* em tecidos de mamíferos e aves silvestres de Pernambuco, por meio de bioensaio em camundongos.
- c) Caracterizar genotipicamente os isolados e amostras primárias de *T. gondii* obtidos de aves e mamíferos silvestres pela técnica de PCR-RFLP, utilizando os marcadores genéticos específicos: SAG1, 3'5'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, Apico e CS3.
- d) Avaliar a virulência das cepas isoladas de *T. gondii* em camundongos.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa e à classe Sporozoasida, de ampla distribuição mundial, capaz de infectar uma grande variedade de organismos endotérmicos, incluindo o homem, o que caracteriza seu potencial zoonótico. Possui os felídeos como hospedeiros definitivos, sendo os demais mamíferos e as aves, hospedeiros intermediários, comumente culminando em infecção comum e doença rara entre os susceptíveis (SILVA, 2007; DUBEY, 2010).

As principais formas de infecção, tanto em animais, quanto em seres humanos são: ingestão de oocistos esporulados em água e alimentos contaminados, por carnivorismo quando da ingestão de tecidos animais contendo cistos teciduais (bradizoítos), ou ainda por via transplacentária (transmissão vertical) por meio de taquizoítos (DUBEY, 2010).

A patogenicidade da infecção por *T. gondii* nas diferentes espécies varia muito conforme a espécie hospedeira, e embora seja mais comum a infecção assintomática, casos mais graves com quadros de abortamentos, alterações fetais, encefalites, uveítes, e até mortes súbitas ou agudas por toxoplasmose são descritas em várias espécies de animais domésticos e silvestres, além da espécie humana (GRIGG et al., 2001; COELHO et al., 2003; EPIPHANIO et al., 2003; SILVA, 2007; DUBEY, 2010). Contudo, outros fatores como a capacidade de virulência da cepa e a susceptibilidade do organismo hospedeiro também são fatores que influenciam no desenvolvimento de sinais clínicos (SILVA, 2007).

O ciclo biológico de *T. gondii* é heterógeno facultativo, havendo reprodução assexuada de caráter clonal nos hospedeiros intermediários, com formação de cistos, além de fase sexuada com produção de oocistos que ocorre no intestino dos hospedeiros definitivos (DUBEY e BEATTIE, 1988; HOWE e SIBLEY, 1995; LINDSAY et al., 1997). Estudos desenvolvidos por Howe e Sibley (1995) demonstraram que a maioria das amostras de *T. gondii* isoladas de homens e animais podem ser agrupadas em três linhagens clonais denominadas como tipo I, II e III. Entretanto, o encontro de diferentes genótipos na América do Sul denotou maior variabilidade genética deste parasito nesta região. Estudos recentes sugeriram que tal variabilidade sofre influência ocorrência de reprodução sexuada no ciclo silvestre da doença, com provável envolvimento de felídeos neotropicais neste ciclo, ou ainda o aumento a variabilidade genética do parasito de maneira ainda pouco conhecida na literatura (DEMAR et al., 2008; CARME et al., 2009, WENDTE et al., 2011).

## 2.1 ESTUDOS SOROLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS SILVESTRES

Os exames sorológicos são os mais utilizados na realização de estudos epidemiológicos da toxoplasmose, pois são indicativos de que o animal entrou em contato com o *T. gondii* em algum momento de sua vida (DUBEY, 2010). Estudos soropidemiológicos são comuns e altas taxas de ocorrência de soropositivos em todo o mundo foram descritas, tanto em seres humanos, quanto em animais, em alguns casos podendo atingir 100% (SILVA, 2007).

Dentre os métodos de sorodiagnóstico da toxoplasmose utilizados em animais silvestres, destacam-se o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), o Teste de Aglutinação em Látex (TAL), o Teste de Hemaglutinação Indireta (HI), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Teste Imunoenzimático (ELISA). Estes dois últimos, por necessitarem de conjugados espécie específicos, tem pouca aplicabilidade em animais silvestres, devido à falta desses conjugados para a maioria das espécies. Sendo assim, o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) tem sido o mais amplamente usado para sorodiagnóstico de toxoplasmose em animais silvestres de todas as espécies, justamente por não requerer conjugados espécie específicos, ser de baixo risco para o operador, ser fácil execução e baixo custo (SILVA, 2007; DUBEY, 2010).

A infecção de animais silvestres pelo *T. gondii*, como nas demais espécies animais, pode acontecer de três maneiras descritas anteriormente. Dentre os animais silvestres, podem ser infectadas todas as espécies endotérmicas, ou seja, aves e mamíferos, não havendo relatos de infecção de répteis, anfíbios e peixes (DUBEY, 2010; MARVULO e CARVALHO, 2014).

Embora seja uma das enfermidades zoonóticas mais difundidas no mundo, a toxoplasmose ainda é uma doença negligenciada pelos serviços de saúde pública. Apesar de não haver estudos determinando a importância da fauna silvestre na transmissão do *T. gondii* para o homem, as altas soroprevalências de anticorpos anti-*T. gondii* encontradas em diversas espécies de aves e mamíferos silvestres, inclusive espécies apreciadas por caçadores, indicaram que estes animais podem ser importantes fontes de infecção e vias de transmissão da toxoplasmose (MARVULO e CARVALHO, 2014).

O ciclo epidemiológico da doença, tanto em vida livre quanto em cativeiro, já é conhecido e bem descrito em literatura (DUBEY, 2010). No Brasil, os fatores de risco da infecção por *T. gondii* em felídeos neotropicais de zoológicos e criadouros foram: idade superior a três anos (razão das chances - *odds ratio*: OR = 4,75), ingestão de carnes não

adequadamente congeladas (OR = 2,23) e ingestão de carnes de animais de produção atropelados ou abatidos (OR = 1,64) (SILVA et al., 2007).

O primeiro estudo da infecção por *T. gondii* em mamíferos e aves silvestres mantidos em cativeiro no Brasil foi realizado por Sogorb et al. (1972) no Zoológico de São Paulo. Nesta pesquisa, anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados somente em mamíferos com percentual de 62,96 % (17/27) indicando o papel epidemiológico destes animais como sentinelas na cadeia de transmissão deste importante agente zoonótico. Em vida livre, o primeiro levantamento sorológico de anticorpos anti-*T. gondii* foi realizado em felídeos, primatas, marsupiais e roedores, obtendo-se um percentual de 63,5% (66/104) de positivos (FERRARONI e MARZOCHI, 1980).

Estudos da ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* foram realizados em diversas espécies de animais silvestres provenientes de ambientes naturais e de cativeiro (SILVA, 2007; SILVA et al., 2008; GONDIM et al., 2010; CASAGRANDE et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2013). A Tabela 1 apresenta as pesquisas da ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em aves e mamíferos silvestres de vida livre e cativeiro no Brasil.

Tabela 1: Levantamentos sorológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em aves e mamíferos silvestres em cativeiro e vida livre no Brasil, segundo o grupo animal, porcentagem de animais positivos, teste sorológico, origem e localização.

GRUPO ANIMAL	Pos./N*	%	TESTE	ORIGEM	LOCALIZAÇÃO	AUTORES
<b>Classe Aves</b>						
Diversas espécies silvestres	0/23	0	RSF	Cativeiro	Zoológico de São Paulo	Sogorb et al. (1972)
Diversas espécies silvestres	0/19	0	MAT	Cativeiro	Pará e Rio Grande do Norte	Minervino et al. (2010)
Diversas espécies silvestres	6/27	22,2	MAT	Vida Livre	São Paulo	Vitaliano et al. (2014a)
Diversas espécies silvestres	3/222	1,3	MAT	Vida Livre	Paraíba e Bahia	Andrade et al. (2016)
Cracídeos	214/252	84,92	HI	Cativeiro	Pernambuco	Leite et al. (2007)
Pardais	3/293	1,02	HI	Vida Livre	Bahia e Pernambuco	Gondim et al. (2010)
Pardais	91/151	60,3	HI	Vida Livre	Pernambuco	Vilela et al. (2011)
Avoantes	46/206	22,3	MAT	Vida Livre	Paraná	Barros et al. (2014)
Garças-vaqueiras	197/650	30,3	MAT	Vida Livre	Fernando de Noronha	Costa et al. (2012)
<b>Classe Mammalia</b>						
Diversas espécies silvestres	17/27	62,96	RSF	Cativeiro	Zoológico de São Paulo	Sogorb et al. (1972)
Diversas espécies silvestres	3/18	16,66	MAT	Vida Livre	São Paulo	Silva et al. (2006)
Diversas espécies silvestres	61/184	33,15	MAT	Cativeiro	Pará e Rio Grande do Norte	Minervino et al. (2010)
Diversas espécies silvestres	13/26	50	MAT	Cativeiro e Vida Livre	São Paulo	Vitaliano et al. (2014a)
Felídeos	3/4	75	RIFI	Vida Livre	Manaus-AM	Ferraroni e Marzochi (1980)
Felídeos Neotropicais	472/865	54,6	MAT	Cativeiro	71 Zoológicos e 15 Criadouros do Brasil	Silva et al. (2001a)
Felídeos Neotropicais	12/23	52,17	MAT	Cativeiro	Paraná	Ullmann et al. (2010)
Felídeos Nativos e Exóticos	18/19	94,7	RIFI	Cativeiro	Zoológico de Belo Horizonte, MG	Rivetti Júnior et al. (2008)

Continua

GRUPO ANIMAL	Pos./N*	%	TESTE	ORIGEM	LOCALIZAÇÃO	AUTORES
<b>Classe Mammalia</b>						
Felídeos Nativos e Exóticos	102/161	63,4	RIFI	Cativeiro	Zoológicos em Mato Grosso, São Paulo e Distrito Federal	André et al. (2010)
Felídeos Exóticos	24/37	64,9	MAT	Cativeiro	13 Zoológicos do Brasil	Silva et al. (2001b)
Lobo-guará	44/59	74,6	ELISA	Cativeiro	Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal	Vitaliano et al. (2004)
Lobo-guará	6/8	75	MAT	Vida livre	Minas Gerais	Curi et al. (2012)
Cachorro-do-mato	10/52	19,2	MAT	Cativeiro	São Paulo	Catenacci et al. (2010)
Canídeos selvagens	20/57	35,1	RIFI	Vida livre	Rio Grande do Sul, Paraíba, São Paulo e Paraná	Gennari et al. (2004)
Canídeos Neotropicais	20/50	40	RIFI	Cativeiro	Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Distrito Federal	Mattos et al. (2008)
Canídeos Nativos e Exóticos	49/97	50,5	RIFI	Cativeiro	Zoológicos em Mato Grosso, São Paulo e Distrito Federal	André et al. (2010)
Primatas e Carnívoros	17/32	53,1	MAT	Cativeiro	Zoológico de Aracajú, SE	Pimentel et al. (2009)
Primatas	31/49	63,27	RIFI	Vida Livre	Manaus-AM	Ferraroni e Marzochi, 1980
Primatas	16/60	26,66	MAT	Vida Livre	Paraná	Garcia et al. (2005)
Primatas	119/209	56,9	RIFI	Cativeiro	São Paulo	Bouer et al. (2010)
Marsupiais	21/33	63,64	RIFI	Vida Livre	Manaus-AM	Ferraroni e Marzochi, 1980
Marsupiais	15/223	6,7	MAT	Vida Livre	Pernambuco	Siqueira et al. (2013)
Capivaras	16/26	61,5	RIFI	Vida livre	Paraná	Truppel et al. (2010)
Roedores	11/18	61,11	RIFI	Vida Livre	Manaus-AM	Ferraroni e Marzochi, 1980
Roedores	10/174	5,7	MAT	Vida Livre	Pernambuco	Siqueira et al. (2013)
Cervo-do-pantanal e veado-campeiro	23/107	22	RIFI	Vida Livre	São Paulo e Goiás	Ferreira et al. (1997)
Tatu-galinha	9/31	12,9	MAT	Vida Livre	São Paulo	Silva et al. (2008)

Continua

GRUPO ANIMAL	Pos./N*	%	TESTE	ORIGEM	LOCALIZAÇÃO	AUTORES
<b>Classe Mammalia</b>						
Tatu-galinha	9/31	12,9	MAT	Vida Livre	São Paulo	Silva et al. (2008)
Boto-vermelho	82/95	86,4	MAT	Vida Livre	Amazonas	Santos et al. (2011)
Peixe-boi-marinho	6/55	10,9	MAT	Cativeiro	Pernambuco, Alagoas e Paraíba	Attademo et al. (2016)

Legenda: Pos./N =Número de animais soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*/número de animais examinados. HI – Teste de Hemaglutinação Indireta. RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta. MAT – Teste de Aglutinação Modificado e RSF – Reação de Sabin-Feldman.

## **2.2 OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO POR *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS SILVESTRES**

### **2.2.1 Diagnóstico Histopatológico e Imunohistoquímico**

O diagnóstico histopatológico de toxoplasmose é feito por acondicionamento de fragmentos de órgãos em formol a 10% e confecção de lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina para visualização de cistos teciduais ou taquizoítos à microscopia (SILVA, 2007). A imunohistoquímica auxilia na diferenciação do estágio do *T. gondii*, mas normalmente não é usada isoladamente como forma de diagnóstico por não ser espécie específica, e sim específica para o estágio de desenvolvimento do parasito (traquizoíto ou bradizoíto), podendo haver reação cruzada com *Sarcocystis*, *Neospora* e *Besnoitia* (SILVA, 2007; DUBEY, 2010).

A técnica de marcação por imunohistoquímica é feita por uso de tecidos fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina (DUBEY, 2010). Embora antígenos de *T. gondii* possam ser detectados mesmo após um ano de fixação dos tecidos em formalina a 10%, Dubey (2010) recomenda fixação dos tecidos por curtos períodos de 24 horas. Após isto, são feitas secções de 4 a 5 micrômetros, desparafinização e desidratação em etanol. A detecção é feita pela reação do material tratado com anticorpos policlonais anti-*T. gondii* de coelhos, cuja reação se dará apenas na presença de bradizoítos (DUBEY, 2010).

Trabalhos envolvendo exames histopatológicos e imunohistoquímicos para diagnóstico de *T. gondii* em animais silvestres no Brasil somente foram desenvolvidos com diversas espécies de primatas neotropicais mantidos em cativeiro ou provenientes de vida livre (EIPHANIO et al., 2000; EIPHANIO et al., 2003; ANDRADE et al., 2007; CASAGRANDE et al., 2013; GONZALES-VIERA et al., 2013). No tocante as aves silvestres, o único trabalho no Brasil que utilizou estes dois testes diagnósticos diretos para pesquisa de *T. gondii* foi desenvolvido por meio de infecção experimental em carcarás (*Caracara plancus*) no estado de São Paulo (VITALIANO et al., 2010).

### **2.2.2 Prova Biológica para Isolamento do Agente**

As provas de bioensaios para isolamento de *T. gondii* podem ser feitas pela inoculação de animais de laboratório e culturas de tecidos. A inoculação em camundongos (*Mus musculus*) é o protocolo padrão adotado internacionalmente para o isolamento de cepas de *T.*

*gondii* com a finalidade de caracterização gênica e análise de virulência, dado à suscetibilidade desta espécie ao agente em questão (DUBEY, 2010).

A técnica consiste basicamente em macerar o órgão alvo do qual se deseja identificar o parasito em solução salina a 0,85%, e submeter esta solução a um processo de digestão em pepsina ácida, seguida de neutralização e lavagem, e inoculação de 1 mL deste lavado em 5 camundongos *Swiss*, que serão observados quanto ao aparecimento de sinais clínicos sugestivos de toxoplasmose, tais como ascite, enterite, letargia, pneumonia, linfadenopatias e encefalite (DUBEY, 2010; PENA et al., 2011).

A inoculação dos camundongos por via subcutânea é preferível quando o material corre risco de estar contaminado por bactérias, minimizando as chances de óbitos por septicemia dos camundongos inoculados, o que ocorreria mais facilmente se a inoculação fosse feita pela via intraperitoneal, sendo esta preferível para materiais sabidamente estéreis, com mesmas chances de isolamento que a via subcutânea (DUBEY, 2010). Este mesmo autor prefere o uso de pepsina à tripsina, porque ajuda na redução da carga bacteriana dos inoculo, ser menos tóxica aos camundongos e digerir mais rápida e eficientemente os tecidos musculares.

Dentre a literatura pesquisada, destacamos o uso desta técnica para diagnóstico de *T. gondii* em animais silvestres no Brasil em espécies diversas de mamíferos e aves (YAI et al., 2009; VITALIANO et al., 2010; PENA et al., 2011; BARROS et al., 2014; CABRAL et al., 2013; VITALIANO et al., 2014b). Esta técnica parece ser ainda pouco utilizada para diagnóstico da agente etiológico em fauna silvestre, pelo menos no Brasil, e comumente está associada a estudos de caracterização gênica do *T. gondii*, como parte dos procedimentos utilizados previamente ao diagnóstico biomolecular.

### **2.2.3 Diagnóstico Biomolecular e Caracterização Gênica de *Toxoplasma gondii* em Animais Silvestres no Brasil e no Mundo**

O DNA de *T. gondii* pode ser detectado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo esta uma excelente técnica para diagnóstico da infecção por *T. gondii*, especialmente em espécies suscetíveis à doença clínica, graças ao seu resultado rápido, alta especificidade e sensibilidade, principalmente com uso das técnicas mais atuais como PCR Real Time e *Nested* PCR (DUBEY, 2010). Contudo, esta técnica ainda pode apresentar reações cruzadas no caso de diagnóstico diferencial entre oocistos de *T. gondii* e *Hammondia hammondi*, que não é espécie patogênica. Existem *primers* que são espécie



específicos para *H. hammondi*, mas o uso da PCR parece ser mais seguro no diagnóstico de taquizoítos, uma vez que consegue detectar o DNA de um único taquizoíto (DUBEY, 2010).

