



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JONATAS CAMPOS DE ALMEIDA

**OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS DE INTERESSE EM SAÚDE ÚNICA EM
CANÍDEOS SILVESTRES DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE NA REGIÃO
NORDESTE DO BRASIL**

RECIFE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JONATAS CAMPOS DE ALMEIDA

**OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS DE INTERESSE EM SAÚDE ÚNICA EM
CANÍDEOS SILVESTRES DE CATIVEIRO E DE VIDA LIVRE NA REGIÃO
NORDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A447o Almeida, Jonatas Campos de
Ocorrência de patógenos de interesse em saúde única em
canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre na região nordeste do
Brasil / Jonatas Campos de Almeida. – 2017.
105 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,
Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências.

1. Canídeos silvestres 2. Epidemiologia 3. Saúde única
4. Zoonoses I. Mota, Rinaldo, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Ocorrência de Patógenos de Interesse em Saúde Única em Canídeos Silvestres de Cativeiro e
de Vida Livre na Região Nordeste do Brasil

Tese elaborada por
Jonatas Campos de Almeida
Aprovada em 26 de maio de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Orientador
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo
Departamento de Medicina Veterinária – UFCG

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Departamento de Medicina Veterinária – UFAL

Prof. Dr. Rita de Cássia Carvalho Maia
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o amor e apoio incondicionais apesar da enorme distância. Um ser humano se constrói primordialmente no seio familiar. O que sou hoje é apenas o fruto da educação, moral e orientações que recebi dos meus pais, incansáveis em me mostrar o caminho correto para seguir minha vida e em buscar que eu fosse um homem de bem e um cidadão honesto. Se em algum momento eu falhei em algum desses aspectos, foi por minha exclusiva culpa. Posso garantir que não faltaram conselhos e bons exemplos dentro do meu lar.

À minha Pomyzinha por todo carinho, compreensão, dedicação, alegrias e apoio ao longo dos últimos três anos, se esforçando ao máximo para que eu me adaptasse a minha nova fase da vida e me dando o incentivo diário necessário para sempre seguir em frente. Obrigado por dar seu brilho especial na minha rotina e me fazer feliz mesmo nos momentos tristes e frustrantes que ultrapassaram a mera condução de um doutoramento. Espero ter sido para você o mesmo que você sempre representou para mim. E obrigado por ter me dado uma nova família em Recife/Olinda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota, que sempre fez questão de não ser apenas um orientador científico, mas também orientar para a vida profissional e pessoal. Para mim, foi uma honra enorme trabalhar ao seu lado e crescer como veterinário, pesquisador, professor e ser humano. Agradeço por investir em mim seu tempo, paciência e atenção. Passei a admirá-lo como orientador e pessoa, e o tenho como modelo a seguir para uma carreira bem sucedida e honesta. Espero contar sempre com sua orientação, amizade e futuras parcerias. Obrigado por tudo.

Aos colegas Júnior Mário e Manu pelas risadas, situações divertidas e estressantes durante sete meses árduos de pesquisa e ensino em Viçosa/AL. E a todos os amigos da Universidade Federal de Alagoas que me receberam de braços abertos.

À família do Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos (LDIC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, com agradecimentos mais do que especiais: à Chefa (Renata Pimentel) e sua paciência e companheirismo inabaláveis, à Pedro Paulo e seu bom humor contagiante, à Carlos Adriano e suas discussões Qualis A1 após às 18h, à Camila Pedrosa e suas nóias dentro do Infectório, à Edson Moura e Neurisvan Guerra (embora sejam do Laboratório de Parasitologia também são membros honorários do LDIC) pelas sempre bem-vindas discussões parasitológicas (em um mundo de bacteriologistas), à Erika Samico pela companhia e persistente entusiasmo científico, à Paulo César pelo

companheirismo e churrascos exóticos. Gostaria de agradecer de forma detalhada todos os amigos e colegas do laboratório, mas não há espaço, porém meus sinceros agradecimentos a Adrienne Alcântara, André Santos, André Mota, Atzel, Débora Viegas, Débora Rochelly, Eduardo Guelfer, Érica Chaves, Flaviana Wanderley, Fernando Kim, Gabriela Silva, Givanildo, Gláucia Grazielle, Guilherme Moura, Luciana Coutinho, Marcus Falcão, Pollyane Fernandes e Raylson Oliveira. Caso eu tenha esquecido alguém, perdoem a minha memória.

Aos estagiários que suportaram minhas exigências diárias, cobranças e que dividiram momentos de alegria e bom-humor: Ana Clécia, Allyne, Rafael, Laís, Lara, Thomás, Elaine e Jéssica. A todos os servidores da UFRPE que tornaram meu dia a dia mais agradável, sobretudo Alcir, Guiomar, Cleide e Edna.

Ao Prof. Dr. Wagner Porto por toda a amizade, aprendizado e colaboração em diferentes etapas da minha passagem pelo doutorado. É bom ter um outro “senhor” com quem conversar nesse mundo repleto de “jovens e suas tecnologias”.

Ao Prof. Dr. Jean Carlos pela torcida, apoio e ensinamentos. Muito obrigado por estender também à mim a sua amizade com minha orientada de mestrado.

A Prof. Dr. Rita de Cássia por sua simplicidade, bom humor e incentivos na trajetória do doutorado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Azevedo pela disposição em se deslocar até Recife e pelas ótimas contribuições na tese.

Ao Prof. Dr. Wilton Júnior e Prof. Dr. Edna Santos pelas sugestões, críticas e colaborações na qualificação do doutorado.

Aos grupos de pesquisa da Universidade Federal do Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Federal de Campina Grande, Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Federal de Alagoas pela inestimável parceria na pesquisa, auxiliando na conquista de resultados de qualidade para a tese.

Aos profissionais dos Zoológicos, Centros de Triagem de Animais Silvestres e Hospitais Veterinários que gentilmente cederam tempo e pessoal para auxiliar na coleta de amostras biológicas, viabilizando a execução das atividades do projeto de pesquisa.

Aos companheiros de quatro patas: Nina, Nick, Fênix, Meg e Sakê, razões pelas quais meu instinto veterinário sempre existiu e continuará existindo, independente do caminho profissional que eu decida trilhar.

À Capes pela bolsa de estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por viabilizar a execução desta tese.

“Talento é mais barato que sal. O que separa a pessoa talentosa da bem-sucedida é
muito trabalho duro”

- Stephen King

“You, me, or nobody is gonna hit as hard as life, but it ain’t about how hard you hit,
it’s about how hard you can get hit and keep moving forward, how much you can take and
keep moving forward. That’s how winning is done”

- Rocky Balboa

RESUMO

O objetivo do estudo foi investigar a ocorrência de patógenos de interesse em saúde única em canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre na região nordeste do Brasil. Amostras biológicas (fezes, pelos, sangue) foram coletadas de 25 cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de quatro estados: Alagoas, Bahia, Paraíba e Pernambuco. A partir dessas amostras foi possível obter o primeiro isolado de *Toxoplasma gondii* (genótipo #13) em cachorro-do-mato; *Ctenocephalides canis* e *felis*, *Sarcoptes scabiei*, *Malassezia pachidermatis* em animais da Paraíba, além de um caso de co-infecção com *Microsporium gypseum*; isolamento de *Clostridium perfringens* – tipo A em cinco amostras de fezes (uma amostra positiva para toxina beta-2) e *Clostridium difficile* em duas amostras de fezes. Na análise molecular (PCR) e sorológica (MAT para *T. gondii*, NAT para *N. caninum*, ELISA para *L. chagasi* e MAT para *Leptospira* sp) foram observadas frequências de anticorpos anti-*T. gondii* de 50% e 29,41% em canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre, respectivamente, frequências de anticorpos anti-*N. caninum* de 62,50% e 23,52% em canídeos silvestres de vida-livre e cativeiro, respectivamente e frequência de anticorpos anti-*L. chagasi* de 4,0% em canídeos silvestres de cativeiro. Não houve amostras de soro positivas para *Leptospira*, bem como ausência de PCR positiva para os patógenos analisados no sangue. Os resultados deste estudo demonstram a circulação de patógenos de impacto em saúde única. Estudos envolvendo animais silvestres e doenças infecciosas devem ser realizados para fornecer dados epidemiológicos sobre essas doenças e orientar ações de vigilância e controle.