Dos genes alvo de PCR descritos para *T. gondii*, o mais amplamente utilizado é o 35-cópias do gene B1, sendo inclusive amplificado por *nested* PCR por alguns laboratórios para diminuir o limiar de detecção. Uma vez que a sensibilidade da PCR é diretamente dependente da quantidade da quantidade de cópias do gene amplificado, sequencias com muitas repetições no genoma do parasito podem também servir com alvos (HOMAN et al., 2000). Baseados nisto, estes mesmos autores (HOMAN et al., 2000) apresentaram uma técnica de PCR quantitativa de alta sensibilidade baseada na amplificação do fragmento não codificado de 529 bp do DNA, que se repete de 200 a 300 vezes no genoma de *T. gondii*. O estudo demonstrou que o fragmento 529 bp se foi muito eficaz na detecção de infecções por *T. gondii*, e atualmente ele vem sendo bastante usado para diversas espécies (HOMAN et al., 2000; DUBEY, 2010), embora o uso do gene B1 ainda seja comum e traga bons resultados (GRIGG et al., 2001; TRUPPEL et al., 2010; PENA et al., 2011; CABRAL et al., 2013), além de outros genes alvos como o 18S ribossomal DNA (VITALIANO et al., 2014b) e 500 bp do gene ITS-1 (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013).

Os estudos mais atuais associaram o diagnóstico biomolecular à caracterização gênica do *T. gondii*, seja em animais domésticos ou silvestres, por meio da técnica de polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Restrição de Comprimento de Polimorfismo do Fragmento - RFLP) (WENDTE et al., 2011). No Brasil, esta técnica já foi utilizada para realizar caracterização gênica de isolados de *T. gondii* provenientes de aves e mamíferos silvestres (YAI et al., 2009; PENA et al., 2011; CAÑÓN-FRANCO et al., 2013; BARROS et al., 2014; CABRAL et al., 2013; VITALIANO et al., 2014b), entretanto a realização de estudos no exterior, especialmente na Europa e América do Norte são bem mais comuns e frequentes (WENDTE et al., 2011). A detecção molecular de *T. gondii* normalmente é feita pela técnica de PCR com um fragmento de 155-pb do gene B1 e a tipificação da cepa é feita por meio de um ensaio genotípico múltiplo de PCR-RFLP (PENA et al., 2011).

Pena et al. (2011) utilizaram 10 *locus* como marcadores genéticos para caracterização gênica de isolados de *T. gondii* de um bugio-de-mãos-ruivas e um gato-mourisco do zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos, Recife – PE e de um gambá-de-orelhas-pretas (*Didelphis aurita*) de vida livre do município de Sorocaba – SP, sendo os marcadores: SAG 1, SAG 2, SAG 3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L258, PK1 e Apico. Estes mesmos 10 *locus* e mais o CS3 foram utilizados na pesquisa de Yai et al. (2009) para caracterizar geneticamente

36 isolados de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) oriundas de vida livre do estado de São Paulo, totalizando 11 marcadores. No estado do Rio Grande do Sul, Cañón-Franco et al. (2013) realizaram a caracterização gênica de isolados de felídeos silvestres neotropicais, utilizando-se 12 marcadores: SAG1, 5'3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Vitaliano et al. (2014b) também utilizaram estes mesmos 12 marcadores genéticos, porém substituíram o marcador 5'3'SAG2 pelo SAG2, para caracterização gênica de isolados provenientes de espécies diversas de aves e mamíferos silvestres provenientes de cinco diferentes estados brasileiros. Na caracterização gênica de isolados de avoantes (*Zenaida auriculata*) provenientes de vida livre do estado do Paraná foram utilizados 11 marcadores genéticos (SAG1, 5'3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico) (BARROS et al., 2014)

Segundo Wendte et al. (2011) o uso de maiores variedades de locus como marcadores para a caracterização gênica traz resultados mais confiáveis e que podem inclusive modificar completamente conhecimentos antigos sobre a genética do *T. gondii*. Tais conhecimentos afirmaram existir três linhagens clonais no *T. gondii*. Entretanto, atualmente há fortes indícios de que nos ciclos desenvolvidos em meio silvestre, principalmente pela passagem pelo trato digestório dos hospedeiros definitivos (felídeos) onde há reprodução sexuada do *T. gondii*, o padrão genético muda, levando ao descobrimento de linhagens distintas, com características particulares, tanto genéticas, quanto de virulência para determinados grupos animais. Estes padrões diferenciados de virulência também tendem a ser diferenciados na espécie humana, tendo-se identificado que determinadas linhagens têm maior envolvimento em casos de toxoplasmose clínica, mesmo em pacientes imunocompetentes, com manifestações clínicas diferenciadas de acordo com a linhagem.

Os resultados obtidos nas pesquisas de Khan et al. (2011) levaram à conclusão de que, além das linhagens clonais já conhecidas como de ocorrência comum na América do Norte e Europa (linhagens 1, 2 e 3), há uma quarta linhagem clonal na América do Norte, por eles nomeada como linhagem 12 devido as suas características filogenéticas. A linhagem 12 descende de reprodução clonal de uma cepa ancestral da linhagem 2, e que sofreu recombinações gênicas, tanto pela reprodução clonal, mas também com forte influência da reprodução sexuada. Os autores sugeriram ainda que esta linhagem possui maior virulência para camundongos, está associada a casos agudos graves de encefalite em lontras-marinhas (*Enhydra lutris*), e está fortemente associada à fauna silvestre (KHAN et al., 2011).

Em estudo realizado com carnívoros e cervídeos silvestres de diferentes espécies nos Estados Unidos da América (EUA), Dubey et al. (2004) obtiveram 36 isolados de *T. gondii*;

apenas dois eram da linhagem 1 e dois eram da linhagem 3, sendo todos os outros pertencentes à linhagem 2. No mesmo estudo, com corações provenientes de ursos-negros (*Ursus americanus*), de sete isolados de *T. gondii* obtidos, apenas dois eram da linhagem 3 e um era da linhagem 1, sendo os demais pertencentes à linhagem 2. Cepas de *T. gondii* de linhagens consideradas atípicas não foram descritas por estes autores neste trabalho (DUBEY et al., 2004).

Em estudo desenvolvido com espécies oriundas de caça na França, Aubert et al. (2010) isolaram apenas cepas da linhagem 2, que é a mais comumente isolada tanto em animais domésticos, quanto em seres humanos na Europa, e é considerada não virulenta para camundongos, sendo estas afirmações confirmadas pelos resultados obtidos no referido estudo. Na Itália, um estudo revelou três casos de morte de golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) por meningo-encefalite causada por toxoplasmose, tendo-se isolado uma cepa pertencente à linhagem 2 e duas cepas similares entre si, porém pertencentes à linhagem 2 atípica. Os óbitos foram confirmados como sendo por toxoplasmose, devido à negatividade dos animais para *Morbilivirus* e *Brucella* spp., que sabidamente são agentes envolvidos em quadros neurológicos fatais em cetáceos. O estudo ainda sugeriu que não houve diferença de neurovirulência para a espécie alvo devido à similaridade das lesões cerebrais observadas, e os autores citaram que foi possível que os genótipos isolados possam ser provenientes de recombinação sexual de diferentes clones (Di GUARDO et al., 2011).

A possibilidade de existência de um ciclo silvestre que justifica a alta variabilidade genética do *T. gondii* na América Latina foi evidenciada em relato de 44 casos de toxoplasmose aguda em seres humanos causados por cepa atípica (não pertencente às linhagens clonais europeias e norte americanas) na Guiana Francesa. Todos os pacientes envolvidos no relato eram imunocompetentes (soronegativos para HIV), tiveram histórico de consumo de carne de caça, beberam águas superficiais não tratadas, utilizaram áreas florestais amazônicas e apresentaram quadro clínico agudo de toxoplasmose (infecção pulmonar, febre alta, linfadenopatia, alterações neurológicas, miosite, endocardite, etc.), havendo inclusive um óbito (CARME et al., 2009). Essa hipótese pode ser reforçada com isolamento de cepas atípicas de *T. gondii* de uma onça-pintada (*Panthera onca*) de vida livre abatida no mesmo país, cujas características genéticas eram semelhantes às das cepas isoladas em casos de toxoplasmose clínica aguda em pacientes humanos imunocompetentes neste país (DEMAR et al., 2008). Em ambos os trabalhos supracitados, os autores consideraram viável a ocorrência de situações parecidas em países como Guiana, Suriname e Brasil, onde a composição florestal amazônica é a mesma, e a concentração de vida silvestre é abundante, permitindo as

variações genéticas do agente e a manutenção do ciclo silvestre da infecção (DEMAR et al., 2008; CARME et al., 2009).

Em trabalho pioneiro no Brasil, Pena et al. (2008) isolaram 20 genótipos distintos de gatos domésticos coletados em diferentes cidades do estado de São Paulo, onde nenhum dos genótipos se enquadrou nas linhagens clonais 1, 2 e 3 já conhecidas como comuns em animais domésticos na Europa e América do Norte. Este mesmo estudo trouxe ainda uma pesquisa em banco de dados de 125 gatos, galinhas e cães domésticos de diferentes estados brasileiros, dos quais 48 genótipos foram identificados e classificados em quatro linhagens denominadas com BrI, BrII, BrIII e BrIV. As avaliações de virulência dessas linhagens obtidas por meio do banco de dados revelaram a existência de cepas de alta virulência (BrI), virulência intermediária (BrII), baixa virulência (BrIII) e virulência mista (BrIV), cujas taxas de mortalidade de camundongos inoculados variaram entre os padrões intermediário e baixo (PENA et al., 2008). O estudo supracitado identificou ainda genótipos das linhagens 1 e 3 já observados na Europa e América do Norte, mas curiosamente não isolou nenhum da linhagem 2, o que aponta características genéticas diferenciadas do *T. gondii* no Brasil, com indícios de frequentes mudanças que levaram a uma grande variedade de recombinantes e poucas linhagens clonais (PENA et al., 2008). Em animais silvestres estas informações são bastante escassas.

Os trabalhos encontrados envolvendo caracterização gênica de isolados de *T. gondii* de fauna silvestre brasileira reportaram:

- a) um isolado já identificado no Brasil em bugio-de-mãos-ruivas, e dois isolados ainda não descritos no mundo provenientes de um gato-mourisco e um gambá-de-orelhas-pretas nos estados de Pernambuco e São Paulo (PENA et al., 2011);
- b) uma cepa nova em gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) e uma cepa nova e uma recombinante em gatos-mouriscos de vida livre no Sul do país (CAÑÓN-FRANCO et al., 2013);
- c) dois diferentes genótipos (#162 e #19) isolados de três espécies diferentes de morcegos (CABRAL et al., 2013).
- d) cinco diferentes genótipos em isolados de avoantes de vida livre da região Sul do Brasil, dos quais três já tinham sido descritos em espécies domésticas no Brasil, uma pertence à linhagem clonal 2 e a outra nunca havia sido descrito antes (BARROS et al., 2014);
- e) 22 cepas de diferentes espécies silvestres mamíferas e aviárias do Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-oeste do Brasil, com 17 genótipos atípicos, sendo que destes apenas

quatro foram previamente descritos no Brasil, e os 13 restantes nunca haviam sido descritos no mundo (VITALIANO et al., 2014b).

Tais publicações reforçaram a hipótese levantada por outros autores de que a genética do *T. gondii* no Brasil é muito mais diversa do que se pode supor (PENA et al., 2008; CARME et al., 2009; DUBEY, 2010; WENDTE et al., 2011).

A literatura consultada traz importantes informações sobre a biologia do *T. gondii*, e conforme mencionado levantou fortes indícios de que o ciclo silvestre, com a passagem do agente pelo sistema digestório de felídeos silvestres, tenha papel significativo na alta diversidade genética do parasito no mundo, em especial em ambientes neotropicais. Considerações sobre diferenças inclusive na capacidade de virulência em camundongos e relatos de ocorrência de toxoplasmose clínica em humanos imunocompetentes em países latino-americanos fronteiraços ao Brasil só reforçam a hipótese mencionada anteriormente. É fato que muito ainda se precisa conhecer, tanto sobre a biologia e genética do *T. gondii*, quanto sobre sua interação com os organismos hospedeiros, a biologia destes organismos e qual o real papel da fauna silvestre na saúde pública, em se tratando da toxoplasmose (CARME et al., 2009; DUBEY et al., 2012).

Apesar do número reduzido de estudos realizados com caracterização gênica de cepas de *T. gondii* em animais silvestres no Brasil, os resultados obtidos referenciam importantes informações sobre as características biológicas, genótípicas e de virulência das cepas deste agente que estão circulando tanto em meio silvestre, quanto em meio urbano ou rural em nosso país (PENA et al., 2011; VILELA et al., 2011; CAÑÓN-FRANCO et al., 2013; CABRAL et al., 2013; BARROS et al., 2014; VITALIANO et al., 2014b). O aprofundamento das pesquisas neste campo no estado de Pernambuco, utilizando a fauna silvestre local, é de extrema importância para responder questões importantes não só do ponto de vista da saúde pública, como também da conservação da vida silvestre, auxiliando em estratégias para prevenção desta zoonose.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS, ÁREA DE ESTUDO E PROCEDIMENTOS CLÍNICOS DE TRIAGEM

No período de março de 2014 a setembro de 2015 foram colhidas amostras biológicas (sangue e fragmentos de cérebro, coração, músculo esquelético e diafragma) de 233 animais silvestres (113 aves e 120 mamíferos, 77 de vida livre e 156 de cativeiro). Os animais silvestres de cativeiro foram procedentes do plantel fixo ou encaminhados para atendimento médico no zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos (PEDI) e no Centro de Triagem de Animais Silvestres Tangará (CETAS) da Agência Estadual do Meio Ambiente de Pernambuco (CPRH). A amostragem foi feita por conveniência, conforme o recebimento e/ou necessidade de atendimento dos animais em cada uma das instituições parceiras.

Todos os animais silvestres incluídos neste estudo foram clinicamente examinados, conforme protocolos internos de cada instituição parceira, visando o diagnóstico de enfermidades gerais com o objetivo de reabilitar os pacientes. Tais exames compreenderam, de maneira geral, inspeção visual direta, palpação, percussão, auscultação cardiopulmonar, dentre outros métodos semióticos aplicáveis a cada caso, sendo requisitados e realizados exames complementares (radiografias, ultrassonografias, exames laboratoriais, etc.), sempre que necessário, sempre a critério dos médicos veterinários responsáveis por cada uma das instituições. Os prontuários dos animais atendidos foram utilizados como fonte de busca por sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose, uma vez que os sinais clínicos são inespecíficos (SILVA, 2007). Os indivíduos que morreram, também tiveram seus prontuários analisados quanto a possíveis sinais clínicos de toxoplasmose, a fim de avaliar se a causa da morte poderia estar associada à infecção por *T. gondii*.

A diferenciação entre animais de vida livre e animais de cativeiro foi feita levando em consideração os períodos de soroconversão de anticorpos anti-*T. gondii* e o tempo encistamento de bradizoítos de *T. gondii* descritos por Dubey (2010). Sendo assim, para todos os exames realizados, foram considerados animais silvestres de vida livre os que estiveram sob cuidados humanos por período inferior ou igual a 30 dias, tendo a colheita das amostras biológicas sido feita dentro deste período, e foram considerados animais de cativeiro os que estiveram sob cuidados humanos por período superior a 30 dias, tendo a colheita de amostras biológicas sido feita a partir deste período. Objetivou-se com isso ter certeza de que os resultados obtidos com os animais de vida livre refletiriam a realidade do ciclo silvestre, uma

vez que se teria certeza de que a infecção foi obtida na natureza. Ambas as instituições parceiras contribuíram tanto com animais de ambas as origens, uma vez que o Parque Estadual Dois Irmãos atende nas dependências do zoológico, animais de vida livre da Mata Atlântica de sua Unidade de Conservação, e o CETAS Tangará recebe animais procedentes de cativeiro domiciliar por entregas voluntárias, além de animais oriundos de apreensões de tráfico.

Com relação aos municípios de onde vieram os animais silvestres utilizados neste estudo, os 233 animais foram procedentes de 16 municípios localizados nas quatro grandes divisões geopolíticas do estado de Pernambuco: Região Metropolitana do Recife, Zona da Mata, Agreste e Sertão (Figura 1). Dentre os 77 animais de vida livre, 23 foram procedentes da Mata Atlântica do Parque Estadual Dois Irmãos (PEDI), 35 foram procedentes de outras localidades do Recife e 18 foram procedentes de outros 10 municípios, totalizando 11 municípios. Dentre os 156 animais de cativeiro, 138 foram provenientes do plantel do zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos, 10 foram provenientes de outras localidades do Recife e oito foram provenientes de outros seis municípios, totalizando sete municípios coletados. Nos municípios de Camaragibe e Recife houve colheita de material biológico tanto de animais de vida livre, quanto de animais de cativeiro; nos demais só houve colheita de material biológico de um dos grupos de animais. Os gráficos 1 e 2 mostram respectivamente os números de animais de vida livre e de cativeiro coletados por cada município.

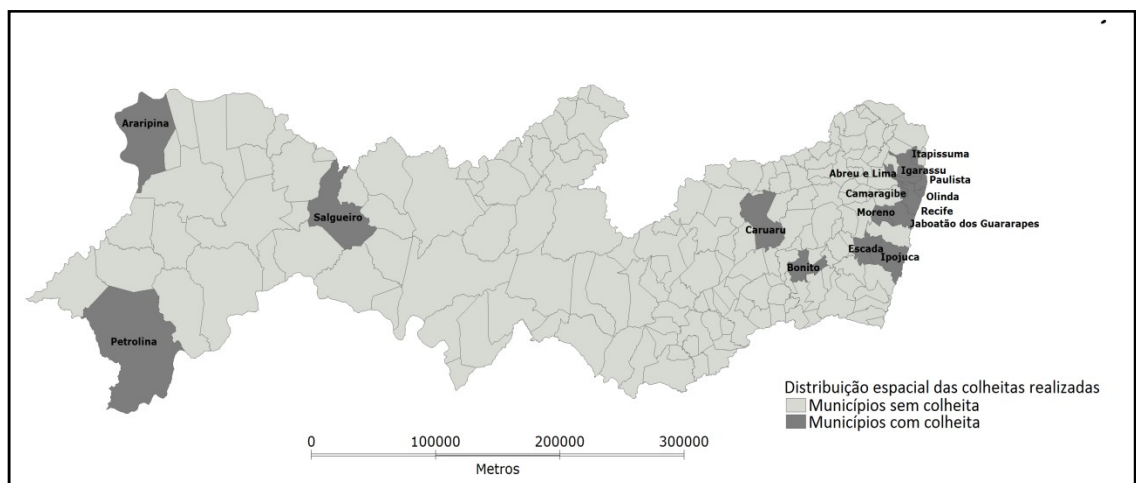


Figura 1: Mapa dos municípios do estado de Pernambuco onde foram realizadas colheitas de material biológico (sangue e tecidos) de aves e mamíferos silvestres, 2014-2015.