Palavras-chave: canídeos silvestres, epidemiologia, saúde única, zoonoses

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of pathogens of interest in One Health in captive and free-range wild canids from northeastern Brazil. Biological samples (stool, fur and blood) were collected from 25 crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) from four states: Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco. From these samples was possible to obtain the first *Toxoplasma gondii* isolate (genotype #13) in crab-eating fox; *Ctenocephalides canis* and *felis*, *Sarcoptes scabiei*, *Malassezia pachidermatis* in animals from Paraíba and also one co-infection case by *Microsporium gypseum*; isolation of *Clostridium perfringens* – type A in five stool samples (one of them positive to beta-2 toxin) and *Clostridium difficile* in two stool samples. In molecular (PCR) and serological analysis (MAT for *T. gondii*, NAT for *N. caninum*, ELISA for *L. chagasi* and MAT for *Leptospira* spp) were observed frequencies of anti-*T. gondii* antibodies of 50% and 29.41% in captive and free-range wild canids, respectively, frequencies of anti-*N. caninum* antibodies of 62.50% and 23.52% in free-range and captive wild canids, respectively, frequency of anti-*L. chagasi* antibodies of 4.0% in captive wild canids. There were no serum samples positive for *Leptospira*, as well as absence of positive PCR for the pathogens analyzed in the blood. The results of this study demonstrate the circulation of pathogens with an impact on One Health. Studies involving wild animals and infectious diseases should be performed to provide data on the epidemiology of these diseases and to guide surveillance and control measures.

Keywords: wild canids, epidemiology, one health, zoonoses

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. A Biodiversidade Brasileira – Ordem Carnivora.....	20
2.2. A Interface Entre a Vida Urbana e Silvestre.....	22
2.3. Doenças Infecciosas em Canídeos Silvestres.....	23
2.3.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	24
2.3.2. <i>Neospora caninum</i>	26
2.3.3. <i>Leishmania spp</i>	28
2.3.4. <i>Leptospira sp</i>	30
2.3.5. <i>Clostridium difficile</i> e <i>C. perfringens</i>	31
2.3.6. <i>Sarcoptes scabiei</i>	33
2.3.7. Dermatofitose.....	34
2.4. Estratégias para o Controle e Prevenção de Zoonoses em Vida Silvestre.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Geral.....	37
3.2. Específicos.....	37
4. REFERÊNCIAS.....	38

CAPÍTULO 1

First isolation and RFLP genotyping of <i>Toxoplasma gondii</i> from crab-eating fox (<i>Cerdocyon thous</i> – Linnaeus, 1766).	51
--	----

CAPÍTULO 2

Co-Infection by <i>Sarcoptes scabiei</i> and <i>Microsporium gypseum</i> in Free-Ranging Crab-Eating Fox, <i>Cerdocyon thous</i> (Linnaeus, 1766).	62
--	----

CAPÍTULO 3

Isolation of <i>Clostridium perfringens</i> and <i>Clostridium difficile</i> in crab-eating fox (<i>Cerdocyon thous</i> – Linnaeus 1776) from Northeastern Brazil.	73
--	----

CAPÍTULO 4

Molecular and serological investigation of infectious diseases in captive and free-range crab-eating fox (<i>Cerdocyon thous</i> – Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil.....	83
---	----

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
-------------------------------------	------------

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 – <i>Chrysocyon brachyurus</i>	21
Figura 2 – <i>Cerdocyon thous</i>	21
Figura 3 – <i>Speothos venaticus</i>	21
Figura 4 – <i>Lycalopex vetulus</i>	21
Figura 5 – <i>Pseudalopex gymnocercus</i>	22
Figura 6 – <i>Atelocynus microtis</i>	22
Figura 7 – Ciclo Biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
Figura 8 – Ciclo Biológico de <i>Neospora caninum</i>	27
Figura 9 – Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	29

Capítulo 1

Figure 1. Phylogenetic analysis of the <i>Toxoplasma gondii</i> isolate obtained in the present study (circle), with the following strains used as references: <i>MAS</i> , <i>GT1</i> , <i>TgRsCr</i> , <i>TgCgCa1</i> , <i>TgCatBr64</i> , <i>TgCatBr5</i> , <i>TgHoFBr1</i> , <i>TgOncBr1</i> , <i>TbSbaBr2</i> , <i>PTG</i> , <i>BrI</i> , <i>BrII</i> , <i>TgMWBr1</i> , <i>BrIII</i> , <i>BrIV</i> and <i>CTG</i>	56
---	----

Capítulo 2

Figure 1 Alopecia and moderate incrustations in the ear of the crab-eating fox, <i>Cerdocyon thous</i> (Linnaeus, 1766).	65
Figure 2 Skin scraping containing <i>Sarcoptes scabiei</i> mite (red arrow) (objective: 10x).....	66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 4

Table 1 – Distribution of the crab-eating foxes (<i>Cerdocyon thous</i> – Linnaeus 1776) sampled, according to Brazilian State and origin (Zoo, Center of Triage of Wild Animals, Private Veterinary Hospital and Veterinary Teaching of Universidade Federal Rural de Pernambuco).	87
Table 2 – Serological detection of <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Neospora caninum</i> and <i>Leishmania chagasi</i> in crab-eating fox (<i>Cerdocyon thous</i> – Linnaeus 1776) from northeastern Brazil.	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS:	Acquired immunodeficiency syndrome
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
WHO:	World Health Organization
LV:	Leishmaniose Visceral
LT:	Leishmaniose Tegumentar
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
OIE:	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS:	Organização Mundial da Saúde
FAO:	Food and Agriculture Organization
ONG:	Organização Não Governamental
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RLFP:	Restriction Fragment Length Polymorfism
MAT:	Moddified Agglutination Test
NAT:	<i>Neospora</i> Agglutination Test
IFAT:	Immunofluorescence Antibody Test
KOH:	Hidróxido de Potássio
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IBAMA:	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CDI:	<i>Clostridium difficile</i> infection
UV:	Ultravioleta
Zoo:	Zoológico
Ig:	Imunoglobulina
%:	por cento

°:	graus
Kg:	quilos
Km:	quilômetros
ml:	mililitros
I.U:	international units
µg:	micrograma
g:	grama
mg:	miligrama
CO ₂ :	dióxido de carbono
h:	horas
®:	marca registrada
p.i:	pós-inoculação
bp:	base pairs

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grandiosa biodiversidade de flora e fauna distribuídas nos mais diferentes e ricos ecossistemas, apresentando em torno de 20% do número total de espécies existentes, a maior riqueza de espécies e a mais alta taxa de endemismos (GODOY, 2006), alcançando o 3º lugar em número de espécies de mamíferos, reunindo aproximadamente 600 espécies (INSTITUTO HÓRUS, 2006). Tal diversidade infelizmente tem sido amplamente ameaçada por interferência direta humana, decorrente de desmatamentos, invasão dos ambientes naturais e o tráfico de animais silvestres. Estas interferências têm causado redução nas populações de animais selvagens em todo o mundo, em curto intervalo de tempo (NUNES, 2007).

Somada a perda de *habitats*, caça e poluição, a ocorrência de doenças é um grave problema para conservação de espécies selvagens. A ocorrência de patógenos pode provocar o declínio substancial das populações de animais silvestres, alterando a sua distribuição em algumas regiões. Ao longo dos últimos anos, o impacto das doenças nos animais selvagens de vida livre tem causado grande preocupação entre os conservacionistas (CLEAVELAND et al., 2007).

Surtos de cinomose foram relatados em carnívoros de vida livre na África e América do Norte, alguns deles causando declínios populacionais significativos em decorrência de aumento da mortalidade. Davidson et al. (1992) relataram que o vírus da cinomose foi responsável por 78% da mortalidade das raposas cinzentas do sudeste norte-americano. De acordo com Alexander e Appel (1994), a população de cachorro selvagem-africano desapareceu da Reserva de Masai Mara, no Quênia devido a uma epidemia de cinomose. Segundo Maia e Gouveia (2002), entre 1989 e 1998, 19,4% dos óbitos em lobos-guarás em cativeiro no Brasil foi atribuída à cinomose.

A introdução do vírus rábico pode resultar em graves consequências às populações de carnívoros selvagens, sobretudo àquelas pequenas e isoladas (GASCOYNE et al., 1993) como o ocorrido nos casos de lobos-da-etíopia durante um surto da doença (SILLERO-ZUBIRI et al., 1996), dos lobos cinzentos (WEILER, 1995) e dos cachorros-selvagens-africanos (HOFMEYER et al., 2000), todos com relato de declínio populacional em virtude de surtos da doença. No Nordeste do Brasil, o cachorro-do-mato é um dos principais reservatórios do vírus rábico entre as espécies de canídeos silvestres da região (CARNIELI JR. et al., 2008), sendo identificado um ciclo independente da raiva nestes animais nesta região. Ao que tudo indica, o vírus rábico foi transmitido originalmente por cães domésticos aos silvestres, mas existem

diferenças genéticas entre os isolados do vírus provenientes de cada um dos grupos em questão (BERNARDI et al., 2005). Essas epidemias evidenciaram que as doenças podem causar um aumento substancial da mortalidade de animais silvestres de vida livre, estimulando o uso dos conceitos gerais da epidemiologia nas atividades de conservação e manejo de carnívoros selvagens.

No entanto, as doenças infecciosas e parasitárias não se restringem aos danos que causam à vida silvestre, podendo se estender às populações humanas, causando graves problemas de saúde pública. É muito bem documentado que os animais sempre foram fonte de alimentos, transporte, trabalho e companhia para os seres humanos, permitindo sua evolução. No entanto, esses mesmos animais podem atuar como fonte de infecções de vírus, bactérias e parasitos, que podem ser transmitidos para o homem (SEIMENIS, 2008; BROWN, 2003). Estima-se que 61% de todos os patógenos humanos são considerados zoonoses (TAYLOR et al., 2001) e aproximadamente 77% dos patógenos de animais de produção e 91% dos patógenos de carnívoros domésticos infectam múltiplos hospedeiros (HAYDON et al., 2002) e aproximadamente 75% das doenças que surgiram nas duas últimas décadas têm origem na fauna silvestre (BENGIS et al., 2004).

Os animais silvestres que compõem a fauna brasileira podem ser encontrados na natureza, em vida silvestre, ou no cativeiro, alocados em zoológicos, criadouros conservacionistas, científicos ou comerciais, institutos de pesquisa, centros de triagem e reabilitação, ou em residências (geralmente de forma ilegal). Em ambas as situações (vida livre e cativeiro), esses animais podem ser reservatórios e portadores de agentes infecciosos causadores de zoonoses (SILVA, 2004).

Historicamente, a fauna silvestre tem sido considerada como uma fonte importante de doenças infecciosas transmissíveis ao ser humano e a outros animais, de modo que, atualmente, um dos maiores desafios mundiais para as autoridades de saúde, profissionais de saúde pública e comunidade científica são as zoonoses associadas a hospedeiros reservatórios de origem silvestre, um campo que ainda carece de informações sólidas (KRUSE, KIRKEMO e HANDELAND, 2004). Doenças infecciosas ou parasitárias (emergentes ou reemergentes), como a influenza aviária e suína, ebola, HIV/AIDS, chikungunya, zika, febre amarela, dengue, tuberculose e as tripanossomíases, tiveram origem na vida silvestre e todas são consideradas de impacto relevante à saúde coletiva (ZANELLA, 2016).

Esse cenário é reflexo do crescente processo de urbanização, industrialização e o avanço da indústria agropecuária, que facilitaram uma maior interface entre as populações

humanas e seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus *habitats* naturais, favorecendo a transmissão de agentes infecciosos e parasitários (CORRÊA e PASSOS, 2001). Além disso, pode-se citar a contínua introdução, muitas vezes ilegal, de animais selvagens e exóticos em determinadas áreas geográficas, com objetivos diversos como: produção de alimentos, participação em feiras ou exposições, como animais de companhia, atividades de lazer, esportivas, educação e preservação e modelo biológico para investigações científicas (TORO, 1976) e, conseqüentemente, aumentando as possibilidades de interação com os animais silvestres com eventuais zoonoses. Outro ponto importante é que patógenos em animais silvestres que também infectam seres humanos e animais domésticos podem comprometer a eficácia de programas sanitários nacionais e internacionais destinados ao controle e erradicação de doenças, elaborados e implementados utilizando considerável recurso financeiro e de infraestrutura (BENGIS et al., 2002).

De acordo com Acha e Szyfres (1986), os principais condicionantes para disseminação dos fatores de risco presentes em focos naturais, com possibilidades de estabelecer ciclos zoonóticos são: introdução de animais domésticos e/ou homem em um foco natural; deslocamento de um hospedeiro infectado a uma nova região com hospedeiros suscetíveis; alterações na dinâmica dos hospedeiros ou do equilíbrio ecológico; escassez de alimento, forçando movimentos migratórios de animais reservatórios; intervenção humana nos ecossistemas; ocorrência de mutações positivas na epidemiologia do agente etiológico, facilitando sua dispersão; intervenção de aves migratórias e vetores.

No que se refere aos animais em situação de cativeiro, mesmo diante dos contínuos esforços dos profissionais na elaboração e execução de um rigoroso manejo sanitário, o ambiente de zoológico ainda facilita a disseminação de uma grande quantidade de agentes infecciosos, muitos deles de caráter zoonótico (SILVA et al., 2001). O mesmo cenário é descrito em outros estabelecimentos que mantêm animais silvestres. É importante ressaltar que muitos animais apresentam sinais sub-clínicos para algumas enfermidades, difíceis de serem identificados, atuando como importantes fontes de infecção para os homens e animais domésticos (ACHA e SZYFRES, 1986; FOWLER, 1986).

Conforme o exposto, o estudo da epidemiologia das zoonoses em animais silvestres seja de cativeiro ou vida livre, é peça fundamental para a obtenção de um melhor conhecimento dos focos naturais, determinando os principais fatores de risco existentes conforme cada ecossistema, bem como a compreensão correta da cadeia epidemiológica dos agentes zoonóticos entre os animais silvestres, e a relevância local, regional ou nacional das

doenças, orientando a elaboração, planejamento e execução das ações dos serviços veterinários e de saúde pública.

A alternativa contemporânea para melhor compreender e solucionar os atuais problemas de saúde derivados da interface humana, animal e ambiental é o conceito de Saúde Única (*One Health*), que por meio da atuação conjunta interdisciplinar de trabalho local, nacional e globalmente, busca atingir o melhor horizonte de saúde para as pessoas, animais e o meio ambiente (AVMA, 2008). A Saúde Única fundamenta-se na proposta de um estreitamento das relações entre a medicina humana e a veterinária, visando ações e serviços de saúde de caráter colaborativos, auxiliando a investigação, tratamento, controle e prevenção das zoonoses. Soma-se a essa proposta, a elaboração de estratégias conjuntas entre essas as duas profissões, voltadas para a educação médica e saúde pública (JAVMA, 2007).

Dentre as vantagens e avanços resultantes do movimento da Saúde Única pode-se citar: a melhoria da saúde animal e humana mundial através da colaboração entre as profissões da saúde; reuniões e grupos de discussão de caráter multiprofissional para enfrentamento dos novos desafios globais; investimento no desenvolvimento de centros de excelência para a formação de profissionais multidisciplinares em áreas específicas da saúde, através da colaboração entre medicina veterinária, medicina humana e de saúde pública; aplicação do conhecimento científico no desenvolvimento de programas e ações e serviços para a melhoria da saúde (AVMA, 2008).

A Medicina Veterinária é uma profissão privilegiada nesse contexto da Saúde Única, uma vez que os veterinários possuem em seu currículo disciplinas como saúde pública, medicina comparada e medicina preventiva, de modo que a profissão apresenta enorme potencial para auxiliar e colaborar nas demandas da Saúde Única. Reunindo forças para ações em conjunto com as demais áreas da saúde, a medicina veterinária tem toda a capacidade necessária para desenvolver papel fundamental na Saúde Única (AVMA, 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Biodiversidade Brasileira – Ordem Carnívora

A biodiversidade é fonte de alimentos, medicamentos e produtos industriais para os seres humanos, e é constituída por diferentes seres situados na sua grande maioria nas florestas tropicais. O Brasil detém a maior cobertura de florestas tropicais do planeta, concentrada na Região Amazônica. Somam-se a isso a diversidade geográfica e climática, permitindo abrigo a uma significativa diversidade biológica. Desse modo, o Brasil possui entre 15% a 20% das 1,5 milhão de espécies descritas na Terra; além disso, possui a flora mais rica do mundo, com cerca de 55 mil espécies de plantas superiores, 524 espécies de mamíferos, 1.677 de aves, 517 de anfíbios e 2.657 de peixes (LEWINSOHN & PRADO, 2000).