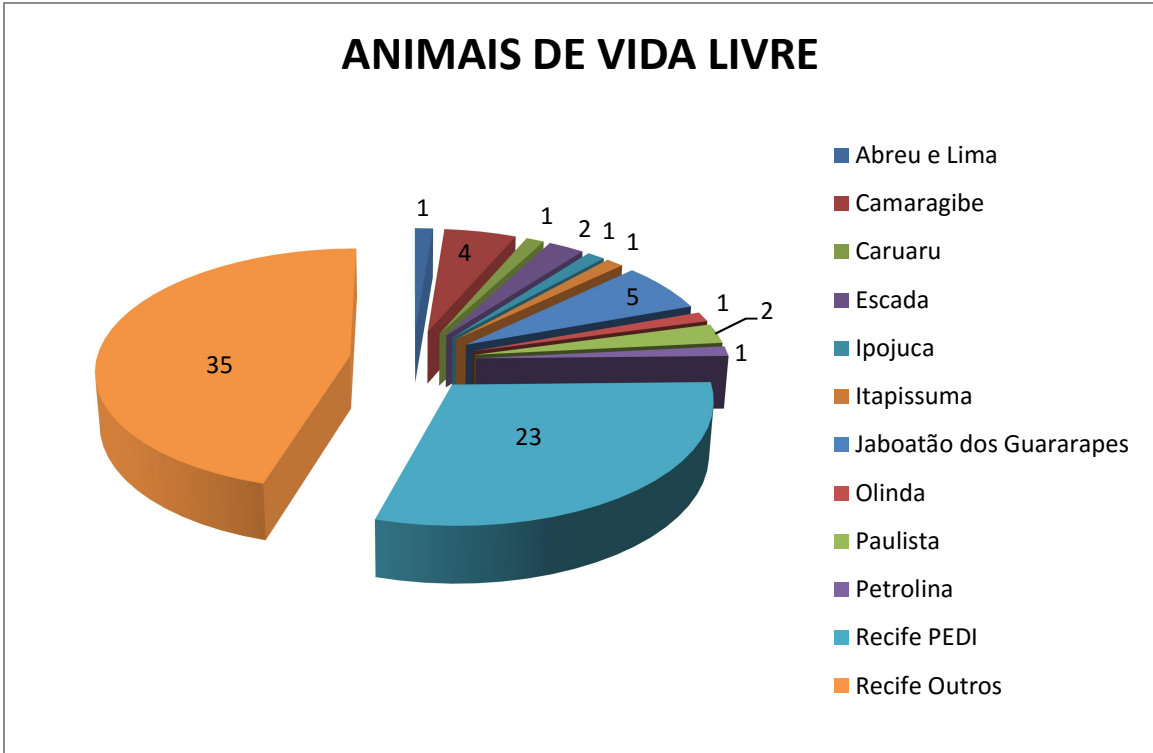


Gráfico 1 – Número de indivíduos de aves e mamíferos silvestres de vida livre por município. Pernambuco, 2014-2015.

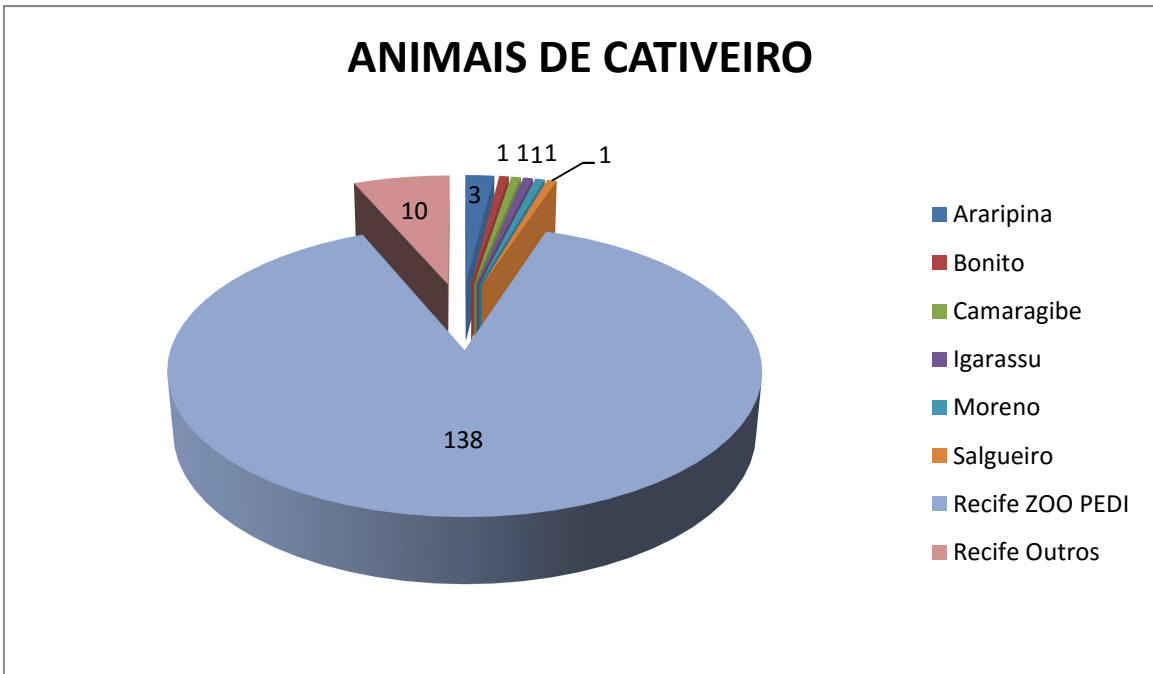


Gráfico 2 – Número de indivíduos de aves e mamíferos silvestres de cativeiro por município. Pernambuco, 2014-2015.



### 3.2 COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A colheita de amostras biológicas de aves e mamíferos seguiu os protocolos internos de cada instituição parceira. A colheita de sangue e fragmentos de órgãos de cada animal não foi possível em todos os casos. Na Tabela 2 constam os números de animais segundo a realização de métodos diagnósticos. Em nenhum animal silvestre foi procedido ao mesmo tempo o isolamento e o diagnóstico biomolecular direto, e nenhum animal silvestre foi eutanasiado apenas para compor este estudo.

Tabela 2: Número amostral segundo associações possíveis entre exame sorológico (MAT), diagnóstico biomolecular direto (PCR) e bioensaio em camundongos.

<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<b>MAT</b>	<b>PCR</b>	<b>Bioensaio</b>	<b>TOTAL</b>
Sim	Sim	Não	27
Sim	Não	Sim	10
Não	Sim	Não	46
Não	Não	Sim	22
Sim	Não	Não	128
			233

Durante os procedimentos de triagem dos animais silvestres, foi realizada contenção física, seguida de contenção química quando necessário, e procedida a colheita de sangue por punção venosa periférica de 165 animais (59 aves e 106 mamíferos; 40 de vida livre e 125 de cativeiro), utilizando os acessos venosos e protocolos anestésicos (quando necessário) mais recomendados para cada espécie animal em questão (CUBAS et al., 2014). O número de indivíduos por espécie, segundo as origens de vida livre e cativeiro constam nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Relação das 40 aves e mamíferos silvestres de vida livre que foram submetidos ao teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, segundo nome comum, nome científico, número total de indivíduos e instituição. Pernambuco, 2014-2015.

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Aves</b>				
Accipitriformes	gavião-caboclo	<i>Heterospizias meridionalis</i>	1	CETAS
	gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	3	CETAS
Falconiformes	carcará	<i>Caracara plancus</i>	3	CETAS
Passeriformes	bem-te-vi	<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	CETAS
Pelecaniformes	arapapá	<i>Cochlearius cochlearius</i>	1	CETAS
	garça-branca-grande	<i>Ardea alba</i>	1	CETAS
	socó-dorminhoco	<i>Nycticorax nycticorax</i>	2	CETAS
Strigiformes	coruja-murucututu	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	2	CETAS
	coruja-suindara	<i>Tyto furcata</i>	2	CETAS
		Subtotal	16	
<b>Classe Mammalia</b>				
Carnivora	cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	1	CETAS
Didelphimorphia	timbu	<i>Didelphis albiventris</i>	1	CETAS
Pilosa	bicho-preguiça	<i>Bradypus variegatus</i>	3	CETAS
			1	PEDI
Primates	sagui-de-tufo-branco	<i>Callithrix jacchus</i>	8	PEDI
			1	CETAS
Rodentia	cutia	<i>Dasyprocta agouti</i>	1	CETAS
	rato-preto	<i>Rattus rattus</i>	8	PEDI
		Subtotal	24	
		Total	40	

Legenda: N – número de indivíduos. CETAS – Centro de Triagem de Animais Selvagens. PEDI – Parque Estadual Dois Irmãos.

Quadro 2 – Relação das 125 aves e mamíferos silvestres de cativeiro que foram submetidos ao teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*, segundo nome comum, nome científico, número total de indivíduos e Instituição. Pernambuco, 2014-2015.

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Aves</b>				
Accipitriformes	gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	1	CETAS
	harpia	<i>Harpia harpyja</i>	2	ZOO PEDI
Cariamiformes	seriema	<i>Cariama cristata</i>	1	CETAS
Ciconiiformes	maguari	<i>Ciconia maguari</i>	1	ZOO PEDI
Falconiformes	carcará	<i>Caracara plancus</i>	1	CETAS
Galliformes	mutum-cavalo	<i>Pauxi tuberosum</i>	3	ZOO PEDI
	mutum-de-penacho	<i>Crax fasciolatta</i>	1	ZOO PEDI
	mutum-fava	<i>Crax globulosa</i>	1	ZOO PEDI
	mutum-poranga	<i>Crax alector</i>	1	ZOO PEDI
Psittaciformes	arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	11	ZOO PEDI
	ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	10	ZOO PEDI
Psittaciformes	arara-vermelha-grande	<i>Ara chloropterus</i>	3	ZOO PEDI
	papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazônica</i>	2	CETAS
	papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	3	CETAS
Rheiformes	ema	<i>Rhea americana</i>	1	ZOO PEDI
Strigiformes	coruja-murucututu	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	1	CETAS
		Subtotal	43	
<b>Classe Mammalia</b>				
Artiodactyla	camelo	<i>Camelus bactrianus</i>	2	ZOO PEDI
	cateto	<i>Pecari tajacu</i>	1	ZOO PEDI
	cervo-nobre	<i>Cervus elaphus</i>	1	ZOO PEDI
	cervo-sambar	<i>Rusa unicolor</i>	1	ZOO PEDI
	hipopótamo	<i>Hippopotamus amphibius</i>	1	ZOO PEDI
	veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	3	ZOO PEDI
Carnivora	cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>	3	ZOO PEDI
	cangambá	<i>Conepatus semistriatus</i>	1	ZOO PEDI
	furão	<i>Gallictis vittata</i>	1	ZOO PEDI
	gato-do-mato-pequeno	<i>Leopardus tigrinus</i>	2	ZOO PEDI
	gato-mourisco	<i>Puma yagouaroundi</i>	2	ZOO PEDI
	guaxinim	<i>Procyon cancrivorus</i>	2	ZOO PEDI
	jaguaririca	<i>Leopardus pardalis</i>	2	ZOO PEDI
	lontra	<i>Lontra longicaudis</i>	4	ZOO PEDI
				Continua

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Mammalia</b>				
Carnivora	onça-pintada	<i>Panthera onca</i>	4	ZOO PEDI
	papa-mel	<i>Eira barbara</i>	2	ZOO PEDI
	quati	<i>Nasua nasua</i>	10	ZOO PEDI
	suçuarana	<i>Puma concolor</i>	1	ZOO PEDI
	tigre-siberiano	<i>Panthera tigris altaica</i>	3	ZOO PEDI
Cingulata	tatu-peba	<i>Euphractus sexcinctus</i>	1	ZOO PEDI
Perissodactyla	anta	<i>Tapirus terrestris</i>	2	ZOO PEDI
Pilosa	tamanduá-mirim	<i>Tamandua tetradactyla</i>	1	ZOO PEDI
Primates	babuíno-sagrado	<i>Papio hamadryas</i>	2	ZOO PEDI
	babuíno-verde	<i>Papio anubis</i>	1	ZOO PEDI
	macaco-aranha-da-cara-preta	<i>Ateles chameck</i>	3	ZOO PEDI
	macaco-aranha-da-cara-vermelha	<i>Ateles paniscus</i>	2	ZOO PEDI
	macaco-aranha-da-testa-branca	<i>Ateles marginatus</i>	1	ZOO PEDI
	macaco-barrigudo	<i>Lagothrix lagotricha</i>	1	ZOO PEDI
	macaco-grivet	<i>Chlorocebus aethiops</i>	1	ZOO PEDI
	macaco-prego	<i>Sapajus libidinosus</i>	9	ZOO PEDI
Rodentia	capivara	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	1	CETAS
	paca	<i>Agouti paca</i>	2	ZOO PEDI
		Subtotal	82	
		Total	125	

Legenda: N – número de indivíduos. CETAS – Centro de Triagem de Animais Selvagens. ZOO PEDI – Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos.

Após a triagem clínica, 105 animais silvestres morreram, sendo 71 aves e 34 mamíferos, 59 de vida livre e 46 de cativeiro. Durante as necropsias destes pacientes foram colhidos fragmentos de cérebro, coração, músculo esquelético e diafragma para tentativa de isolamento ou de diagnóstico biomolecular direto a partir da amostra de tecido primária. Todas as necropsias foram realizadas em no máximo 24 horas após o óbito do animal. Nos casos em que a necropsia não pode ser realizada de imediato, o cadáver foi refrigerado a 5°C para realização do exame no dia seguinte. As necropsias foram realizadas segundo as técnicas mais adequadas a cada espécie, conforme proposto por Matushima (2007).

As amostras de tecidos das aves e mamíferos silvestres colhidas foram divididas em dois grupos por conveniência, visando evitar diagnósticos falso-negativos devido ao tempo decorrido entre a colheita da amostra e o envio da mesma para processamento laboratorial. Sendo assim, 32 amostras foram encaminhadas para bioensaio em camundongos (Quadro 3),

segundo a técnica descrita por Dubey (2010), e 73 foram encaminhadas para diagnóstico biomolecular direto a partir de amostras de tecido primárias (Quadro 4), realizado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) segundo técnica descrita por Homan et al. (2000).

As colheitas de sangue e fragmentos de órgãos dos animais silvestres utilizados neste estudo foram realizadas sob as autorizações do SISBIO nº 37855-1 (Anexo A), da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE) nº 109/2014 (Anexo B), da Agência Estadual de Meio Ambiente de Pernambuco (CPRH) nº 010675/2014 (Anexo C), e do Parque Estadual Dois Irmãos (PEDI) nº 2016/2014 (Anexo D).

Quadro 3 – Relação das 32 aves e mamíferos silvestres de vida livre e cativoiro que foram submetidos a prova de bioensaio em camundongos, segundo nome comum, nome científico, origem, total de indivíduos e Instituição. Pernambuco, 2014-2015.

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORIGEM	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Aves</b>					
Accipitriiformes	gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	cativoiro	3	CETAS
			vida livre	3	CETAS
Charadriiformes	quero-quero	<i>Vanellus chilensis</i>	cativoiro	1	CETAS
Falconiformes	carcará	<i>Caracara plancus</i>	vida livre	1	CETAS
	falcão-peregrino	<i>Falco peregrinus</i>	cativoiro	1	CETAS
Gruiformes	frango-d'água-azul	<i>Porphyrio martinicus</i>	cativoiro	1	CETAS
Pelecaniformes	socó-dorminhoco	<i>Nycticorax nycticorax</i>	vida livre	1	CETAS
	socozinho	<i>Butorides striata</i>	vida livre	1	CETAS
Psittaciformes	arara-vermelha-grande	<i>Ara chloropterus</i>	cativoiro	1	ZOO PEDI
	papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	cativoiro	1	CETAS ZOO PEDI
	periquito-da-caatinga	<i>Eupsittula cactorum</i>	cativoiro	1	
Rheiformes	ema	<i>Rhea americana</i>	cativoiro	1	ZOO PEDI
Strigiformes	coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	vida livre	1	CETAS
	coruja-murucututu	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	vida livre	2	CETAS
			vida livre	1	PEDI
	coruja-orelhuda	<i>Asio clamator</i>	vida livre	1	CETAS
coruja-suindara	<i>Tyto furcata</i>	vida livre	2	CETAS	
			Subtotal	23	
<b>Classe Mammalia</b>					
Artiodactyla	veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	cativoiro	1	ZOO PEDI
					Continua

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORIGEM	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Mammalia</b>					
Carnivora	guaxinim	<i>Procyon cancrivorus</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	quati	<i>Nasua nasua</i>	vida livre	1	CETAS
Pilosa	bicho-preguiça	<i>Bradypus variegatus</i>	vida livre	2	CETAS
Primates	bugio-preto	<i>Alouatta caraya</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	sagui-de-tufo-branco	<i>Callithrix jacchus</i>	vida livre	1	CETAS
Rodentia	rato-preto	<i>Rattus rattus</i>	vida livre	2	PEDI
			Subtotal	9	
			Total	32	

Legenda: N – número de indivíduos. CETAS – Centro de Triagem de Animais Selvagens. PEDI - Parque Estadual Dois Irmãos. ZOO PEDI – Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos.