A ordem Carnívora é dividida em duas sub-ordens: os carnívoros aquáticos ou Pinnipedia e os carnívoros terrestres ou Fissipedia, que são comumente classificados como uma ordem própria. A subordem Fissipedia possui três superfamílias: Miacioidea, Canoidea e Feloidea. Para fins de revisão, será discutida apenas a família Canidae, pertencente à superfamília Canoidea. A família Canidae encontra-se agrupada em três sub-famílias: Otocyoninae, Symocioninae e Caninae. São facilmente identificáveis: animais fortes, possuem focinho longo e pontudo, orelhas eretas, cauda com pelos em forma de tufos, unhas não retráteis e geralmente são cursoriais. Apresentam hábito alimentar carnívoro, mas algumas se alimentam também de matéria vegetal e insetos. Apresentam comportamento solitário ou em grupos. A gestação dura em média 63 dias com ninhadas entre 2-13 animais e o peso pode variar entre 1,5 Kg até 80 Kg (HENNEMANN III et al., 1983).

No Brasil existem seis espécies de canídeos silvestres: *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) (Figura 1) no Centro-Sul e Nordeste do Brasil; *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) (Figura 2) na grande maioria do território nacional com menor frequência na Região Amazônica; *Speothos venaticus* (cachorro-vinagre) (Figura 3) na grande maioria do território nacional com ausência de relatos no Rio Grande do Sul; *Lycalopex vetulus* (raposa-do-campo) (Figura 4) no Centro, Sudeste e Nordeste do país; *Pseudalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) (Figura 5) no Sul e Sudeste do Brasil; *Atelocynus microtis* (cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas) (Figura 6) na região que compreende a bacia do Rio Amazonas. Das espécies citadas acima, o lobo-guará tem sua biologia bem estudada, seguido por estudos referentes ao cachorro-vinagre e as demais espécies ainda carecem de informações mais sólidas. O cachorro-do-mato e o lobo-guará figuram entre as espécies mais frequentes nos planteis nacionais, com alguns zoológicos relatando animais excedentes. Esta situação é provocada

pela fácil reprodução em cativeiro e animais oriundos da natureza. Os desafios à sobrevivência destas espécies variam conforme a região onde se encontram, sendo que a destruição de seu *habitat*, os envenenamentos e a caça tem colocado algumas dessas espécies em risco de extinção (ALMEIDA et al., 2003).



Figura 1 – *Chrysocyon brachyurus*

(Fonte: ww.calphotos.berkeley.edu)



Figura 2 – *Cerdocyon thous*

(Fonte: www.suggest-keywords.com)



Figura 3 – *Speothos venaticus*

(Fonte: www.koryos.tumblr.com)



Figura 4 – *Lycalopex vetulus*

(Fonte: www.dogstory.com.br)



Figura 5 – *Pseudalopex gymnocercus*

(Fonte: www.carnivoraforum.com)



Figura 6 – *Atelocynus microtis*

(Fonte: www.blog.wcs.org)

2.2. Interface Entre Vida Urbana e Silvestre

Além do salto populacional ocorrido no último século, outros fatores favoreceram a emergência e reemergência de agentes zoonóticos, sendo que a maioria dos casos foi em virtude das interações ecológicas entre patógenos e hospedeiros (DASZAK et al., 2001). Essas mudanças podem ter caráter natural ou origem antropogênica, incluindo a expansão das atividades humanas e fronteiras agropecuárias, destruição de *habitats*, poluição, entre outros exemplos (PATZ et al., 2000), permitindo o aumento do contato entre patógenos e novas populações de hospedeiros, resultando na seleção natural para a dominância de patógenos adaptados a essas novas condições ambientais (DASZAK et al., 2001).

O processo de domesticação e interação com animais silvestres propiciou um ambiente favorável para a transmissão de doenças destes para o homem (PEARCE-DUVET, 2006). Dois bons exemplos de doenças em que os animais silvestres se tornaram reservatórios e reinfetaram os animais domésticos são a tuberculose bovina detectada em populações de cervos capturados ou manejados intensivamente (as populações de cervos com baixa densidade populacional e de vida livre eram mais resistentes) e casos de infecção por *Brucella suis* biovar 2, transmitida de javalis (considerados reservatórios), para suínos criados em regime extensivo (GODFROID et al., 2005).

Outro aspecto importante são as evidentes mudanças climáticas e na utilização do solo que facilitam a entrada de vetores e roedores em áreas urbanas mudando a dinâmica da transmissão de doenças infecciosas, como foi no caso da epidemia do vírus da Ebola, que reemergiu no início de 2014 na Libéria, Serra Leoa, Gana e Nigéria, totalizando mais de 20 mil casos, decorrente da exposição do caso índice a uma colônia de morcegos insetívoros

(*Mops condylurus*) (MARÍ SAÉZ et al., 2015). Vale também ressaltar que a progressiva redução na quantidade de hospedeiros naturais forçou os vetores a buscarem hospedeiros alternativos, aumentando as chances para a transmissão de patógenos, como a *Borrelia* sp (CUTLER et al., 2010). O mercado do ecoturismo tem apresentado franco crescimento nos últimos anos e as zoonoses associadas a essas práticas, tais como uma variedade de riquetisioses, hantavirose e encefalites transmitidas por carrapatos tem sido um perigo real (CHOMEL et al., 2007; CUTLER et al., 2010).

O tráfico de animais de estimação exóticos também vem facilitando a transmissão de agentes zoonóticos. Aproximadamente 40.000 primatas, 4 milhões de pássaros, 640 mil répteis e 350 milhões de peixes tropicais ornamentais são comercializados por ano (KARESH et al., 2005), movimentando uma grande indústria de tráfico internacional de vida silvestre estimada em 6 bilhões de dólares (CHECK, 2004). Esses animais podem atuar como fontes de infecção de zoonoses como a raiva, tuberculose, brucelose e a psitacose (CHOMEL et al., 2007). Estudos revelam que em torno de 7% das infecções humanas causadas por *Salmonella* nos Estados Unidos, sobretudo em crianças, estão associadas a presença de répteis como animal de estimação (MERMIN et al., 2004).

É importante considerar nessa cadeia de transmissão de zoonoses da vida silvestre para o ser humano, o consumo de comidas exóticas, como a carne de caça, prática realizada em diversas partes do mundo, em especial na África Central e na Bacia Amazônica (CHOMEL et al., 2007). Um exemplo interessante é a triquinelose que está associada ao consumo de carne de caça como de cervo e javali (CHOMEL et al., 2007). Outro exemplo é o vírus da SARS (do inglês: *Severe Acute Respiratory Syndrome*) relacionado ao consumo de carnívoros silvestres na China (ZANELLA, 2016).

2.3. Doenças Infecciosas em Canídeos Silvestres

Se por um lado, as populações de carnívoros selvagens podem sofrer com graves epizootias e declínios populacionais derivados da interação com as doenças dos animais domésticos, da mesma forma, canídeos como as raposas e coiotes, facilmente adaptáveis a ambientes modificados, podem atuar como potenciais fontes de infecção de zoonoses para os seres humanos (AGUIRRE, 2009). Outro ponto importante é que os carnívoros podem atuar como “bioacumuladores” de exposição aos patógenos, uma vez que, como estão no topo da cadeia alimentar, o consumo de hospedeiros infectados reflete em elevadas taxas de infecção

(JORGE et al., 2010). Com base nessa relação, algumas espécies de carnívoros podem ser entendidas como animais sentinelas e, logicamente, elementos chaves na condução da estratégia de programas de vigilância para o diagnóstico de diferentes patógenos (AGUIRRE, 2009). Um eficiente programa de monitoramento de patógenos em animais selvagens de vida livre é o diagnóstico precoce da ocorrência de doenças novas ou emergentes, sobretudo aquelas que podem ter relevante impacto zoonótico e econômico (MÖRNER et al., 2002). Diferentes fatores epidemiológicos e ecológicos influenciam a distribuição das infecções em uma população suscetível, porém o maior desafio para os profissionais da saúde é determinar quais as condições que favorecem a disseminação de uma infecção e que podem resultar em uma epidemia (JORGE et al., 2010).

Como mencionado, existe uma gama de diferentes tipos de agentes etiológicos que naturalmente acometem os canídeos silvestres. No entanto, para fim de estudo mais específico e dentro do contexto deste trabalho, podem-se citar:

2.3.1. *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa e é uma das zoonoses mais comuns e difundidas no mundo (TENTER, 2000).

T. gondii possui uma ampla gama de hospedeiros suscetíveis à infecção e à doença, incluindo mamíferos, aves e homem. Os felídeos domésticos e selvagens são os hospedeiros definitivos de *T. gondii* e podem eliminar oocistos do protozoário em suas fezes, enquanto que as demais espécies são classificadas como hospedeiros intermediários com a presença de taquizoítos (fase aguda) parasitando células do sistema fagocítico mononuclear ou cistos teciduais contendo bradizoítos (fase crônica) (DUBEY, 2010). As principais vias de transmissão, válida tanto para os hospedeiros definitivos como intermediários, são: ingestão de cistos em tecidos de animais infectados, ingestão de oocistos infectantes presentes no ambiente e via transplacentária (HILL e DUBEY, 2002) (Figura 7).

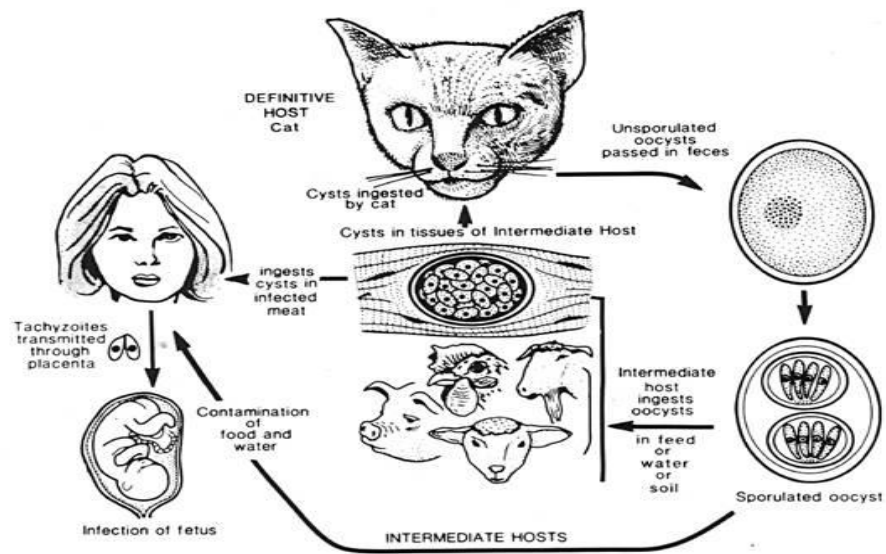


Figura 7 – Ciclo Biológico de *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2004)

A toxoplasmose geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes mas, em contrapartida, sinais clínicos graves como encefalite, miocardite e hepatite podem ser descritos em imunodeprimidos (TENTER, 2000). Crianças nascidas de mulheres infectadas durante a gestação podem desenvolver um quadro clínico grave denominado Tétrade de Sabin, caracterizada por hidrocefalia, retardo mental, calcificação cerebral e corioretinite (FORNAZARI e LANGONI, 2014).

Paralelamente ao que ocorre em animais domésticos e no homem, alguns fatores favorecem o risco da toxoplasmose entre os animais selvagens. Vitaliano et al. (2004) apontam que o lobo-guará apresenta um maior risco de se infectar quando em áreas sob influência do homem e de animais domésticos, possivelmente devido à presença dos felinos domésticos. Além disso, aspectos biológicos como o carnivorismo facilita a infecção, devido à frequente ingestão de tecidos de outros animais contendo cistos do protozoário (FORNAZARI e LANGONI, 2014). Não há evidências que sustentem uma importância dos animais selvagens na cadeia de transmissão zoonótica de *T. gondii*, porém o consumo de carne de caça apreciada em algumas regiões pode ser um elo relevante para completar o ciclo zoonótico (SILVA, 2006).

Estudos sorológicos têm sido realizados no intuito de compreender melhor a epidemiologia da infecção por *T. gondii*. Almeida et al. (2012) e Almeida et al. (2010) relataram prevalência de 75% e 68% de *T. gondii* em canídeos silvestres de vida livre em

Minas Gerais. Anticorpos anti-*T. gondii* também foram descritos em canídeos silvestres, com destaque para o cachorro-vinagre com prevalência de 63% (ANDRE et al., 2010), semelhante àquela descrita em cachorros-do-mato no Paraná e São Paulo por Gennari et al. (2004), que relataram prevalência de 60%. Prevalência menor foi descrita em animais de diferentes zoológicos de São Paulo, os quais apresentaram 19,2% de animais soro reagentes (CATENACCI et al., 2010). Estudos moleculares identificaram o DNA do parasito em tecidos de canídeos silvestres na Itália (FERROGLIO et al., 2014), Romênia (SUTEU et al., 2014) e Brasil (NASCIMENTO et al., 2015). Esses resultados ganham ainda mais relevância no cenário nacional, por conta do consumo de carne de caça do cachorro-do-mato em algumas regiões do Brasil (CATENACCI et al., 2010).

2.3.2. *Neospora caninum*

Este protozoário coccídeo possui um ciclo biológico heteroxeno, com participação de hospedeiros definitivos (canídeos) e intermediários (canídeos e uma ampla gama de espécies). A reprodução assexuada ocorre nos tecidos do organismo dos hospedeiros intermediários e definitivos, pela rápida multiplicação dos taquizoítos ou, lentamente, dos bradizoítos. A reprodução sexuada ocorre no trato digestivo dos hospedeiros definitivos, caracterizando o ciclo enteroepitelial (DUBEY et al., 2007) (Figura 8). Os hospedeiros definitivos são obrigatoriamente os carnívoros, sendo até então descritos o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) (McALLISTER et al., 1998; LINDSAY et al., 1999), o coiote (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), o dingo (cão silvestre australiano – *Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2014).

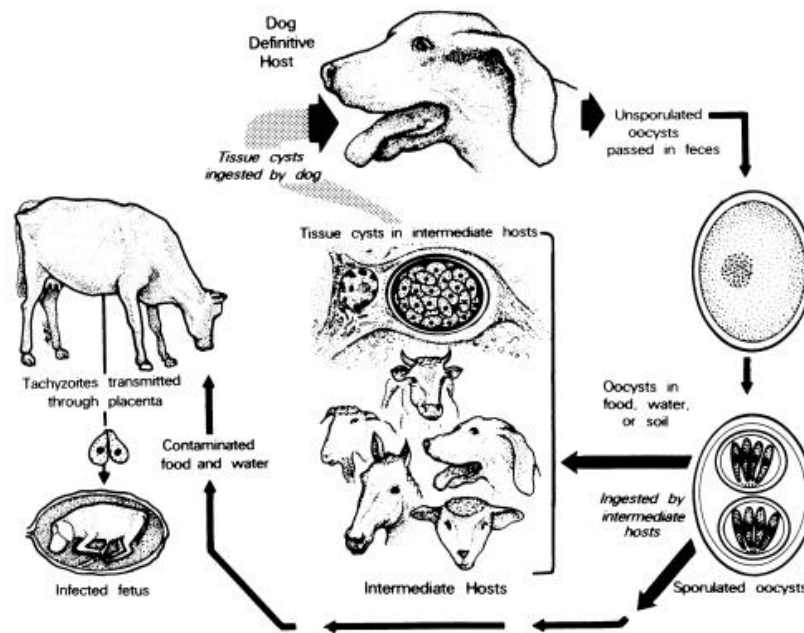


Figura 8 – Ciclo Biológico de *Neospora caninum* (DUBEY, 2003)

O potencial zoonótico deste protozoário ainda não foi completamente elucidado, mas relatos de humanos sororreagentes portadores ou não de imunodeficiência e o sucesso da infecção experimental em primatas não-humanos levanta algumas dúvidas sobre o assunto (DUBEY et al., 2007; BENETTI et al., 2009).

A identificação de *N. caninum* em uma ampla gama de espécies silvestres fez surgir a possibilidade da existência de uma importante cadeia de transmissão silvestre. O ciclo silvestre da neosporose envolve canídeos e herbívoros selvagens e poderia ter real impacto na epidemiologia da doença nos rebanhos domésticos, sobretudo nas criações extensivas (GONDIM, 2006). Barling et al. (2000) consideraram a soropositividade de rebanhos bovinos para *N. caninum* e a presença de canídeos silvestres na região estudada (coiotes e raposas cinzentas) e determinaram que há um aumento no risco de infecção por *N. caninum* nos rebanhos bovinos diante da presença destes canídeos silvestres. Outro estudo demonstrou um aumento no risco de infecção, sobretudo em rebanhos de corte, quando estão presentes canídeos silvestres nas imediações (ROSYPAL e LINDSAY, 2005).