Quadro 4 – Relação das 73 aves e mamíferos silvestres cujas amostras primárias de tecidos foram submetidas ao diagnóstico biomolecular direto por PCR, segundo nome comum, nome científico, total de indivíduos, origem e Instituição. Pernambuco, 2014-2015.

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORIGEM	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Aves</b>					
Accipitriformes	gavião-carijó	<i>Rupornis magnirostris</i>	vida livre	5	CETAS
Columbiformes	rolinha-caldo-de-feijão	<i>Columbina talpacoti</i>	vida livre	1	PEDI
Falconiformes	carcará	<i>Caracara plancus</i>	vida livre	1	CETAS
	gavião quiri-quiri	<i>Falco sparverius</i>	vida livre	1	CETAS
Galliformes	mutum-poranga	<i>Crax alector</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	mutum-de-penacho	<i>Crax fasciolatta</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	mutum-fava	<i>Crax globulosa</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	aracuã-pintada	<i>Ortallis guttata</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
Gruiformes	saracura-três-potes	<i>Aramides cajaneus</i>	vida livre	1	CETAS
Passeriformes	corrupião	<i>Icterus jamaicaii</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	xexéu	<i>Cacicus cela</i>	cativeiro	2	ZOO PEDI
	bem-te-vi	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Vida livre	1	CETAS
Pelecaniformes	garça-branca-grande	<i>Ardea alba</i>	vida livre	2	CETAS
	socozinho	<i>Butorides striata</i>	vida livre	1	CETAS
	arapapá	<i>Cochlearius cochlearius</i>	vida livre	1	CETAS
	socó-dorminhoco	<i>Nycticorax nycticorax</i>	vida livre	2	CETAS
Piciformes	pica-pau-verde	<i>Colaptes melanochloros</i>	vida livre	1	CETAS
	araçari-miúdo-de-bico-riscado	<i>Pteroglossus inscriptus</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
Procellariiformes	bobo-pequeno	<i>Puffinus puffinus</i>	vida livre	2	CETAS
Psittaciformes	papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	cativeiro	2	ZOO PEDI
					Continua



ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORIGEM	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Aves</b>					
Psittaciformes	papagaio-moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	arara-azul-grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	cativeiro	4	ZOO PEDI
	arara-canindé	<i>Ara ararauna</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	arara-vermelha-grande	<i>Ara chloropterus</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	jandaia-verdadeira	<i>Aratinga jandaya</i>	cativeiro	2	ZOO PEDI
	ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	cativeiro	2	ZOO PEDI
	marianinha-de-cabeça-amarela	<i>Pionites leucogaster</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
Rheiformes	ema	<i>Rhea americana</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
Strigiformes	coruja-orelhuda	<i>Asio clamator</i>	vida livre	1	CETAS
	coruja-buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>	vida livre	1	CETAS
	coruja-murucututu	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	cativeiro	1	CETAS
	coruja-suindara	<i>Tyto furcata</i>	cativeiro	1	CETAS
			vida livre	1	CETAS
			vida livre	1	PEDI
			Subtotal	48	
<b>Classe Mammalia</b>					
Artiodactyla	veado-catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
Didelphimorphia	cuíca-lanosa	<i>Caluromys philander</i>	vida livre	1	PEDI
	timbu	<i>Didelphis albiventris</i>	vida livre	1	CETAS
Carnivora	gato-do-mato-pequeno	<i>Leopardus tigrinus</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	lontra	<i>Lontra longicaudis</i>	cativeiro	2	ZOO PEDI
	guaxinim	<i>Procyon cancrivorus</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
					Continua

ANIMAL SILVESTRE	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ORIGEM	N	INSTITUIÇÃO
<b>Classe Mammalia</b>					
Pilosa	preguiça-comum	<i>Bradypus variegatus</i>	vida livre	3	CETAS
			vida livre	1	PEDI
	tamanduá-mirim	<i>Tamandua tetradactyla</i>	vida livre	1	CETAS
Primates	macaco-aranha-da-cara-vermelha	<i>Ateles paniscus</i>	cativeiro	1	ZOO PEDI
	sagui-do-tufo-branco	<i>Callithrix jacchus</i>	vida livre	3	CETAS
	Macaco-prego-galego	<i>Sapajus flavius</i>	cativeiro	2	ZOO PEDI
Rodentia	rato-preto	<i>Rattus rattus</i>	vida livre	7	PEDI
			Subtotal	25	
			Total	73	

Legenda: N – número de indivíduos. CETAS – Centro de Triagem de Animais Selvagens. PEDI - Parque Estadual Dois Irmãos. ZOO PEDI – Zoológico do Parque Estadual Dois Irmãos.

### 3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Os procedimentos laboratoriais (exame sorológico, isolamento do agente, diagnóstico biomolecular e caracterização gênica) foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). As amostras biológicas das aves e mamíferos (cérebro, coração, diafragma e musculatura esquelética) encaminhadas para bioensaio foram mantidas sob refrigeração a 5° C e enviadas ao laboratório pelos correios, refrigeradas em caixa isotérmica, em no máximo 24 horas após a colheita, de modo que não se passasse mais do que cinco dias entre a colheita das amostras biológicas e o seu processamento laboratorial. As amostras colhidas para diagnóstico biomolecular e os soros colhidos para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foram mantidos congelados a -20°C, até a realização dos respectivos exames, tendo sido também enviados ao LDP-FMVZ/USP em caixas isotérmicas pelos correios, com manutenção da temperatura durante o transporte feita por meio de gelo reciclável. Este trabalho não objetivou comparar as técnicas diagnósticas e foram usadas duas técnicas visando maximizar a identificação de animais positivos.

#### 3.3.1 Exame Sorológico para Pesquisa de Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* utilizou-se o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) com o uso de taquizoítos inativados pela formalina e 2-mercaptoetanol (DUBEY e DESMONTS, 1987).

As amostras de soros sanguíneos foram homogeneizadas em agitador de tubos para serem diluídas em microplaca (96 poços) em solução salina tamponada com albumina sérica bovina, pH 7,2 (NaCl 0,14M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0026M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,008M) e filtrada em membrana de policarbonato com 0,45µm de porosidade. Em seguida foi feito o mix do antígeno: 120µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5 mL de solução alcalina tamponada com albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), pH 8,95; 35µL mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Esta mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em nova microplaca com fundo em U (96 poços), numa quantidade de 25µL de reagentes por poço. Os soros diluídos previamente foram transferidos em quantidades de 25µL para a microplaca contendo o mix do antígeno. A microplaca era selada com plástico adesivo para evitar a evaporação e incubada

em estufa 37°C durante a noite. Nas aves silvestres utilizou-se o ponto de corte na diluição de 1:5 e nos mamíferos silvestres na diluição de 1:25 (DUBEY, 2010).

A visualização de um botão de contorno definido no fundo do poço da placa era considerado como resultado negativo; enquanto que a formação de um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido era considerado positivo (DESMONTS e REMINGTON, 1980). Em todas as reações foram usados controles positivos e negativos, previamente conhecidos. O antígeno para execução do MAT foi cedido pelo Dr. Jitender P. Dubey do *United States Department of Agriculture (USDA), Agriculture Research Service, Animal and Natural Resources Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville, Maryland (EUA)*, sendo enviado por via aérea.

### **3.3.2 Isolamento de Cepas de *Toxoplasma gondii***

#### *3.3.2.1 Digestão Péptica dos Tecidos*

Os tecidos (cérebro, coração, diafragma e músculo esquelético) das 32 aves e mamíferos silvestres foram cortados em pequenos pedaços, sendo removidos a gordura e o tecido conjuntivo. Para os tecidos das aves e mamíferos de grande porte (acima de 1 Kg), o cérebro, o coração e o diafragma foram utilizados integralmente e o músculo esquelético foi utilizado para completar 50g de tecidos. Para os tecidos das aves e mamíferos de pequeno porte (abaixo de 1 Kg), foi realizado um pool dos tecidos, de aproximadamente 5g, e os mesmos foram homogeneizados com cinco volumes de solução salina (NaCl 0,15M) com o auxílio de um homogeneizador doméstico. Ao material homogeneizado adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1-1,2 (pepsina, 2,6g; NaCl, 5,0g; HCl, 7,0 mL; água destilada suficiente para 500mL de solução), recém preparada e aquecida em banho-maria a 37°C. A mistura foi incubada em banho maria a 37°C por uma hora sobre agitação constante (PENA et al, 2008).

Após a incubação, a suspensão foi coada através de duas camadas de gaze. No caso das amostras dos animais silvestres de grande porte o coado foi transferido para cinco tubos cônicos de 50 mL e nas amostras dos animais silvestres de pequeno porte somente para um tubo cônico de 50 mL, que foram centrifugados a 1.200 G por 10 minutos (PENA et al., 2008).

O sobrenadante era desprezado e o sedimento de cada tubo era então neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH- 8,3, recém-preparado (ao redor de 5,0 mL

por tubo). A neutralização era percebida visualmente pela mudança de cor do sedimento. Após a homogeneização, o material era transferido para um tubo cônico, completando-se o volume para 50 mL com salina, e centrifugado a 1.200 G por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante era desprezado e o sedimento homogeneizado com salina (v/v) contendo 2000U de penicilina e 200µg de estreptomicina por mililitro (PENA et al., 2008).

### 3.3.2.2 *Bioensaio em Camundongos*

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, fêmeas e machos, com idade ao redor de dois meses, provenientes do Biotério do VPS-FMVZ/USP, com autorização da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA-FMVZ/USP) nº 1588/2008 (Anexo E).

Cada homogenado dos quatro tecidos (cérebro, coração, diafragma e músculo esquelético) ou do *pool* de tecidos foi inoculado em três camundongos, imediatamente após o término do procedimento de digestão péptica dos tecidos. Os camundongos foram identificados individualmente com ácido pícrico e alojados na mesma caixa. Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0 a 1,2 mL (Figura 2) do homogenado e após a inoculação os camundongos foram observados diariamente por seis semanas (PENA et al., 2011). Os camundongos permaneceram em caixas padrão para espécie com água e alimento *ad libitum*. As caixas foram higienizadas duas vezes por semana com troca da maravalha.



Figura 2: Inoculação subcutânea do homogenado de tecidos de aves e mamíferos silvestres para bioensaio em camundongo *Swiss*.

Os camundongos que vinham a óbito eram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito no item (3.3.2.4). Os camundongos que sobreviviam até seis semanas pós-inoculação (P.I.) eram examinados sorologicamente para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* pelo MAT, com o mesmo protocolo acima. Após a contenção física de cada camundongo, a colheita de sangue foi realizada por punção do plexo venoso mandibular utilizando uma agulha 40 x 12 mm colhendo-se cinco gotas de sangue que foram dispostas em microtubo de polipropileno de 1,5 mL, deixado em estufa a 37°C por uma hora. Após este período, o sangue foi centrifugado para obtenção do soro, que foi armazenado em outro microtubo de polipropileno e congelado a -20°C até a realização do MAT, utilizando-se o mesmo ponto de corte (PENA et al., 2011).

Após o resultado do exame sorológico do MAT, os camundongos foram quimicamente contidos com cloridrato de cetamina (40-90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (1-5 mg/Kg) pela via intramuscular. Ao atingirem plano anestésico II ou III, os animais foram eutanasiados para pesquisa de cistos de *T. gondii* pelo método de superexposição a isoflurano, com uso de uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido com o anestésico, sem contato direto do animal com o algodão. A caixa hermeticamente fechada foi transparente para facilitar a visualização do momento do óbito do animal, que foi confirmado a seguir pela ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos. Este protocolo está de acordo com a

especificação dos métodos de eutanásia de roedores jovens e adultos de recomendados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV (2013).

### 3.3.2.3 *Análise de Virulência das Cepas Isoladas*

Durante os 45 dias de observação dos camundongos inoculados, foram feitas análises do comportamento dos animais em busca de sinais clínicos compatíveis com toxoplasmose como ascite, enterite, encefalite e pneumonia (DUBEY, 2010). As cepas foram consideradas virulentas quando houve mortalidade de 100% dos camundongos em até quatro semanas pós-infecção (p.i.), intermediariamente virulentas quando houve mortalidade entre 30% e 99% dos camundongos em até quatro semanas p.i., e não virulentas quando houve mortalidade menor que 30% dos camundongos em até quatro semanas p.i. (PENA et al., 2008).

### 3.3.2.4 *Pesquisa de Toxoplasma gondii nos camundongos*

Todos os camundongos inoculados que vieram a óbito foram necropsiados segundo técnicas específicas para esta espécie e examinados para a pesquisa de *T. gondii* no cérebro e nos pulmões (MATUSHIMA, 2007; PENA et al., 2008). Os camundongos sobreviventes mantidos por seis semanas (P.I.), quando então submetidos à eutanásia foram examinados para a presença de cistos teciduais de *T. gondii* no cérebro. Foram considerados infectados com *T. gondii*, os camundongos em que os estágios do parasito foram encontrados em seus tecidos. Foram colhidos cérebro e/ou pulmões de todos os camundongos examinados. Os órgãos foram macerados e homogeneizados em 1,5mL de solução salina e, então, armazenados separadamente em tubos e congelados a -70°C até o processamento das amostras para a extração do DNA (PENA et al., 2008; DUBEY, 2010; VITALIANO et al., 2014b).

## **3.3.3 Diagnóstico Biomolecular Direto a Partir de Amostras Primárias de Tecidos de Aves e Mamíferos Silvestres**

### 3.3.3.1 *Extração de DNA*

O DNA de *T. gondii* foi extraído, tanto dos tecidos dos camundongos infectados utilizados nos procedimentos de bioensaio, quanto dos tecidos digeridos provenientes das

aves e mamíferos silvestres (amostras primárias), por meio do Kit *Dneasy*<sup>®</sup> *Blood and Tissue Handbook* seguindo o protocolo *Spin-column*, segundo indicação do fabricante (QIAGEN<sup>®</sup>). Contudo, apenas para as amostras primárias, a quantidade do tampão utilizado para eluir o DNA (Buffer AE) foi reduzida de 200 para 50 µL, visando concentrar o DNA eluído.

### 3.3.3.2 Diagnóstico Biomolecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a extração do DNA, a solução contendo o material genético de cada amostra foi submetida ao diagnóstico biomolecular pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) simples, para triagem dos positivos. Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação em 25 µL: 10,1 µL de Água Ultrapura Estéril. 2,5 µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 4 µL do nucleotídeo (dNTP), 1,25 µL de cada um dos *primers* TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 µL de Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA extraído (PENA et al., 2008).

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'). Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,0-3,0%, contendo 0,3µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,04M; EDTA 0,001M), juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases, com eletroforese a 90 V por 90 minutos, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (*Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA, EUA*). Controles positivos com amostras de referência e controle negativo com água ultrapura estéril foram utilizados em todas as corridas de PCR. Este protocolo foi adaptado com base do protocolo descrito por Homan et al. (2000) para diagnóstico de *T. gondii* por PCR utilizando o fragmento 529 bp como alvo.

### 3.3.4 Caracterização Genética dos Isolados e das Amostras Primárias de *T. gondii*

#### 3.3.4.1 PCR Multiplex 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'GTTACCCGTCCTACTGCCAC3'), seguido de *nested*-PCR, utilizando 50µM



dos *primers* internos Tg18s58F (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3') e Tg18s348R (5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3') (DA SILVA et al., 2009).

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR *multiplex*, para uma reação em 25µL: 1,5 µL do produto da PCR *multiplex* pré-amplificado e 23,5 µL do mix de reação composto por 17,6 µL de água ultra pura estéril; 2,5 µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 2 µL de cada nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,15 µL de cada *primer* (5'SAG2 *Forward* e 5'SAG2 *Reverse*, ou SAG3 *Forward* e SAG3 *Reverse*), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µL de Taq DNA polimerase 5U/ µL. Na *nested*-PCR foi utilizada a mesma mistura e 1,5µL da amostra amplificada. A genotipagem dos controles positivos e das amostras de referência foi utilizada em todas as corridas de PCR e como controle negativo foi utilizado água ultrapura estéril. 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') (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007).

#### 3.3.4.2 Marcadores

Foram utilizados 12 marcadores capazes de distinguir, sem ambiguidade, as três linhagens clonais (tipo I, tipo II e tipo III) após a amplificação do DNA alvo e tratamento com uma ou duas enzimas de restrição N1aIII e MboI a 37°C por 60 minutos, com padrão de banda revelado em gel de agarose 2,5% (SU et al., 2006; PENA et al., 2008). As informações dos 12 marcadores foram baseadas nas seguintes referências: c22-8, c29-2, L358, PK1, 5'3'SAG2 e BTUB (KHAN et al., 2005; SU et al., 2006), SAG1 e SAG3 (GRIGG et al., 2001), alt. SAG2 (LEHMANN et al., 2006; SU et al., 2006), GRA6 (FAZAELI et al., 2000; SU et al., 2006), Apico (SU et al., 2006) e CS3 (KHAN et al., 2005). No Quadro 5 podem ser visualizadas as informações referentes aos marcadores que foram utilizados, localização, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), tamanho dos produtos obtidos e enzimas de restrição.

A genotipagem dos controles positivos e das amostras de referência utilizados em todas as corridas de PCR pode ser visualizada no Quadro 6. Como controle negativo foi utilizada a 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° 4'), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94° 30''), hibridização (60°C 1') e extensão (72°C 2') (SU et al., 2006; PENA et al., 2008).