No Brasil, Cañón-Franco et al. (2002) detectaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em cachorro-do-mato e em graxaim, sugerindo pela primeira vez que essas espécies de canídeos, comuns da fauna brasileira, possam atuar como hospedeiros definitivos do agente. No Brasil, Mattos et al. (2008) relataram 36% de prevalência para o protozoário em

cachorro-do-mato, lobo-guará e graxaim mantidos em cativeiro e Andre et al. (2010) identificaram anticorpos anti- *N. caninum* em 41,2% em dos canídeos silvestres mantidos em cativeiro, com destaque para o cachorro-vinagre e raposa-do-campo. No entanto, Almeida et al. (2012) e Almeida et al. (2010) não encontraram positividade em lobos-guarás de vida livre em Minas Gerais.

2.3.3. *Leishmania* spp.

A leishmaniose é uma doença zoonótica que acomete cerca de 12 milhões de indivíduos da população mundial e é causada pelo protozoário *Leishmania* spp. A elevada incidência de leishmaniose com lesões desfigurantes (forma cutânea) e, algumas vezes, com evolução fatal (forma visceral) fez com que a Organização Mundial da Saúde classificasse a doença como uma das seis mais importantes endemias do mundo (WHO, 2010). Essencialmente existem dois tipos de leishmanioses: a visceral (LV) e a tegumentar (LT). A LV é causada por parasitos do complexo *L. (Leishmania) donovani*, sendo que no Brasil a espécie responsável é a *L. chagasi* (GONTIJO e MELO, 2004). A LT é causada por diversas espécies, sendo seis delas com ocorrência descrita no Brasil: *L. amazonensis*; *L. braziliensis*; *L. guyanensis*; *L. lainsoni*; *L. naiffi*; e *L. shawi* (BASANO e CAMARGO, 2004). Os mamíferos são considerados os principais reservatórios e os mosquitos da subfamília Phlebotominae, popularmente chamados de flebotomíneos são os vetores (FORNAZARI e LANGONI, 2014).

A infecção ocorre por meio da picada do mosquito, pela inoculação da forma promastigota metacíclica do protozoário durante o repasto sanguíneo; o vetor se infecta do mesmo modo, ingerindo a forma amastigota do protozoário, livre ou no interior de macrófagos, ao se alimentar do sangue de um hospedeiro infectado (QUINNEL e COURTENAY, 2009) (Figura 9). A leishmaniose é uma doença associada à degradação ambiental, forçando a migração da doença para áreas urbanas e, desse modo, facilitando a infecção humana (OLIVEIRA, 1997).

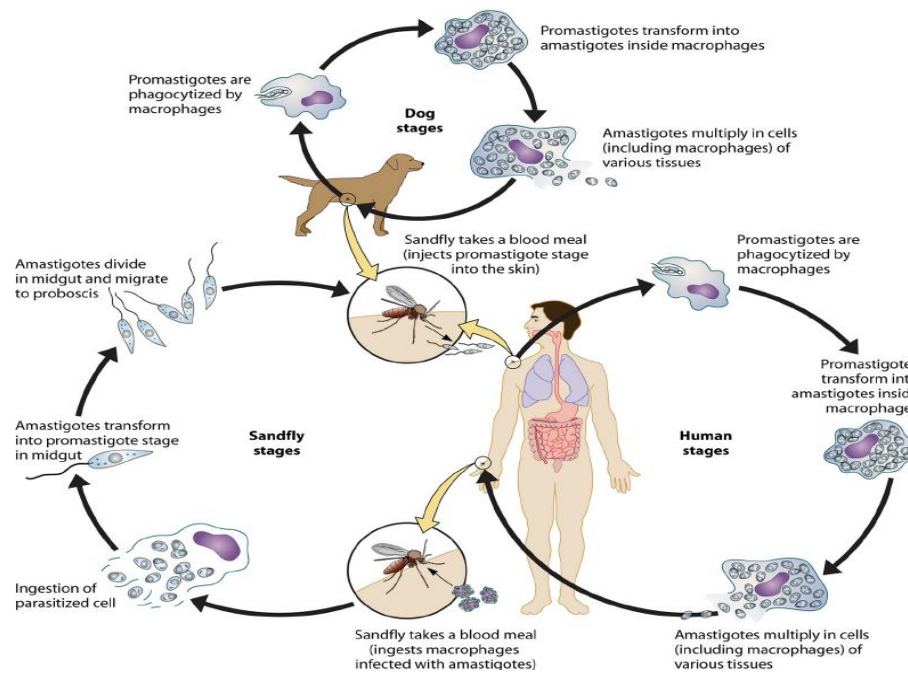


Figura 9 – Ciclo Biológico de *Leishmania* spp. (ESCH e PETERSEN, 2013)

Embora os cães domésticos sejam os principais reservatórios vertebrados para a forma visceral da doença, os canídeos silvestres podem também atuar como reservatório (ASHFORD, 2000). O cachorro-do-mato, o cachorro-vinagre e a raposa-do-campo estão entre as espécies mais descritas na literatura acometidas por leishmaniose (COURTENAY et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2008; LUPPI et al., 2008). O cachorro-do-mato embora infectado, raramente manifesta sinais clínicos e aqueles que exibem o quadro da doença, costumam se recuperar espontaneamente (COURTENAY et al., 2002).

Prevalências de anticorpos anti- *Leishmania* spp. de 21,4% em canídeos silvestres foi relatada por Jusi et al. (2011) em São Paulo, 19% por Curi et al. (2006), de 3,57% por Santos et al. (2012), ambos em Minas Gerais. No Brasil, Courtenay et al. (2002) demonstraram uma elevada prevalência de cachorros-do-mato infectados por *L. chagasi*, mas uma baixa infectividade. Por outro lado, Catenacci et al. (2010) pesquisaram *Leishmania* spp. em cachorro-do-mato de diferentes zoológicos de São Paulo, porém não encontraram a presença do protozoário nesses animais. Evidências moleculares revelaram a presença do DNA de *L. chagasi* no cachorro-vinagre (LOMBARDI et al., 2014) em Minas Gerais e no cachorro-do-mato (TENÓRIO et al., 2011) em São Paulo, ambos criados em cativeiro. Neste caso, os animais em cativeiro adquirem um papel importante na cadeia de transmissão da *Leishmania*

spp., sendo um risco principalmente para os profissionais de zoológicos (veterinários e tratadores) além do público em geral.

2.3.4. *Leptospira* sp.

O agente etiológico da leptospirose pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, gênero *Leptospira* (PASTER et al., 1991). É caracterizado por bactérias de forma espiral longa, finas e flexíveis, com uma ou ambas as extremidades curvadas em forma de gancho. São aeróbias obrigatórias, apresentam crescimento fastidioso *in vitro* nos meios de Fletcher ou Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (LEVETT et al., 2001). Esse agente possui uma ampla gama de variantes sorológicas, adaptadas ao seu hospedeiro, cursando com um quadro subclínico ou incidindo de forma acidental ao seu hospedeiro e levando a quadros clínicos mais graves. Afeta os animais domésticos, selvagens e humanos, representando, portanto, um importante problema de saúde pública (FAINE et al., 1999). O gênero é dividido em duas espécies: *L. biflexa* e *L. interrogans*, ambas subdivididas em sorogrupos e sorovariedades. As sorovariedades de *L. biflexa* são consideradas de vida livre, saprófitas, enquanto as da *L. interrogans* são responsáveis pela infecção nos animais domésticos e no homem (BHARTI et al., 2003).

Diferentes espécies de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* podem causar a leptospirose e, atualmente, são conhecidas mais de 200 sorovares, variedades baseadas em aspectos fenotípicos das leptospiras (BHARTI et al., 2003). Apresenta distribuição cosmopolita, com ocorrência mais frequente em regiões tropicais, onde as condições de umidade e temperatura possibilitam a sobrevivência da bactéria no ambiente. A infecção acontece, sobretudo, via oral e por penetração ativa da bactéria pelas mucosas ou soluções de continuidade. Nos seres humanos os sinais clínicos mais comumente relatados são febre, mialgia, icterícia, hemorragias generalizadas, pneumonia e quadro de insuficiência renal (BHARTI et al., 2003). O reservatório mais importante é o roedor sinantrópico *Rattus norvegicus* (MOHAN RAO, 2006), popularmente chamado de ratazana.