Marcador	Nº cromossomo	PCR primers	Tamanho (bp)	Enzimas de Restrição	Digestão enzimática e eletroforese	Referência
Apico	Plastídeo	P43S1: CAACTCTCACCATTCCACCC-3 P43AS1: CGCCGTTGTTAGACAAGACA	640	<i>Afl</i> III, <i>Dde</i> I	NEB2, BSA, 37°C 60 min. 3% gel	Su et al. (2006)
CS3	Vila	CS3-F: GTGTATCTCCGAGGGGTCT CS3-R: TGTGACTTCTTCGCATCGAC	557	<i>Mbo</i> I, <i>Nla</i> III	NEB4, BSA, 37°C 60 min. 3% gel	Khan et al. (2005)

Quadro 6 – Amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controle positivo da reação de PCR simples, PCR multiplex e PCR-RFLP.

Marcadores genéticos												
Genótipos de referência	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

Legenda: \*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).

### 3.3.4.3 Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de DNA Gerados por Enzima de Restrição – RFLP

A fim de investigar o padrão de RFLP de amostra, 3µL de cada produto de *nested-PCR* foram misturados em 17 µL de reação de digestão contendo tampão NE (1x), 0,1mg/mL de BSA, e uma unidade de cada enzima de restrição N1aIII e MboI a 37°C por 60 minutos, com padrão de banda revelado em gel de agarose 2.5% (PENA et al., 2008). 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 0,3µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,04M; 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, EUA*).

As amostras positivas para *T. gondii* por PCR, foram submetidas a PCR-RFLP para genotipagem utilizando-se 12 marcadores SAG1, 3'5'SAG2, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, CS3 e Apico (PENA et al., 2011).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS OBSERVADOS NAS AVES E MAMÍFEROS SILVESTRES

Dentre os 105 animais que morreram durante o período deste estudo, e que tiveram seus órgãos colhidos e enviados ao laboratório para bioensaio em camundongos ou diagnóstico biomolecular direto, apenas dois (1,9%) exemplares de macacos-pregos-galegos apresentaram sinais clínicos e/ou alterações macroscópicas à necropsia compatíveis com toxoplasmose clínica. Ambos os animais pertenciam ao plantel do Zoológico do PEDI, sendo um macho adulto e um macho jovem.

O macaco-prego-galego nº 32 chegou a apresentar prostração e apatia, sem alterações à auscultação cardiopulmonar, com evolução do quadro para óbito em menos de 24 horas. Na necropsia observaram-se as seguintes alterações:

- Sufusões no parênquima pulmonar, que estava hemorrágico ao corte e possuía coleção líquida fluindo dos alvéolos, caracterizando edema pulmonar agudo.
- Coleção sero-sanguinolenta no pericárdio e congestão da musculatura cardíaca.
- Espessamento de membrana peritoneal com ingurgitamento de vasos peritoneais e da serosa dos intestinos, chegando a haver áreas de aderência entre as alças intestinais.
- Processo inflamatório grave na mucosa de todo o trato gastrintestinal, caracterizado por edema, hiperemia, e presença de conteúdo sanguinolento de consistência mucoide na luz dos intestinos.
- Presença de pontos esbranquiçados e enegrecidos no fígado, com aspecto de “noz moscada”, sugestivos de peri-hepatite fibrinosa, além de bordos abaulados e tamanho aumento para o padrão da espécie.
- Hipertrofia de linfonodos mesentéricos e submandibulares.
- Baço vinhoso e firme, porém com tamanho aumentado para o padrão da espécie e bordos abaulados.

O segundo macaco-prego-galego nº 96 foi encontrado morto no recinto, com sinais de hemoptise, sem ter apresentado previamente quaisquer sinais clínicos de enfermidades. Na necropsia observaram-se as seguintes alterações:

- Presença de sangue nas narinas, traqueia e brônquios.
- Hepatização pulmonar generalizada.
- Fígado de coloração heterogênea, com aspecto de “noz moscada”, de tamanho aumentado para o padrão da espécie, e com bordos abaulados.
- Presença de petéquias difusas em todo o parênquima renal.
- Vasos ingurgitados e espessamento na membrana peritoneal característicos de processo inflamatório.
- Mucosa do trato gastrintestinal edemaciada e hiperemica, com presença de conteúdo mucoide sanguinolento na luz dos intestinos.
- Hipertrofia generalizada dos linfonodos submandibulares e mesentéricos.

## **4.2 EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii***

Dos 165 animais silvestres examinados (59 aves e 106 mamíferos, 40 de vida livre e 125 de cativeiro), 87 (52,7%) foram positivos para anticorpos anti-*T. gondii*. Nas aves o percentual de soropositivos foi de 47,5% (28/59) e nos mamíferos foi de 55,6% (59/106). Considerando a origem, dentre os animais silvestres de vida livre e de cativeiro, 22,5% (9/40) e 61,6% (78/125) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, respectivamente. A porcentagem de animais silvestres soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*, segundo o grupo animal, classe, ordens e espécies, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Resultado dos exames sorológicos da ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* por meio do teste de aglutinação modificado (MAT), segundo o grupo animal, classe, ordens e espécies de aves e mamíferos silvestres de cativeiro e vida livre de Pernambuco. 2014-2015.

GRUPO ANIMAL	ESPÉCIE	NOME COMUM	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS / EXAMINADOS (%)	
			VIDA LIVRE	CATIVEIRO
CLASSE AVES				
Accipitriformes	<i>Heterospizias meridionalis</i>	gavião-caboclo	0/1 (0)	-
	<i>Harpia harpyja</i>	harpia	-	2/2 (100)
	<i>Rupornis magnirostris</i>	gavião-carijó	2/3 (66,7)	0/1 (0)
Cariamiformes	<i>Cariama cristata</i>	Seriema	-	0/1 (0)
Ciconiiformes	<i>Ciconia maguari</i>	maguari	-	1/1 (100)
Falconiformes	<i>Caracara plancus</i>	carcará	1/3 (33,3)	1/1 (100)
Galliformes	<i>Crax alector</i>	mutum-poranga	-	0/1 (0)
	<i>Crax globulosa</i>	mutum-fava	-	0/1 (0)
	<i>Crax fasciolatta</i>	mutum-de-penacho	-	1/1 (100)
	<i>Pauxi tuberosum</i>	mutum-cavalo	-	1/3 (33,3)
Passeriformes	<i>Pitangus sulphuratus</i>	bem-te-vi	0/1 (0)	-
Pelecaniformes	<i>Ardea alba</i>	garça-branca-grande	1/1 (100)	-
	<i>Cochlearius cochlearius</i>	arapapá	0/1 (0)	-
	<i>Nycticorax nycticorax</i>	socó-dorminhoco	0/2 (0)	-
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	papagaio-verdadeiro	-	1/3 (33,3)
	<i>Amazona amazonica</i>	papagaio-do-mangue	-	1/2 (50)

Continua

GRUPO ANIMAL	ESPÉCIE	NOME COMUM	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS / EXAMINADOS (%)	
			VIDA LIVRE	CATIVEIRO
CLASSE AVES				
Psittaciformes	<i>Ara ararauna</i>	arara-canindé	-	11/11 (100)
	<i>Ara chloropterus</i>	arara-vermelha-grande	-	1/3 (33,3)
	<i>Guaruba guarouba</i>	ararajuba	-	1/10 (10)
Rheiformes	<i>Rhea americana</i>	ema	-	1/1 (100)
Strigiformes	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	coruja-murucututu	2/2 (100)	0/1 (0)
	<i>Tyto furcata</i>	coruja-suindara	0/2 (0)	-
CLASSE MAMMALIA				
Artiodactyla	<i>Camelus bactrianus</i>	camelo	-	2/2 (100)
	<i>Cervus elaphus</i>	cervo-nobre	-	1/1 (100)
	<i>Hippopotamus amphibius</i>	hipopótamo	-	0/1 (0)
	<i>Mazama gouazoubira</i>	veado-catingueiro	-	1/3 (33,3)
	<i>Pecari tajacu</i>	cateto	-	1/1 (100)
	<i>Rusa unicolor</i>	cervo-sambar	-	0/1 (0)
	Carnivora	<i>Cerdocyon thous</i>	cachorro-do-mato	1/1 (100)
<i>Conepatus semistriatus</i>		cangambá	-	1/1 (100)
<i>Eira barbara</i>		papa-mel	-	2/2 (100)
<i>Galictis vittata</i>		furão	-	1/1 (100)
<i>Leopardus pardalis</i>		jaguaririca	-	2/2 (100)
<i>Leopardus tigrinus</i>		gato-do-mato-pequeno	-	1/2 (50)
<i>Lontra longicaudis</i>		lontra	-	4/4 (100)
				Continua



GRUPO ANIMAL	ESPÉCIE	NOME COMUM	Nº DE ANIMAIS	
			POSITIVOS / EXAMINADOS (%)	
CLASSE MAMMALIA			VIDA LIVRE	CATIVEIRO
Carnivora	<i>Nasua nasua</i>	quati	-	5/10 (50)
	<i>Panthera onca</i>	onça-pintada	-	3/4 (75)
	<i>Panthera tigris altaica</i>	tigre-siberiano	-	3/3 (100)
	<i>Procyon cancrivorus</i>	guaxinim	-	2/2 (100)
	<i>Puma concolor</i>	suçuarana	-	0/1 (0)
	<i>Puma yagouaroundi</i>	gato-mourisco	-	2/2 (100)
Cingulata	<i>Euphractus sexcinctus</i>	tatu-peba	-	1/1 (100)
Didelphimorphia	<i>Didelphis albiventris</i>	timbu	1/1 (100)	-
Perissodactyla	<i>Tapirus terrestris</i>	anta	-	1/2 (50)
Pilosa	<i>Bradypus variegatus</i>	preguiça-comum	0/4 (0)	-
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	-	0/1 (0)
Primates	<i>Ateles chameck</i>	macaco-aranha-da-cara-preta	-	2/3 (66,7)
	<i>Ateles marginatus</i>	macaco-aranha-da-testa-branca	-	1/1 (100)
	<i>Ateles paniscus</i>	macaco-aranha-da-cara-vermelha	-	2/2 (100)
	<i>Callithrix jacchus</i>	sagui-do-tufo-branco	0/9 (0)	-
	<i>Chlorocebus aethiops</i>	macaco-grivet	-	1/1 (100)
	<i>Lagothrix lagotricha</i>	macaco-barrigudo	-	0/1 (0)
	<i>Papio anubis</i>	babuíno-verde	-	1/1 (100)
	<i>Papio hamadryas</i>	babuíno-sagrado	-	2/2 (100)
	<i>Sapajus flavius</i>	macaco-prego-galego	-	5/9 (55,5)
				Continua

GRUPO ANIMAL	ESPÉCIE	NOME COMUM	Nº DE ANIMAIS POSITIVOS / EXAMINADOS (%)	
			VIDA LIVRE	CATIVEIRO
CLASSE MAMMALIA				
Primates	<i>Sapajus libidinosus</i>	macaco-prego	-	5/9 (55,5)
Rodentia	<i>Agouti paca</i>	paca	-	2/2 (100)
	<i>Dasyprocta agouti</i>	cutia	1/1 (100)	-
	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	capivara	-	1/1 (100)
	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	0/8 (0)	-
		<b>Subtotal</b>	9/40 (22,5)	78/125 (62,4)
		<b>TOTAL</b>	87/165 (52,7)	

#### **4.3 ISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii* EM ANIMAIS SILVESTRES E ANÁLISE DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS EM CAMUNDONGOS**

Dentre as 32 amostras encaminhadas para bioensaio em camundongos, uma (3,1%) proveniente de um socozinho (*Butorides striata*) de vida livre, oriundo da região metropolitana de Recife, PE, foi positiva para *T. gondii*. Durante o período de seis semanas pós-inoculação, nenhum dos três camundongos inoculados morreu ou apresentou sinais clínicos de toxoplasmose, revelando um perfil de baixa virulência desta cepa. Esta é a primeira descrição de isolamento de *T. gondii* nesta espécie de ave silvestre.

Todos os camundongos utilizados nos bioensaios e sorologicamente negativos (MAT) não estavam infectados com *T. gondii*, não sendo encontrados cistos do parasito nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente. Entretanto, todos os três camundongos que foram inoculados com homogenado do pool de tecidos do socozinho foram sorologicamente positivos (MAT $\geq$ 25) e foram encontrados cistos do parasito nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente.

#### **4.4 DIAGNÓSTICO BIOMOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* POR PCR SIMPLES A PARTIR DE AMOSTRAS PRIMÁRIAS**

Dentre as 73 amostras primárias de tecidos de aves e mamíferos silvestres encaminhadas para diagnóstico molecular por meio da técnica de PCR, sete (9,5%) foram positivas. Os resultados positivos estão descritos na Tabela 4.

#### **4.5 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Toxoplasma gondii* POR PCR-RFLP**

A caracterização genotípica de *T. gondii* pela técnica de PCR-RFLP foi realizada no único isolado de *T. gondii* obtido de um socozinho de vida livre por bioensaio em camundongos e nas sete amostras primárias positivas (7/73; 8,5%) obtidas a partir da PCR de triagem. Foram selecionadas para a genotipagem as amostras positivas para *T. gondii* que possuíram um padrão de banda positiva forte e clara. As Figuras 3 e 4 mostram respectivamente a localização das amostras de animais silvestres oriundos de vida livre e de cativeiro, que foram encaminhadas para o diagnóstico molecular direto ou para bioensaio em camundongos, destacando as localidades de onde se obtiveram amostras positivas.

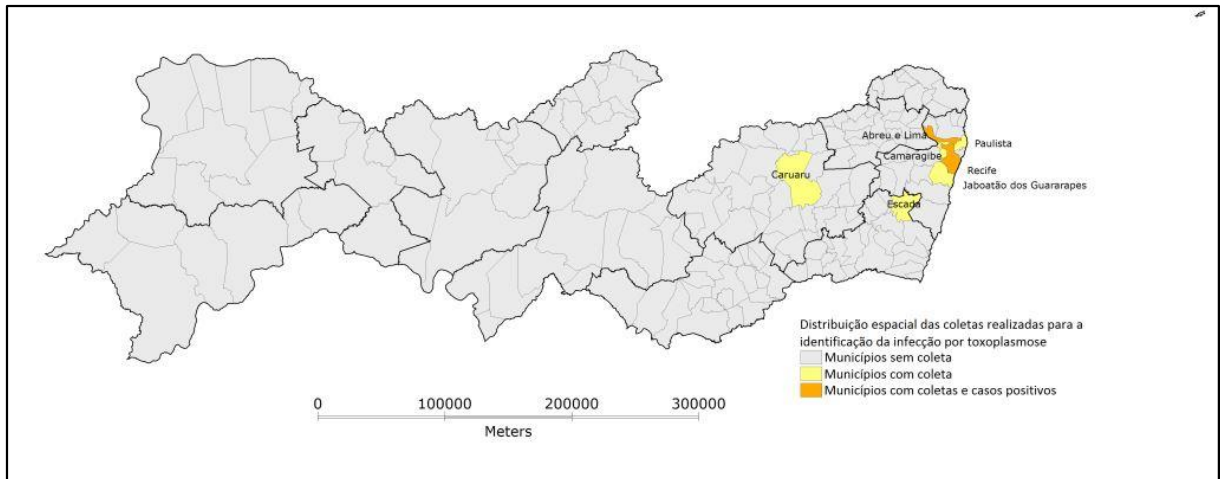


Figura 3: Mapa com os municípios de origem das amostras de tecidos de 59 aves e mamíferos silvestres de vida livre do estado de Pernambuco, encaminhadas para diagnóstico molecular direto ou bioensaio em camundongos. 2014-2015.

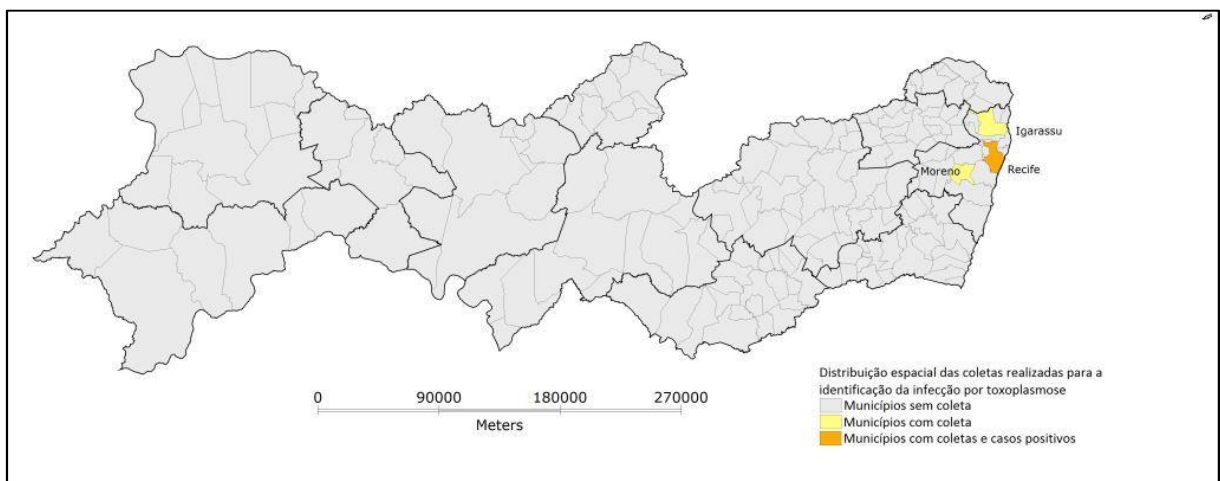


Figura 4: Mapa com os municípios de origem das amostras de tecidos de 46 aves e mamíferos silvestres de cativeiro do estado de Pernambuco, encaminhadas para diagnóstico molecular direto ou bioensaio em camundongos. 2014-2015.

Dentre as 32 amostras encaminhadas para bioensaio em camundongos, uma (3,1%) proveniente de um socozinho de vida livre, oriundo da região metropolitana de Recife, PE, foi positiva para *T. gondii*, da qual foi feito o protocolo de caracterização gênica, obtendo-se o genótipo #13.

Dentre as sete amostras positivas para *T. gondii* oriundas de diagnóstico molecular direto por PCR, foi possível a realizar a caracterização genotípica completa, isto é, a amplificação dos 12 marcadores, em uma (14,3%) amostra proveniente de uma lontra de cativeiro, obtendo o genótipo *Type* BrIII. Nas demais seis amostras, não houve a amplificação de todos os 12 marcadores (Tabela 4). A reação positiva da PCR simples da amostra da lontra

pode ser visualizada na Figura 5, onde os números 188, 189 e 190 são referentes à amplificação de DNA de *T. gondii* a partir de amostras primárias de Diafragma, Coração e Músculo da lontra (*Lontra longicaudis*) nº 55, respectivamente. A amplificação de DNA de *Toxoplasma gondii* a partir do controle positivo está identificada como RH.



Figura 5: Padrão de banda forte e clara dos números 188, 189 e 190, referentes à amplificação de DNA de *T. gondii* a partir de amostras primárias de diafragma, coração e músculo da lontra (*Lontra longicaudis*) nº 55, respectivamente.

Os resultados da caracterização genotípica do isolado de *T. gondii* do socozinho de vida livre e da amostra primária da lontra de cativeiro constam na Tabela 5.

Tabela 4: Amostras de tecidos positivas para *Toxoplasma gondii* por PCR simples em aves e mamíferos silvestres de vida livre e cativo em Pernambuco, 2014-2015.

ID	Espécie	Nome Comum	Origem	Localização Geográfica		Tecido Positivo	Genótipo
				Latitude	Longitude		
32	<i>Sapajus flavius</i>	macaco-prego-galego	Cativeiro	08°00'20,79"	34°56'51,85"	Diafragma	==
54	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	coruja-murucututu	Cativeiro	07°59'9.28"	34°55'54.89"	Cérebro	-
						Coração	-
64	<i>Lontra longicaudis</i>	lontra	Cativeiro	08°00'20,79"	34°56'51,85"	Coração	-
96	<i>Sapajus flavius</i>	macaco-prego-galego	Cativeiro	08°00'20,79"	34°56'51,85"	Coração	-
							-
98	<i>Falco sparverius</i>	gavião quiri-quiri	Vida Livre	07°55'17,23"	34°55'44,39"	Coração	-
						Músculo	-
101	<i>Butorides striata</i>	socozinho	Vida Livre	08°2'5.37"	34°55'8,97"	Coração	-
						Cérebro	-
						Músculo	-
105	<i>Lontra longicaudis</i>	lontra	Cativeiro	08°00'20,79"	34°56'51,85"	Coração	Type BrIII
						Músculo	-

Tabela 5: Genótipos *multilocus* de *Toxoplasma gondii* do isolado do socozinho (*Butorides striata*) de vida livre e da amostra primária da lontra (*Lontra longicaudis*) de cativeiro, obtidos por PCR-RFLP. Recife, Pernambuco. 2014-2015.

ID	Genótipo pela PCR-RFLP												Genótipo	Animal	Bairro
	Amostra	SAG1	5'3'SAG2	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	APICO			
28	I	I	I	I	I	III	II	III	III	I	III	-	#13	socozinho	Areias
105	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III	Type BrIII	lontra	Dois Irmãos

#### 4.6 RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E OS DIAGNÓSTICOS BIOMOLECULAR E POR ISOLAMENTO

Na Tabela 6 estão dispostos os resultados encontrados nas amostras que foram submetidas a mais de um método de diagnóstico da infecção por *T. gondii* (associação de sorologia + PCR direta ou associação de sorologia + bioensaio em camundongos). É possível notar divergência entre os resultados dos métodos diagnósticos em 10 animais (caselas marcadas na cor laranja), onde o exame sorológico foi positivo (caselas marcadas na cor azul), mas o bioensaio ou a PCR direta foram negativos (caselas marcadas na cor vermelha). O oposto (MAT negativo e PCR ou bioensaio positivos) não ocorreu em nenhum caso.

Tabela 6: Resultados obtidos na associação de métodos para diagnóstico de *T. gondii* (MAT + Bioensaio e MAT + PCR), em aves e mamíferos silvestres de vida livre e cativeiro em Pernambuco. 2014 – 2015.

ID	Espécie	Nome Comum	MAT	Bioensaio	PCR
001	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Não Realizado	Negativo
002	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Não Realizado	Negativo
003	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Não Realizado	Negativo
005	<i>Procyon cancrivorus</i>	guaxinim	Positivo	Negativo	Não Realizado
012	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Não Realizado	Negativo
017	<i>Guaruba guarouba</i>	ararajuba	Negativo	Não Realizado	Negativo
018	<i>Guaruba guarouba</i>	ararajuba	Negativo	Não Realizado	Negativo
024	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Não Realizado	Negativo
026	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Negativo	Não Realizado
030	<i>Bradypus variegatus</i>	preguiça-comum	Negativo	Negativo	Não Realizado
032	<i>Sapajus flavius</i>	macaco-prego-galego	Positivo	Não Realizado	Positivo
033	<i>Caracara plancus</i>	carcará	Negativo	Negativo	Não Realizado
034	<i>Rattus rattus</i>	rato-preto	Negativo	Negativo	Não Realizado
044	<i>Leopardus tigrinus</i>	gato-do-mato-pequeno	Positivo	Não realizado	Negativo
046	<i>Rupornis magnirostris</i>	gavião-carijó	Negativo	Negativo	Não Realizado
051	<i>Nycticorax nycticorax</i>	socó-dorminhoco	Negativo	Negativo	Não Realizado
053	<i>Tyto furcata</i>	coruja-suindara	Negativo	Não Realizado	Negativo
055	<i>Lontra longicaudis</i>	lontra	Positivo	Não Realizado	Positivo
062	<i>Rupornis magnirostris</i>	gavião-carijó	Positivo	Negativo	Não Realizado
064	<i>Lontra longicaudis</i>	lontra	Positivo	Não Realizado	Positivo
069	<i>Caracara plancus</i>	carcará	Positivo	Não realizado	Negativo
072	<i>Rupornis magnirostris</i>	gavião-carijó	Positivo	Não realizado	Negativo
076	<i>Pitangus sulphuratus</i>	bem-te-vi	Negativo	Não Realizado	Negativo

Continua

ID	Espécie	Nome Comum	MAT	Bioensaio	PCR
078	<i>Callithrix jacchus</i>	sagui-do-tufo-branco	Negativo	Não Realizado	Negativo
082	<i>Cochlearius cochlearius</i>	arapapá	Negativo	Não Realizado	Negativo
085	<i>Bradypus variegatus</i>	preguiça-comum	Negativo	Não Realizado	Negativo
087	<i>Crax alector</i>	mutum-poranga	Negativo	Não Realizado	Negativo
099	<i>Crax fasciolatta</i>	mutum-de-penacho	Negativo	Não Realizado	Negativo
106	<i>Bradypus variegatus</i>	preguiça-comum	Negativo	Não Realizado	Negativo
134	<i>Crax globulosa</i>	mutum-fava	Negativo	Não Realizado	Negativo
137	<i>Ardea alba</i>	garça-branca-grande	Positivo	Não realizado	Negativo
138	<i>Mazama gouazoubira</i>	veado-catingueiro	Negativo	Não Realizado	Negativo
140	<i>Bradypus variegatus</i>	preguiça-comum	Negativo	Não Realizado	Negativo
144	<i>Rhea americana</i>	ema	Positivo	Não realizado	Negativo
153	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	coruja-murucututu	Positivo	Negativo	Não realizado
159	<i>Mazama gouazoubira</i>	veado-catingueiro	Positivo	Negativo	Não realizado
183	<i>Procyon cancrivorus</i>	guaxinim	Positivo	Não realizado	Negativo

Legenda: MAT – Teste de Aglutinação Modificado. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

## 5 DISCUSSÃO

O Brasil possui uma das maiores diversidades biológicas de animais silvestres de todo mundo (ANDRIOLO, 2007). Antes do seu descobrimento pelos portugueses os ecossistemas praticamente viviam intactos e as ações devastadoras do homem ao meio ambiente eram muito insignificantes. Neste período, os indígenas possuíam uma relação bastante harmônica com a natureza e viviam da caça e da pesca em áreas específicas. Os biomas eram praticamente intactos e provavelmente existia um equilíbrio na relação hospedeiro-parasita.

Infelizmente, após o início do século XV com as colonizações portuguesa, francesa e holandesa em diversos locais no Brasil, houve o início da exploração desenfreada dos recursos naturais, que afetou diretamente a flora e a fauna nativas. Atualmente, as maiores causas do declínio das populações de animais silvestres na natureza são a destruição e a fragmentação dos seus habitats em consequência do desenvolvimento econômico agrícola e pecuário, da exploração de madeira e mineração, das construções de represas e hidrelétricas, expansão urbana, além dos atropelamentos, tráfico e da perseguição direta na forma de caça e abate (CUBAS et al., 2014).

O tráfico de animais silvestres é considerado a terceira maior atividade ilegal no mundo, atrás apenas do tráfico de armas e de drogas (RENCTAS, 2016). A caça de animais



silvestres existe em vários estados do Brasil, inclusive no estado de Pernambuco, sendo este estado importante rota de tráfico no nordeste brasileiro. Esta atividade ilegal constitui-se uma séria ameaça para a conservação da fauna, e a exposição e proximidade do homem com os animais silvestres com finalidade de tráfico, caça, consumo, companhia e/ou produção traz graves consequências ao desequilíbrio dos ecossistemas e habitats, além da proporcionar uma possível transmissão de patógenos entre animais silvestres e humanos (CHIARELLO, 2000; ALVES et al., 2012; MARVULO e CARVALHO, 2014; RECNTAS, 2016).

Os animais silvestres participam da epidemiologia de diversas zoonoses de importância na saúde pública, atuando como hospedeiros e reservatórios. Neste contexto, 61% (868/1.415) dos patógenos humanos são zoonóticos e 175 espécies patogênicas estão associadas com doenças consideradas emergentes (TAYLOR et al., 2001). Além disso, a maioria das doenças infecciosas emergentes são zoonoses, e os animais selvagens estão envolvidos na epidemiologia da maioria delas em cerca de 70%, e servem como principais reservatórios para a transmissão dos agentes etiológicos para animais domésticos e seres humanos (JONES et al., 2008). Dentre as principais zoonoses no contexto de saúde pública, destaca-se a toxoplasmose com a necessidade de maiores estudos da infecção por *T. gondii* em animais silvestres em diversos estados do Brasil e em Pernambuco. Este contato mais íntimo entre o homem e os animais silvestres faz com que haja um maior intercâmbio entre as diferentes linhagens circulantes de parasitos em animais silvestres e em meio urbano, entre eles *T. gondii*, podendo gerar graves quadros clínicos de doenças em humanos (DEMAR et al., 2008; CARME et al., 2009; VITALIANO et al., 2014b).

No estado de Pernambuco, no período de março de 2014 a setembro de 2015, no presente estudo foi possível obter amostras de 113 aves e de 120 mamíferos silvestres de vida livre e cativeiro. Em vida livre, as espécies dos animais silvestres foram procedentes dos biomas de Mata Atlântica e Caatinga, e de áreas de transição entre estes dois biomas. Na Mata Atlântica da Região Metropolitana do Recife, de onde se obteve a maioria das amostras biológicas existe uma grande população humana que reside próximo das áreas de matas e uma grande pressão antrópicas neste bioma. Os humanos possuem criações de animais domésticos, inclusive gatos, que como hábito natural deste animal adentra áreas de matas principalmente para caçar. Estes animais podem se infectar com *T. gondii* e eliminar oocistos, contaminando assim o meio ambiente e expondo aves e mamíferos à exposição da infecção por este agente.

Considerando os animais silvestres de cativeiro eles foram oriundos de duas instituições: o zoológico do PEDI e o CETAS-PE. Os zoológicos por possuírem um plantel fixo e diversos elos da cadeia de transmissão da toxoplasmose (presença de gatos

sinantrópicos e felídeos silvestres, presença de insetos e roedores sinantrópicos), podem proporcionar uma maior infecção dos animais alojados (SILVA et al, 2007). Além disso, este zoológico está inserido numa Unidade de Conservação com a presença de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) de vida livre que chegam muito próximos dos recintos. No CETAS-PE, de acordo com a sua finalidade, diariamente são recebidos animais silvestres em diferentes habitats e criados como animais de estimação. Os animais de vida livre encaminhados ao CETAS-PE e que foram positivos para *T. gondii* e para anticorpos anti-*T. gondii* podem ser considerados animais sentinelas para o estudo deste protozoário.

No geral, o diagnóstico de infecção por *T. gondii* por métodos sorológicos, biomoleculares e isolamentos em aves silvestres no Brasil já foi descrito tanto para animais de cativeiro (SOGORB et al., 1972; SILVA et al., 2001a; LEITE et al., 2007; VITALIANO et al., 2010), quanto para animais de vida livre (GONDIM et al., 2010; LIMA et al., 2011; COSTA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013; BARROS et al., 2014; VITALIANO et al., 2014a), mas trabalhos envolvendo o diagnóstico por métodos moleculares ainda são escassos, especialmente no Nordeste do país (GONDIM et al., 2010).

Os resultados encontrados nesta pesquisa (a ocorrência de toxoplasmose fatal em dois macacos-pregos-galegos do zoológico do PEDI; a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em 52,7% (87/165) em animais silvestres, sendo 47,5% (28/59) em aves e em 55,6% (59/106) em mamíferos; o isolamento do genótipo #13 de *T. gondii* de um socozinho vida livre procedente do bairro de Areias, Recife-PE; e a genotipagem de uma amostra primária de lontra do zoológico do PEDI obtendo-se o *Type* BrIII) trazem importantes contribuições para o estudo de *T. gondii* no estado de Pernambuco.

Os sinais clínicos (anorexia, apatia e hemoptise) apresentados pelo macaco-prego-galego (nº 32) e a morte súbita do macaco-prego-galego do caso (nº 96) são condizentes com os achados clínicos de toxoplasmose fatal já descritos em outras espécies de primatas neotropicais (EPIPHANIO et al., 2000; EPIPHANIO et al., 2003; CASAGRANDE et al., 2013). Em ambos os macacos-pregos-galegos as alterações anatomopatológicas macroscópicas também foram similares às descritas em outros estudos que identificaram *T. gondii* como agente causal da enfermidade primária que levou ao óbito primatas neotropicais, de espécies variadas, e oriundos de cativeiro e vida livre (EPIPHANIO et al., 2000; EPIPHANIO et al., 2003; CASAGRANDE et al., 2013). Como esta espécie está inserida em um programa de conservação *ex situ* necessita-se de maiores investigações da cadeia epidemiológica da toxoplasmose no zoológico do PEDI visando melhorar os protocolos de

biossegurança. O presente estudo vem a contribuir significativamente na melhoria destes protocolos.

A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* pelo MAT foi alta (52,7%; 87/165) no presente estudo, sendo a soropositividade mais presente nos ambientes cativos (62,4%; 78/125) do que na natureza (22,5%; 09/40). A maioria das aves e mamíferos soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* em cativeiro em Pernambuco foi procedente do zoológico do PEDI (74/87; 85,05%). Os outros 14,95% (13/87) foram procedentes do CETAS Tangará, sendo nove animais de vida livre (69,2%; 09/13) e quatro animais de cativeiro (30,8%; 04/13). O fato de a maioria dos animais ser procedente de cativeiro, e mais especificamente do zoológico do PEDI, possivelmente está associado à facilitação da manutenção do ciclo epidemiológico da doença nos ambientes *ex situ*, devido à presença muitos dos elos da cadeia epidemiológica, conforme citado Silva et al. (2007) e Ferreira et al. (2015).

A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos silvestres mantidos em cativeiro no estado de Pernambuco (68,29%; 56/82) obtida neste estudo foi similar à encontrada em estudos em 13 zoológicos do Brasil (SILVA et al., 2001b), nos estados de São Paulo (SOGORB et al., 1972; VITALIANO et al., 2004; ANDRÉ et al., 2010); Minas Gerais (VITALIANO et al., 2004; RIVETTI JÚNIOR et al., 2008), Distrito Federal (VITALIANO et al., 2004; ANDRÉ et al., 2010) e Mato Grosso (ANDRÉ et al., 2010). Já com relação às em aves silvestres mantidas em cativeiro no estado de Pernambuco, a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* (51,16%; 22/43) neste estudo foi menor do que a encontrada por Leite et al. (2007), que pesquisaram aves da família Cracidae (mutuns, urumutuns, jacus e jacutingas) no mesmo estado e obtiveram o percentual de 84,92% (214/252); e maior do que a encontrada por Sogorb et al. (1972) e Minervino et al. (2010) que não encontram nenhuma ave soropositiva nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Norte.

Com relação aos mamíferos soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii* em vida livre, os resultados do presente estudo (12,5%; 03/24) também corroboraram com os encontrados em outras pesquisas realizadas nos estados de Goiás (FERREIRA et al., 1997), São Paulo (FERREIRA et al., 1997; GENNARI et al., 2004; VITALIANO et al., 2014a), Paraná (GENNARI et al., 2004; GARCIA et al., 2005; TRUPPEL et al., 2010), Paraíba (GENNARI et al., 2004), Rio Grande do Sul (GENNARI et al., 2004); Amazonas (SANTOS et al., 2011) e Pernambuco (COSTA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2013). Já em se tratando de aves silvestres de vida livre, a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* neste estudo (37,5%; 6/16) foi maior do que todos os relatos encontrados em literatura específica (GONDIM et al., 2010;

LIMA et al., 2011; COSTA et al., 2012; BARROS et al., 2014; VITALIANO et al., 2014b; ANDRADE et al., 2016).