Estudos epidemiológicos de leptospirose em canídeos silvestres de vida livre são escassos, dificultando uma melhor compreensão da epidemiologia da doença nesse grupo de indivíduos (GIRIO et al., 1999), embora tenham ganho maior atenção da comunidade científica nos últimos anos (GUERRA-NETO, 2006). Rodrigues et al. (2015) relataram a presença da infecção em cachorro-do-mato, com predominância dos sorovares Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo e Hbedomadis, em lobo-guará e destaque para os sorovares Hardjo e

Copenhageni. O carnivorismo e a capacidade de percorrer diferentes territórios favorecem o contato desses canídeos com reservatórios sinantrópicos e domésticos da doença (JORGE, 2008). Na Paraíba, canídeos silvestres de vida livre, mortos em estrada foram testados para *Leptospira*, mas não foram encontrados indivíduos positivos (AZEVEDO et al., 2010)

Em animais mantidos em cativeiro não são incomuns os casos positivos para a infecção (LUNA-ALVAREZ, 1996). A positividade foi previamente descrita em cachorro-domato, sorovar Grippotyphosa e em lobo-guará para o sorovar Canicola (ESTEVES et al., 2005) e do sorovar Interrogans nas duas espécies citadas anteriormente (LILENBAUM et al., 2002). Outras descrições podem ser encontradas na literatura como o relato dos sorovares Pyrogenes e Hebdomadis em cachorro-do-mato e dos sorovares Autumnalis e Pomona em lobo-guará (LENHARO et al., 2012). Naturalmente, as condições existentes em zoológico favorecem a cadeia de transmissão da bactéria quando analisada em paralelo com a situação que ocorre em vida livre, facilitando a ocorrência de casos da doença (RODRIGUES et al., 2015). Fica caracterizado o risco de infecção para o ser humano, principalmente os tratadores, uma vez que existe a chance de disseminação da bactéria pela urina dos roedores e de sua manutenção em locais úmidos como áreas de alagamento e/ou bebedouros em vários recintos dos zoológicos (LENHARO et al., 2012).

2.3.5. *Clostridium difficile* e *C. perfringens*

Clostridium difficile é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio obrigatório e capaz de esporular mesmo em situações atípicas, além de ser considerado um patógeno emergente, responsável por uma casuística considerável de diarreia nosocomial e colite pseudomembranosa em humanos (BALASSIANO et al., 2011). Loo et al. (2011) descreveram casos de infecção por este patógeno em pacientes idosos hospitalizados e em esquema de tratamento com antibióticos. No Brasil, as informações sobre a doença em seres humanos ainda são escassas, embora haja relato de surto hospitalar (BALASSIANO et al., 2010) e um estudo transversal de episódios de diarreia nosocomial (BALASSIANO et al., 2011), ambos no Rio de Janeiro.

A hipótese de um ciclo zoonótico foi sugerida por Borriello et al. (1983) após realizarem o isolamento do patógeno em fezes de cães e gatos. Posteriormente, com o advento da técnica de ribotipagem foi possível elaborar um banco de dados com mais de 160 padrões ou ribotipos a partir de isolados de *C. difficile* obtidos a partir de amostras de animais,

humanos e ambientais (STUBBS et al., 2000). Desse modo, foi possível identificar semelhanças entre os isolados de *C. difficile* obtidos a partir de produtos cárneos destinados ao consumo humano com os isolados de humanos com quadro clínico de colite pseudomembranosa, apontando uma eventual transmissão da bactéria por alimentos de origem animal (SONGER et al., 2009). A mesma similaridade foi observada entre os isolados de humanos e bovinos, suínos e cães (ARROYO et al., 2005; JHUNG et al., 2008). Tais resultados chamam a atenção das autoridades sanitárias e da comunidade científica no intuito de prevenir casos zoonóticos da doença. No Brasil, ainda são necessários estudos mais aprofundados avaliando os ribotipos de *C. difficile* de animais domésticos com o objetivo de comparar com cepas isoladas de humanos (SILVA, 2014).

Apesar de evidências da possível transmissão de *C. difficile* de animais domésticos para humanos, o papel dos animais silvestres como reservatório ainda é pouco compreendido, embora casos clínicos da doença tenham sido relatados em diferentes espécies (BOJENSEN et al., 2006; JARDINE et al., 2010; BANDELJ et al., 2011). Detecção de *C. difficile* foi reportada também em elefantes, na Dinamarca, e focas, no Canadá (BOJENSEN et al., 2006; ANDERSON et al., 2015). Tem sido descrita uma baixa taxa de eliminação fecal do patógeno em animais silvestres, como os carnívoros, incluindo o isolamento de *C. difficile* de amostras de fezes de uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*) em tratamento com antibioticoterapia devido a um quadro de diarreia e em amostras de fezes de um lobo-guará aparentemente saudável (SILVA et al., 2014 a). São necessários estudos mais aprofundados que confirmem a existência de um ciclo zoonótico de *C. difficile*, no entanto, fica evidente um possível desafio para os profissionais da saúde pública, diante de um patógeno que pode ter como reservatórios animais silvestres como os canídeos.

C. perfringens é um bacilo Gram positivo, formador de esporo, apresenta cápsula, é imóvel e tem intensa atividade metabólica em alimentos (McCLANE et al., 2006). Devido à alta capacidade de esporulação, as bactérias desse gênero são capazes de se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos, representando um risco significativo para a população animal e humana (LOBATO et al., 2013). Essa bactéria pode ser classificada em cinco tipos (A-E), com base na produção de quatro toxinas principais, denominadas alfa, beta, épsilon e iota (LOBATO et al., 2006).

C. perfringens é o principal agente responsável por quadros de enterotoxemias provocadas por clostrídios, estando amplamente associada a relatos de disenteria em cordeiros neonatos; enterite hemorrágica em bezerros, caprinos e equinos, enterite necrótica em aves

domésticas, bovinos, cães, equinos, ovinos, suínos e humanos (LOBATO et al., 2007; ALMEIDA, 2010). Mesmo sendo capazes de produzir doença em animais e seres humanos, são raramente considerados agentes zoonóticos (LOBATO et al., 2013)

Em animais silvestres, *C. perfringens* já foi descrito em cachorro-do-mato, gato do mato (*Leopardus tigrinus*), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (SILVA et al., 2014). Casos clínicos graves foram relatados em um tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*), resultando em óbito e em um leão (*Panthera leo*) com enterocolite hemorrágica provocada por *C. perfringens* tipo A (ZHANG et al., 2012), além de neurotoxicidade em um tigre devido a *C. perfringens* tipo B (ZEIRA et al., 2012).

2.3.6. *Sarcoptes scabiei*

A sarna sarcóptica ou escabiose é causada por diferentes variedades de *Sarcoptes scabiei*, denominados de acordo com o hospedeiro parasitado (RIET-CORREA et al., 2007). Trata-se de uma dermatite altamente contagiosa com característica razoavelmente hospedeiro-específica, podendo infestar humanos (PINCHBECK e HILLIER, 2008).

A partir do momento em que a fêmea fecundada entra em contacto com a camada superficial da pele (epiderme), esta deposita cerca de 2 a 3 ovos por dia. Após o processo de eclosão, surgem as larvas hexápodas que acabam por migrar para a epiderme e após 3-4 dias originam a ninfa octópode e, um mês após a eclosão, transformam-se em adultos machos e fêmeas. Segue-se o acasalamento entre o macho e a fêmea adulta (NEVES, 2005). A perfuração da epiderme por *S. scabiei* provoca forte prurido e eritema/exantema (erupção cutânea), sendo frequente o aparecimento de vesículas e pápulas muitas vezes acompanhadas de placas eczematosas. Este prurido é irritante à noite, devido o hospedeiro estar aquecido o que auxilia a deslocação do parasito na superfície cutânea. O prurido favorece infecções microbianas secundárias, formação de pústulas ou nódulos e, em casos mais graves, com exsudação e hemorragia (NEVES, 2005, HEUKELBACH e FELDMEIER, 2006).

O aspecto zoonótico deste ácaro provocou muita discussão na comunidade científica especializada, sobretudo porque acredita-se que a infestação humana por *S. scabiei* var. *canis* é transitória e auto-limitante, cursando em apenas poucos dias e sem quaisquer evidências de que o parasito multiplique-se com sucesso neste hospedeiro (GAMITO, 2009). Outra corrente postula o oposto, fundamentada em relatos clínicos descrevendo infecção em proprietários de animais doentes (GAMITO, 2009). Vários mamíferos podem ser infestados pelo ácaro, porém, a infestação cruzada entre diferentes espécies de hospedeiros é limitada, originando

um quadro de dermatite localizada, autolimitante e de cura espontânea (HEUKELBACH e FELDMEIERS, 2006).