É possível que a diferença encontrada nos resultados sorológicos deste estudo, quando comparados outros estudos com aves e mamíferos silvestres de vida livre no Brasil, seja explicada pelo tipo de amostragem utilizada. Apenas no estudo realizado por Vitaliano et al. (2014a) no estado de São Paulo utilizou-se amostragem similar à do presente estudo, utilizando múltiplas espécies de aves e mamíferos de vida livre e de cativeiro, com amostragem por conveniência. Os demais artigos publicados que foram usados como referência para a comparação de resultados, focam em um grupo específico de animais (FERREIRA et al., 1997; GENNARI et al., 2004; GARCIA et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2016) ou em uma única espécie animal (GONDIM et al., 2010; TRUPPEL et al., 2010; LIMA et al., 2011; SANTOS et al., 2011; COSTA et al., 2012; BARROS et al., 2014). Além disso, nem todos os trabalhos utilizaram o MAT como técnica para diagnóstico de animais soropositivos.

Dentre os animais silvestres que apresentaram 100% de soropositividade neste estudo, em 16 espécies possuem hábitos carnívoros (carcará, gato-mourisco, harpia, jaguatirica, lontra, maguari e tigre-siberiano) ou onívoros (babuíno-verde, babuíno-sagrado, cangambá, cateto, guaxinim, mutum-de-penacho, ema, furão, macaco-grivet e tatu-peba), e possivelmente se infectaram pela ingestão de cistos teciduais de *T. gondii* por canivorismo, conforme citam Silva et al. (2007) e Dubey (2010). Entretanto, cinco espécies herbívoras também apresentaram 100% de soropositividade para anticorpos anti-*T. gondii* neste estudo (arara-canindé, camelo, cervo-nobre, macaco-aranha-da-cara-vermelha e macaco-aranha-da-testa-branca), sendo todas elas do zoológico do PEDI. Tal fato pode ser explicado pelo fato de que, neste zoológico, segundo relatos dos técnicos responsáveis pelos animais em questão, todos costumam forragear no chão dos recintos durante muito tempo, o que pode aumentar as chances de infecção por ingestão de itens da ambientação dos recintos ou areia do solo contaminados por oocistos carregados por insetos rasteiros, conforme possibilidade levantada por Silva et al. (2007), Pimentel et al. (2009) e Ferreira et al. (2015).

Algumas espécies de animais silvestres incluídas neste estudo tiveram 100% de soronegativos para anticorpos anti-*T. gondii* (cervo-sambar, coruja-murucututu, coruja-suindara, hipopótamo, macaco-barrigudo e tamanduá-mirim). As corujas vieram do CETAS Tangará, e apesar de ambas possuírem hábitos carnívoros, ao que tudo indica, não entraram em contato com o agente. As outras espécies animais são todas pertencentes ao plantel do zoológico do PEDI, não possuem hábitos carnívoros (exceto o tamanduá-mirim), e segundo

os técnicos responsáveis não costumam ser vistas forrageando no chão com frequência. No caso o exemplar de tamanduá-mirim, apesar do hábito insetívoro mais voltado para o consumo de cupins, é possível que não tenha se infectado por conta de a dieta oferecida no zoológico incluir basicamente papa preparada com ingredientes selecionados e passar por cozimento, o que reduz significativamente o risco de infecção por *T. gondii*. Além disso, quando se oferece cupinzeiros aos animais, são oferecidas colônias arborícolas, o que também reduz a possibilidade de estarem contaminadas com oocistos de *T. gondii*.

O restante das espécies de animais silvestres inclusos neste estudo que apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* (Tabela 3), tiveram percentuais de soropositividade que variaram de 33,3 a 66,7%. Tais resultados são similares aos encontrados em estudos realizados em outros zoológicos e instituições que trabalham com manejo de fauna silvestre *ex situ* no Brasil (SOGORB et al., 1972; SILVA et al., 2001a e b; VITALIANO et al., 2004; LEITE et al., 2007; MATTOS et al., 2008; PIMENTEL et al., 2009; ANDRÉ et al., 2010; CATENACCI et al., 2010; MINERVINO et al., 2010; ULLMANN et al., 2010; FERREIRA et al., 2015; ATTADAMO et al., 2016), porém as diferenças metodológicas no tocante às espécies animais envolvidas, tipo de exame diagnóstico realizado, e protocolos internos de manejo diário e medicina veterinária preventiva de cada instituição, certamente influenciam na diferença entre os resultados.

Todos os primatas de vida livre foram da espécie sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) e foram 100% soronegativos, corroborando com informação disponível na literatura, de que estes animais são altamente sensíveis ao óbito agudo por toxoplasmose (SILVA, 2007; DUBEY, 2010), o que explicaria o percentual encontrado neste estudo, uma vez que os animais morrem antes que possam criar anticorpos anti-*T. gondii*. Da mesma forma, todos os Píloso foram 100% soronegativos, o que pode ser explicado pelos hábitos arborícolas das espécies incluídas neste estudo (Preguiça-comum e Tamanduá-mirim), que dificulta o contato com oocistos (MIRANDA, 2014).

Outro fato interessante observado no presente estudo é que todos os primatas oriundos de cativeiro foram do zoológico do PEDI, e possuem alto percentual de animais soropositivos (65,5%; 19/29). Das nove espécies inclusas no estudo (macaco-aranha-da-cara-preta, macaco-aranha-da-cara-vermelha, macaco-aranha-da-testa-branca, macaco-barrigudo, macaco-prego, macaco-prego-galego, macaco-grivet, babuíno-verde e babuíno-sagrado), apenas três não são neotropicais (macaco-grivet, babuíno-verde e babuíno-sagrado). Dentre os primatas neotropicais supracitados, houve apenas dois casos de óbito por toxoplasmose em dois exemplares de macaco-prego-galego, com índices altos de soropositivos vivos e clinicamente

saudáveis entre os gêneros *Ateles* sp. e *Sapajus* sp., o que contradiz os relatos da literatura sobre a sensibilidade dos primatas neotropicais à toxoplasmose (SILVA, 2007; DUBEY, 2010). Este fato pode ser explicado por provável infecção por cepas de baixa virulência, além do fato de os animais estarem em cativeiro sob excelentes condições nutricionais e com cuidados médicos veterinários constantes, reduzindo a taxa de óbitos. Entretanto, tal fato alerta para a necessidade de monitoramento constante dos primatas soropositivos, a fim de continuar mantendo seu estado de higidez clínica.

Com relação ao resultado da prova do bioensaio em camundongos, o socozinho positivo para *T. gondii* foi oriundo de vida livre do bairro de Areias, em Recife-PE. Esta ave geralmente vive nas proximidades de cursos d'água em áreas densamente povoadas por humanos, e tal hábito associado ao fato desta espécie ter dieta composta por peixes e outros organismos aquáticos (GWYNNE et al., 2010), leva a crer que a provável via de transmissão tenha sido a ingestão de oocistos nas águas contaminadas por esgotos domésticos. Estes resultados indicaram que esta espécie é um hospedeiro intermediário e pode ser utilizada como um bioindicador da infecção por *T. gondii* dentre a fauna silvestre sinantrópica.

As espécies de animais silvestres nas quais já foram isoladas cepas de *T. gondii* por meio do bioensaio em camundongos foram: capivara (YAI et al., 2009), bugio-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul*) (PENA et al., 2011), gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) (PENA et al., 2011), gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) (PENA et al., 2011), morcego-beija-flor (*Glossophaga soricina*) (CABRAL et al., 2013), morcego-de-cauda-livre (*Molossus molossus*) (CABRAL et al., 2013), morcego-vampiro (*Desmodus rotundus*) (CABRAL et al., 2013) e avoantes (*Zenaida auriculata*) (BARROS et al., 2014). Nestas pesquisas, apenas o gato-mourisco e o bugio-de-mãos-ruivas foram de cativeiro e foram procedentes do zoológico do PEDI, Recife-PE. Desta forma, o isolamento de *T. gondii* no socozinho obtido no presente estudo representou a primeira descrição em uma ave silvestre de vida livre do Nordeste do Brasil.

No presente estudo, o percentual de animais silvestres positivos para *T. gondii* no bioensaio em camundongos foi de 1,8% (1/32). Estes resultados percentuais foram similares aos encontrados por Vitaliano et al. (2014b), 6,6% (15/226), cuja amostragem também foi por conveniência, com colheita de tecidos de diferentes espécies animais. O fato de a maioria das amostras encaminhadas para bioensaio em camundongos não ter passado por triagem sorológica prévia devido ao animal ter morrido antes que se pudesse proceder colheita do sangue, pode ter influenciado no percentual de isolamentos encontrado no presente estudo.

Considerando os resultados positivos para infecção por *T. gondii* obtidos por PCR simples a partir de amostras primárias de tecidos de aves e mamíferos silvestres de Pernambuco, o presente estudo obteve um percentual de 9,6% (7/73). Este resultado corroborou com os resultados encontrados por Gondim et al. (2010), Truppel et al. (2010), Cañón-Fránco et al. (2013) e Vitaliano et al. (2014b). No presente estudo, dois macacos-pregos-galegos, duas lontras (*Lontra longicaudis*), uma coruja-murucututu (*Pulsatrix perspicillata*), um gavião quiri-quiri (*Falco sparverius*) e um socozinho foram positivos para *T. gondii* por PCR simples a partir de amostras primárias, sendo estes os primeiros relatos de diagnóstico de *T. gondii* nestas espécies por PCR simples a partir de amostras primárias no Brasil.

As espécies positivas por PCR no presente estudo foram todas carnívoras, com exceção dos dois macacos-pregos-galegos que são onívoros, o que justifica a facilidade de exposição ao *T. gondii* por todas as formas infectantes. Além disso, as duas lontras e os dois macacos-pregos-galegos foram oriundos do zoológico do PEDI, e outros três animais (coruja-murucututu, gavião quiri-quiri e socozinho) foram oriundos do CETAS Tangará, sendo os apenas a coruja-murucututu classificada como proveniente de cativeiro. No caso dos macacos-pregos-galegos, espécie criticamente ameaçada de extinção e que necessita de programa de conservação *ex situ* (ALFARO et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; IUCN, 2016), a detecção deste agente tem importância ainda maior, pois somado aos achados clínicos e de necropsia, e aos resultados dos exames sorológicos positivos nos mesmos indivíduos descritos anteriormente, traz indícios contundentes de óbito por toxoplasmose. Isto implica na necessidade de aumentar ações em medicina veterinária preventiva e avaliar possível tratamento dos animais positivos vivos, para que possam contribuir de maneira mais efetiva com o programa de reprodução para conservação *ex situ* desta espécie no zoológico do PEDI.

O isolado obtido neste estudo a partir de *pool* tecidos de um socozinho de vida livre, e submetido à técnica de PCR-RFLP foi caracterizado como pertencente ao genótipo #13. Este genótipo também foi encontrado em galinhas, caprinos, ovinos, suínos, bugio-de-mãos-ruivas no Nordeste do Brasil, apontando uma similaridade entre as cepas isoladas (DUBEY et al., 2008; RAGOZO et al., 2010; PENA et al., 2011; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013). No presente estudo, obteve-se a primeira descrição do genótipo #13 em aves silvestres e na espécie *Butorides striata* (socozinho) no Brasil. O fato deste indivíduo ter sido resgatado pelo órgão ambiental do estado de Pernambuco poucos dias antes do óbito, apontou que a infecção foi adquirida na natureza, levando a crer que haja uma similaridade entre os genótipos

isolados de animais silvestres de vida livre com os isolados de animais domésticos e do bugio-de-mãos-ruivas oriundo do zoológico do PEDI, Recife-PE.

Dentre as sete amostras submetidas a diagnóstico biomolecular direto por PCR simples, todas foram submetidas à técnica de PCR-RFLP para genotipagem, porém em apenas uma se conseguiu amplificação de todos os 12 *locus*, sendo esta caracterizada como genótipo *Type BrIII*. Tal amostra foi proveniente de uma lontra mantida em cativeiro no zoológico do PEDI, e estudos prévios apontam ampla circulação deste genótipo no Brasil, com descrição em variadas espécies: cães, gatos, ovinos, capivaras e galinhas (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; RAGOZO et al., 2010). Entretanto, esta é a primeira descrição deste genótipo em lontra e a primeira descrição deste genótipo na região Nordeste do Brasil. Mais uma vez, o resultado obtido do presente estudo sugere uma provável similaridade entre os genótipos circulantes entre animais de companhia, animais de produção, e animais silvestres de vida livre e de cativeiro.

No presente estudo, comparando-se os resultados obtidos nos exames sorológicos com os obtidos no bioensaio em camundongos e diagnóstico biomolecular a partir de amostras primárias, observou-se que 10 animais apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, mas tiveram bioensaios e/ou PCR negativos, conforme pode ser observado na Tabela 6. O oposto não ocorreu em nenhum caso. Tal fato sugeriu que possa ter havido soroconversão sem encistamento de *T. gondii* nos órgãos de eleição para isolamento do agente, podendo o encistamento de bradizoítos ter ocorrido em órgãos não utilizados neste estudo, ou mesmo não ter existido devido à infecção por cepas não cistogênicas (DUBEY, 2010). Outra explicação possível é que, no caso dos diagnósticos biomoleculares, quando feitos a partir de amostras primárias (sem passagem em camundongos – prova biológica), pode haver uma quantidade de cistos tão pequena, que inviabiliza a amplificação do material genético, levando a resultados falso-negativos na PCR (DUBEY, 2010).

A confirmação dos dois genótipos identificados neste estudo (genótipo #13 e *Type BrIII*) reforça a hipótese da alta diversidade genética do *T. gondii* no Brasil, e que o seu ciclo silvestre tem grande importância nesta diversidade. Estes achados proporcionam novas perspectivas para o estudo dos isolados de animais silvestres do estado de Pernambuco e reforçam a importância deste importante agente zoonótico para a população humana, principalmente mulheres gestantes e pessoas imunossuprimidas, visando à Promoção de Saúde de acordo com a nova filosofia de “saúde única”.

Apesar do número reduzido de estudos feitos com caracterização gênica de cepas de *T. gondii* em animais silvestres no Brasil, os resultados obtidos já trazem importantes



informações sobre as características genotípicas e de virulência das cepas deste agente que circulam tanto em meio silvestre, quanto em meio urbano ou rural em nosso país. O aprofundamento das pesquisas neste campo no estado de Pernambuco, utilizando a fauna silvestre brasileira, é de extrema importância para responder questões não só do ponto de vista da saúde coletiva, como também da conservação da vida silvestre, auxiliando em estratégias para prevenção desta zoonose.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- O estudo reforçou a necessidade dos aprimoramentos dos programas de saúde animal, medicina veterinária preventiva e biossegurança, visando o controle da toxoplasmose em zoológicos e Centros de Triagens de Animais Silvestres, especialmente os que possuem espécies ameaçadas de extinção como os macacos-pregos-galegos.
- A ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves e mamíferos silvestres em vida livre e cativeiro no estado de Pernambuco foi alta (52,7%, 87/165), com maiores percentuais encontrados em animais de cativeiro (62,4%, 78/125) do que em animais de vida livre (22,5%, 09/40).
- O genótipo #13 de *T. gondii* isolado do socozinho (*Butorides striata*) do entorno da Mata Atlântica de Recife corrobora com a existência de maior variabilidade genética deste protozoário no Brasil, reforçando a necessidade de aprofundamento de pesquisas neste campo.
- Pela primeira vez na literatura foi realizado o diagnóstico biomolecular de *T. gondii* a partir de amostras primárias de coruja-murucututu (*Pulsatrix perspicillata*), gavião quiri-quiri (*Falco sparverius*), lontra (*Lontra longicaudis*), macaco-prego-galego (*Sapajus flavius*) e socozinho (*Butorides striata*).
- A obtenção do genótipo de *T. gondii* a partir de amostras primárias de tecidos de animais silvestres foi possível, entretanto apresenta menor eficácia quando comparada às amostras originadas de bioensaio em camundongos.
- O genótipo Type BrIII de *T. gondii* foi pela primeira vez identificado em uma lontra (*Lontra longicaudis*) e na Região Nordeste do Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; TIBAYRENC, M., DARDÉ, M. L. Microsatelite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 27–38, 2002.
- ALFARO, J. W. L.; IZAR, P.; FERREIRA, R. G. Capuchin monkey research priorities and urgent issues. **American Journal of Primatology**, v. 76, p. 705–720, 2014.
- ALVES, R. R. N.; GONÇALVES, M. B. R.; VIEIRA, W. L. S. Caça, uso e conservação de vertebrados no semi-árido brasileiro. **Tropical Conservation Science**, v. 5, p. 394–416, 2012.
- ANDRADE, M. C. R.; COELHO, J. M. C. O.; AMENDOEIRA, M. R. R.; VICENTE, R. T.; CARDOSO, C. V. P.; FERREIRA, P. C. B.; MARCHEVSKY, R. S. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1724–1727, 2007.
- ANDRADE, L. H. M.; LUGARINI, C.; OLIVEIRA, R. A. S.; SILVA, L. T. R.; MARVULO, M. F. V.; GARCIA, J. E.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em aves silvestres de três Unidades de Conservação Federais da Paraíba e da Bahia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, no prelo, 2016.
- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; BORTOLLI, C. P.; 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 canids and felids. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 1007 – 1009, 2010.
- ANDRIOLO, A. Desafios para conservação da fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, p. 19-25, 2007.

ATTADEMO, F. L. N.; RIBEIRO, V. O.; SOARES, H. S.; LUNA, F. O.; SOUSA, G. P.; FREIRE, A. C. B.; GENNARI, S. M.; ALVES, L. C.; MARVULO, M. F. V.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive Antillean manatee (*Trichechus manatus*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, no prelo, 2016.

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.

BARROS, L. D.; TARODA, A.; ZULPO, D. L.; CUNHA, I .A. L.; SAMMI, A. S.; CARDIM, S. T.; MIURA, A. C.; SU, C.; MACHADO, R. Z.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J. L. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 443 – 448, 2014.

BOUER, A.; WERTHER, K.; MACHADO, R. Z.; NAKAGHI, A. C. H.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J. L. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally and naturally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and indirect ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 26 – 31, 2010.

CABRAL, A. D.; GAMA, A. R.; SODRÉ, M. M.; SAVANI, E. S. M. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; JORDÃO, L. R.; MAEDA, M. M.; YAI, L. E. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 100–104, 2013.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A. P.; LÓPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M. A.; KEID, L. B.; DALLA-ROSA, C.; CABRAL, A. D.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 462–469, 2013.

CARME, B.; DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 656 – 658, 2009.

CASAGRANDE, R. A.; SILVA, T. C. E.; PESCADOR, C. A.; BORELLI, V.; SOUZA JÚNIOR, J. C.; SOUZA, E. R.; TRAVERSO, S.D. Toxoplasmose em primatas neotropicais: estudo retrospectivo de sete casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 94 – 98, 2013.

CATENACCI, L. S.; GRIESE, J.; SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 190–192, 2010.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA - CFMV. **Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais: Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2013. 66 p.

CHIARELLO, A. G. Influência da caça ilegal sobre mamíferos e aves das matas de tabuleiro do norte do estado do Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 11/12, p. 229–247, 2000.

CLEMENTINO ANDRADE, M. M.; PINHEIRO, B. V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A. C. A. V.; ANDRADE NETO, V.F.; VITOR, R.W.A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 587–589, 2013.

COELHO, R. A. L.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO JR., L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 229 – 231, 2003.

COSTA, D. G. C.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. S. A.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J. R.; LIMA FILHO, C. D. F.; RIBEIRO, V. O.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, p. 679-680, 2012.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. 2431 p.

CUNHA, R. C. S. C. **Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp., anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em carnívoros selvagens e domésticos de unidades de conservação de Pernambuco**. 2012. 44 f. Dissertação (Mestrado) – Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2012.

CURI, N. H. A.; COELHO, C. M.; MALTA, M. C. C.; MAGNI, E. M. V.; SABATO, M. A. L.; ARAÚJO, A. S.; LOBATO, Z. I. P.; SANTOS, J. L. C.; SANTOS, H. A.; RAGOSA, A. A. M.; SOUZA, S. L. P. Pathogens of wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 4, 2012, p. 1052–1056, 2012.

DA SILVA, R. C.; SU, C.; LANGONI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Raillet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 332-336, 2009.

DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; SERRURIER, B.; DARDÉ, M.L.; CARME, B. Case report: atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 195–197, 2008.

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.; TRAVERSA, D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningoencephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 31 – 36, 2011.

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

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

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GANNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization 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.; De YOUNG, R. W.; DAHL, E.; EBERHARD, M. L.; NACE, E. K.; WON, K.; BISHOP, H.; PUNKOSDY, G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; SUMNERS, J. A.; DEMARAIS, S.; HUMPHREYS, J. G.; LEHMANN, T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 67 – 71, 2004.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KOWK, 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, p. 709 – 712, 2010.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KOWK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from 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, 2007.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2. ed. New York: CRC Press, 2010. 318 p.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAN, 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.

EIPHANIO, S.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FEDULLO, D. L.; CORREA, S. H. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, p. 231 – 235, 2000.

EIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATÃO-DIAS, J. L. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 196 – 204, 2003.

FAZAELI, A.; CARTER P. E.; DARDÉ, M. L.; PENNINGTON, T. H. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by *GR6* gene sequence analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 637–642, 2000.

FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 99-109, 1980.

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.

FERREIRA, D. R. A., RIBEIRO, V. O., LAROQUE, P. O., WAGNER, P. G. C., PINHEIRO-JÚNIOR, J. W., SILVA, J. C. R., DUBEY, J. P., RÉGO, E. W., MOTA, R. A. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in captive *Sapajus* spp. **American Journal of Primatology**, v. 77, p. 558–562, 2015.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893–896, 1970.

GARCIA, J. L.; SVOBODA, W. K.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; AGUIAR, L. M.; TEIXEIRA, G. M.; LUDWIG, G.; 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.

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

GONDIM, L. S. Q.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S. A.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; GONDIM, L. F. P. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, p. 121–124, 2010.

GONZALES-VIERA, O.; MARIGO, J.; RUOPPOLO, V.; ROSAS, F. C. W.; KANAMURA, C. T.; TAKAKURA, C.; FERNÁNDEZ, A.; CATÃO-DIAS, J. L. Toxoplasmosis in a Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 358–362, 2013.

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.

GWYNNE, J. A.; RIDGELY, R. S.; TUDOR, G.; ARGEL, M. **Aves do Brasil: Pantanal e Cerrado**. Horizonte: São Paulo, 2010. 322 p.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 69–75, 2000.



HOWE, D. K.; SIBLEY L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype and human disease. **Journal of Infectious Diseases**, 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.

IUCN. **The IUCN red list of threatened species.** Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/>> Acesso em: 17 de jan. 2016.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 21, p. 990–994, 2008.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKAY, 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.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome amp and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980–2992, 2005.

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.

LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAN, 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.

LEITE, A. S.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Serological survey of toxoplasmosis in birds from Cracidae family in a wild bird center facility at Pernambuco state, Northeast of Brazil. **Medicina Veterinária**, v. 1, p. 55–57, 2007.

LIMA, V. Y.; LANGONI, H.; SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; CASTRO, A. P. B.; SILVA, R. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P. *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 9–14, 2011.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. **Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian**, v. 19, p. 448 – 461, 1997.

MARVULO, M. F. V.; CARVALHO, V. M. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. v. 2. São Paulo: Roca, 2014. c. 116. p. 2194–2206.

MATTOS, B. C.; PATRÍCIO, L. L. F.; PLUGGE, N. F.; LANGE, R. R.; RICHARTZ, R. R. T. B.; DITTRICH, R. L. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* canídeos selvagens cativos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 267–272, 2008.

MATUSHIMA, E. R. Técnicas necroscópicas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. c. 61. p. 980–990.

MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; PENA, H. F. J., 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 Diseases**, v. 41, p. 572–574, 2010.

MIRANDA, F. Cingulata (Tatus) e Pilosa (Preguiças e Tamanduás). In: In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. v. 2. São Paulo: Roca, 2014. c. 33. p. 707–722.

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

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

PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F. V.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SILVA, J. C. R.; EVÊNCIO NETO, J. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do zoológico de Aracajú, Sergipe. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 1009 – 1014, 2009.

RAGOZO, A. M. A., PENNA, 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.

RENTAS. **1º relatório nacional sobre o tráfico de fauna silvestre**. Disponível em <[http://www.rentas.org.br/wp-content/uploads/2014/02/REL\\_RENTAS\\_pt\\_final.pdf](http://www.rentas.org.br/wp-content/uploads/2014/02/REL_RENTAS_pt_final.pdf)> Acesso em 03 de mar. 2016.

RIVETTI JÚNIOR, A. V.; CAXITO, F. A.; RESENDE, M.; LOBATO, Z. I. P. Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela *nested* PCR em felinos selvagens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1281–1283, 2008.

SANTOS, P. S.; ALBUQUERQUE, G. R.; SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R.; MARVULO, M. F. V.; SOUZA, S. L. P.; RAGOZO, A. M. A.; NASCIMENTO, C. C.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-living Amazon River dolphins (*Inia geoffroensis*) from central Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 171–173, 2011.

SILVA, J. C. R.; 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, p. 217–224, 2001a.

SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; MARVULO, M. F. V.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* antibodies in exotics wild felines from Brazilian zoos. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 32, n. 3, p. 349-351, 2001b.

SILVA, A. V.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H.; BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasyurus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Veterinary Parasitology*, v. 135, p. 81–83, 2006.

SILVA, J. C. R. Toxoplasmose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. c. 48. p. 768–784.

SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; ADANIA, C. H.; FERREIRA NETO, J. S. Risk factors associated with seropositivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 78, p. 286–295, 2007.

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.

SIQUEIRA, D. B.; ALÉSSIO, F. M.; MAUFFREY, J. F.; MARVULO, M. F. V.; RIBEIRO, V. O.; OLIVEIRA, R. L.; PENNA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; MOTA, R. A.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild marsupials and rodents from the Atlantic Forest of Pernambuco state, northeastern region, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 99, p. 1140–1143, 2013.

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, n. 5, p. 314–320, 1972.

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, p. 841–848, 2006.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 356, p. 983–989, 2001.

TRUPPEL, J. H.; REIFUR, L.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LANGE, R. R.; VILANI, R. G. D. C.; GENNARI, S. M.; THOMAZ-SOCCOL, V. *Toxoplasma gondii* in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) antibodies and DNA detected by IFAT and PCR. **Parasitology Research**, v. 107, p. 141–146, 2010.

ULLMANN, L. S.; SILVA, R. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; SANTOS, L. C.; HOFFMANN, J. L.; MOREIRA, N.; GUIMARÃES, A. M. S.; MONTAÑO, P.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 144–146, 2010.

VILELA, S. M. O.; SILVA, J. S. A.; JÚNIOR, J. W. P.; MORAES, E. P. B. X.; SAUKAS, T. N.; GONDIM, L. F. P., MOTA, R. A. Sparrows (*Passer domesticus* L.) as intermediary hosts of *Toxoplasma gondii* in poultry farms from the “agreste” region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 169–172, 2011.

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.

VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; MINERVINO, A. H. H.; SANTOS, A. L. Q.; WERTHER, K.; MARVULO, M. F. V.; SIQUEIRA, D. B.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.;

SU, C.; GENNARI, S. M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 276–283, 2014b.

VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; PENA, H. F. J.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 45, p. 197–199, 2014a.

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, p. 96–111, 2011.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; PENA, H. F. J.; 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.

**ANEXO A – Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)  
do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) – Página 1**



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

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número:</b> 37855-1	<b>Data da Emissão:</b> 03/09/2013 15:53	<b>Data para Revalidação*:</b> 03/10/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: Marcio André da Silva	CPF: 032.810.424-81
Título do Projeto: Caracterização biológica e genotípica de <i>Toxoplasma gondii</i> de mamíferos e aves silvestres de Pernambuco, Brasil.	
Nome da Instituição: universidade federal rural de PE	CNPJ: 24.416.174/0001-06

**Cronograma de atividades**

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Colheita, Transporte e Processamento Laboratorial de Fragmentos de Órgãos de Animais Silvestres	09/2013	03/2016

**Observações e ressalvas**

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, biosspecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

**Equipe**

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jean Carlos Ramos da Silva	Coordenador	623.289.644-00	3.429.942 SSP-PE	Brasileira
2	Maria Fernanda Vianna Marvulo	Colaboradora	267.650.458-48	26814669-5 SSP-SP	Brasileira

**Locais onde as atividades de campo serão executadas**

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RECIFE	PE	CETAS do IBAMA	Fora de UC Federal
2	PETROLINA	PE	CETAS da UNIVASF	Fora de UC Federal

**Atividades X Táxons**

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Didelphimorphia, Perissodactyla, Pilosa, Rodentia, Artiodactyla, Lagomorpha, Carnivora, Primates, Aves, Cingulata

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

**Código de autenticação: 93642168**



Página 1/3

**ANEXO A – Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)  
do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) – Página 2**



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

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número:</b> 37855-1	<b>Data da Emissão:</b> 03/09/2013 15:53	<b>Data para Revalidação*:</b> 03/10/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Marcio André da Silva	CPF: 032.810.424-81
Título do Projeto: Caracterização biológica e genotípica de <i>Toxoplasma gondii</i> de mamíferos e aves silvestres de Pernambuco, Brasil.	
Nome da Instituição : universidade federal rural de PE	CNPJ: 24.416.174/0001-06

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Sangue
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
3	Amostras biológicas (Primatas)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele
4	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(ContenĂŞĂo QuĂ-mica), PuçĂ
5	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Laço de Lutz, Laço com cabo de aço, Outros métodos de captura/coleta(ContenĂŞĂo QuĂ-mica), PuçĂ
6	Método de captura/coleta (Primatas)	Captura manual, PuçĂ, Outros métodos de captura/coleta(ContenĂŞĂo QuĂ-mica)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	universidade federal rural de PE	
2	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	

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

**Código de autenticação: 93642168**



Página 2/3



**ANEXO A – Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)  
do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) – Página 3**



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

**Autorização para atividades com finalidade científica**

<b>Número:</b> 37855-1	<b>Data da Emissão:</b> 03/09/2013 15:53	<b>Data para Revalidação*:</b> 03/10/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: Marcio André da Silva	CPF: 032.810.424-81
Título do Projeto: Caracterização biológica e genotípica de <i>Toxoplasma gondii</i> de mamíferos e aves silvestres de Pernambuco, Brasil.	
Nome da Instituição : universidade federal rural de PE	CNPJ: 24.416.174/0001-06

**Registro de coleta imprevista de material biológico**

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

**Código de autenticação: 93642168**



Página 3/3

**ANEXO B – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)**



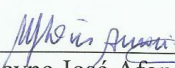
**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
*Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,*  
*Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE*

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

**Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino**

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	109/2014
Número do processo	23082.014319/2013
Data de emissão da licença	08 de Setembro de 2014
Título do Projeto	Caracterização biológica e genotípica de toxoplasma gondii de mamíferos e aves silvestres de espécies cinegéticas em Pernambuco, Brasil.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Jean Carlos Ramos da Silva
Colaboradores	Márcio André da Silva; Rinaldo Aparecido Macedo de Andrade; Leucio Câmara Alves; Solange Maria Gennari; Hilda Fátima de Jesus Pena.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Ave silvestre; 30, Camundongo isogênico; 600, Mamífero silvestre; 30, total de 660 animais

  
 Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
 (Presidente da CEUA-UFRPE)



Prof. Dr. Marleyne Amorim  
 Coordenadora CEUA

## ANEXO C – Autorização da Agência Estadual de Meio Ambiente de Pernambuco (CPRH)

CPRH Agência  
Estadual de  
Meio Ambiente



### AUTORIZAÇÃO

Fica o Doutorando **Márcio André da Silva**, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), autorizado a coletar material biológico das aves e dos mamíferos silvestres oriundos desta Agência Estadual de Meio Ambiente (CPRH), que estão em tratamento e depositados no Parque Dois Irmãos, localizado na Praça Farias Neves, s/n, Dois Irmãos – Recife/PE, para o desenvolvimento do projeto de doutorado intitulado “**Caracterização Biológica e Genotípica de *Toxoplasma gondii* de Mamíferos e Aves Silvestres em Pernambuco, Brasil**”, conforme solicitação protocolada nesta Agência sob o nº 010675/2014. O período de coleta de material biológico ocorrerá a partir do mês de abril/2015 até o mês de dezembro/2015. Fica autorizado, também, o uso de material biológico já coletado para esta Agência, antes dessa data.

Recife, 13 de abril de 2015.

*Patrícia F. Tavares*  
CPRH **Patrícia Ferreira Tavares**  
Gerente da Unidade de Gestão de Fauna  
UGF/DRFB  
Matrícula 278.558-7

ASSINATURA E CARIMBO DA AUTORIDADE EXPEDIDORA

### OBSERVAÇÕES

Esta Autorização não permite a captura e nem o transporte de animais silvestres;  
Os métodos empregados na coleta de material biológico devem gerar estresse mínimo aos animais;  
Em caso de modificações no presente cronograma, a CPRH deverá ser comunicada oficialmente com antecedência;  
Ao final da pesquisa, o doutorando deverá apresentar a esta Agência relatório final dos procedimentos adotados, inclusive com registro fotográfico, e resultados da pesquisa;  
Válida somente sem emendas e/ou rasuras;

## ANEXO D – Autorização do Parque Estadual Dois Irmãos (PEDI)



### PARECER TÉCNICO

Recife, 24 de abril de 2014.

Projeto: **“Caracterização Biológica e Genotípica de Toxoplasma gondii de Mamífero e Aves Silvestres em Pernambuco, Brasil.**

Acervo Bibliográfico PEDI: n. 216, ano 2014

Pesquisadores: **Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva**

Instituição proponente: Universidade Federal Rural de Pernambuco

#### REVISOR: 1

Autorizado o desenvolvimento com a seguinte ressalva:


1. Deverá ser observada a necessidade da coleta do material pela equipe técnica do Zoo reforçando o primeiro parágrafo, linhas 7 a 11 da pag. 10;
2. Os animais caracterizados como “Vida Livre” São de responsabilidade do CETAS em acórdância entre o IBAMA e o CPRH, portanto cabe a tais órgãos autorizar tal pesquisa nos animais apreendidos, mesmo que estejam sob nossa custódia.


*Daniel Barreto de Siqueira*  
 Daniel Barreto de Siqueira  
 Coordenador Científico - PEDI  
 Médico Veterinário - CRMV-PE 3208  
 Parque Estadual de Dois Irmãos

*Silvana Paula Valdevino da Silva*  
 Silvana Paula Valdevino da Silva  
 Gerente Executiva - PEDI  
 Gerente do Parque Estadual  
 Dois Irmãos

PRAÇA FARIA NEVES, S/N - DOIS IRMÃOS - RECIFE/PE  
 52171-011 - FONE: (81)31847754 / 31847750  
 www.parqueestadualdoisirmaos.pe.gov.br

## ANEXO E – Autorização da Comissão de Bioética da Universidade de São Paulo (USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO 

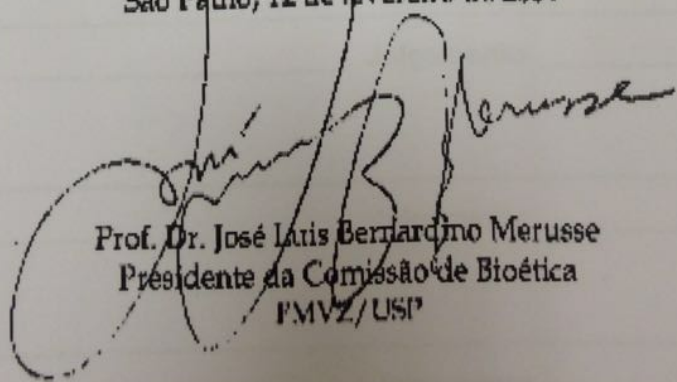
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**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