A sarna sarcóptica foi considerada responsável por importantes epizootias em animais silvestres (BORNSTEIN et al., 2001), incluindo a redução drástica de populações inteiras resultando em grande mortalidade. No Texas, um surto de sarna sarcóptica provocou 70% de mortalidade nos coiotes da região, resultando na queda populacional da espécie (PENCE e WINDBERG, 1994) e na Escandinávia foi descrito 90% de mortalidade entre raposas vermelhas após uma epizootia de sarna, com recuperação dos números populacionais após 10 anos do evento (LINDSTROM et al., 1994). Na Bolívia, existem relatos de sarna sarcóptica em graxaim (DEEM et al., 2002) e lobo-guará (LUQUE et al., 2014) de vida livre.

2.3.7. Dermatofitose

Trata-se de uma micose superficial, provocada por fungos com tropismo por tecidos de estruturas queratinizadas (pelos, unhas e pele), raramente parasitando células vivas, denominados dermatófitos. Estes fungos fazem parte da microbiota normal do solo e, em circunstâncias especiais, podem parasitar animais e os humanos. A maioria dos casos clínicos de dermatofitose em gatos e cães é causada por três fungos: *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, sendo organizados conforme seu habitat natural em: geofílico, zoofílico e antropofílico (ARANTE et al., 2003).

M. gypseum são geofílicos (solo) e decompõem os substratos queratinosos, apresentando distribuição mundial, enquanto *M. canis* é zoofílico, ou seja, está adaptado ao animal e, dificilmente são encontrados no solo (SILVA et al., 1998). Os sinais clínicos e sintomas podem variar de brandos a severos conforme o estado imunológico do hospedeiro mas, geralmente, não há invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões características nas infecções de pele são circulares, eritematosas e pruriginosas, produto da atividade direta do fungo ou subsequente às reações de hipersensibilidade ao microrganismo ou a seus metabólitos (DEGREEF, 2008). De modo geral, as infecções causadas por dermatófitos restringem-se às regiões superficiais da epiderme, porém existe a possibilidade desses fungos atuarem de maneira invasiva, provocando infecção profunda e disseminada, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (RODWELL et al., 2008)

As dermatofitoses possuem prevalência significativa na América Latina e são consideradas zoonose, sendo comum observar a infecção nos animais e também no humano

(PINHEIRO et al., 1997; BETANCOURT et al., 2009). É uma das micoses mais comuns no mundo, figurando entre os principais problemas de pele em indivíduos com mais de 12 anos (PINHEIRO et al., 1997) com a sua morbidade variando conforme a sazonalidade e a presença de reservatórios (MACIEL e VIANA, 2005). Apesar da existência do ciclo zoonótico, ainda são escassos os estudos sobre a ocorrência de doenças fúngicas em animais silvestres (LIMA et al., 2011). No entanto, infecção por *M. canis* foi descrita em raposa cinza por Levenberg et al. (1960) e em raposa-vermelha com contato estreito com um gato persa assintomático (MALMASI et al., 2009).

2.4. Estratégias para o Controle e Prevenção de Zoonoses em Vida Silvestre

O apoio na prevenção e controle de zoonoses é realizado por órgãos como a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), fundada em 1924 e, atualmente, com mais de 180 países-membros, além de 247 laboratórios de referência, que abrangem 117 doenças ou tópicos em 38 países, e 49 centros colaboradores, que abrangem 46 tópicos em 26 países. Paralelamente às ações da OIE, ações são desenvolvidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (ZANELLA, 2016).

Diferentes abordagens podem ser executadas ou aperfeiçoadas por órgãos competentes como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Saúde, Ministério do Meio Ambiente, entre outros, bem como as correspondentes Secretarias dos Estados e de órgãos de classe, como o Conselho Federal de Medicina Veterinária, em parceria com ONGs, Universidades, entre outras, com o objetivo do controle de zoonoses. Estudos contínuos da dinâmica das populações silvestres, sobretudo daquelas de interesse em saúde coletiva, planejamento e avaliação rotineira de testes de diagnóstico, além de ações de vigilância entomológica, manutenção de informações atualizadas sobre resultados de investigação de focos, principalmente no caso de zoonoses que envolvem notificação compulsória (SILVA, 2004).

A compreensão da epidemiologia das zoonoses e suas vias de transmissão é essencial para delinear estratégias adequadas de prevenção (MARVULO, 2006). É importante destacar que algumas zoonoses podem apresentar um curso sub-clínico em animais selvagens, de modo a introdução de novos animais requer protocolos rigorosos de biossegurança minimizando os riscos à saúde dos contactantes e para outros animais (TAYLOR et al., 2001).

Outro ponto-chave é o combate ao comércio ilícito da fauna silvestre e, para tal, é necessário investir em infraestrutura, capacitação de recursos humanos e equipamentos para as ações de vigilância.

As epidemias de ebola têm causado preocupação na comunidade científica e entre os profissionais da área da saúde. As tentativas de conter a rápida disseminação da doença entre os primatas não humanos e posteriormente em seres humanos estimulou o trabalho conjunto entre diferentes grupos de pesquisa, governo do Gabão e da República do Congo e organizações como a Sociedade de Conservação da Vida Selvagem e o Fundo Mundial da Vida Selvagem, dentre outras, formando a Rede de Monitoramento de Mortalidade Animal. Essa rede tem como objetivo noticiar e investigar óbitos entre primatas não humanos, com comunicação rápida do evento e dos resultados da investigação, mantendo os membros da rede informados sobre um possível caso da doença. Essa força tarefa permite que haja tempo adequado para que os governos e instituições tomem medidas de prevenção e controle, reduzindo a rápida disseminação da doença (NRC, 2008).

Outro ponto a ser enfatizado é que a educação da população é imprescindível para a conscientização sobre os riscos e responsabilidades legais no comércio ilegal da fauna (ZANELLA, 2016). Conforme o disposto em legislação específica de crimes ambientais: matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, pode obter uma pena de detenção de 6 meses a 1 ano, e multa. Algumas circunstâncias podem agravar a pena, como por exemplo, a reincidência nos crimes de natureza ambiental atingir espécies ameaçadas listadas em relatórios oficiais (BRASIL, 1998).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

✓ Identificar a ocorrência de patógenos de interesse em saúde animal e saúde pública em canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre no Nordeste do Brasil.

3.2. Específicos

✓ Diagnosticar, por meio de técnicas diretas, sorológicas e moleculares, protozoários e bactérias de interesse em saúde única em canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre no Nordeste do Brasil.

✓ Investigar se existe diferença na ocorrência de patógenos entre os canídeos silvestres de cativeiro e os de vida livre no Nordeste do Brasil.

✓ Fornecer informações atuais sobre a ocorrência de patógenos de interesse em saúde única em canídeos silvestres de cativeiro e de vida livre no Nordeste do Brasil.

4. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. 2.ed. Washington: OPAS/OMS, 1986, p.420

AGUIRRE, A.A. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. **Parasites & Vectors**, v.2, p.7, 2009.

ALEXANDER, K.A.; APPEL, M.J.G. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic dogs near the Masai Mara National Reserve, Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, v.30, p.481-485, 1994.

ALMEIDA, A.F.; CARVALHO, M.A.S.; SUMMA, M.E.L. Levantamento da avifauna da Região Metropolitana de São Paulo atendidas pela Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre. **Boletim CEO**, v.15, p.17-26, 2003.

ALMEIDA CURI, N.H. et al. Pathogens of wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v.48, p.1052-1056, 2012.

ALMEIDA CURI N.H. et al. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. **Biodiversity and Conservation**, v.19, p.3513-3524, 2010.

ALMEIDA, M.O. **Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* tipo B e sua aplicação na imunização de animais.** 2010. 97f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

ANDERSON, C.E. et al. Clinical and epidemiologic considerations of *Clostridium difficile* in harbor seals (*Phoca vitulina*) at a marine mammal rehabilitation center. **Journal of Zoology and Wildlife Medicine**, v.46, p.191-197. 2015.

ANDRE, M.R. et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **Journal of Parasitology**, v.96, p.1007- 1009, 2010.

ARANTE, F.C. et al. Micoses, dermatoses e dermatofitose. **Acta. Scientiae Veterinarie**, v.22, p.13-17, 2003.

ARROYO, L.G. et al. PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.163-166, 2005.

ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1269–1281, 2000.

AVMA (American Veterinary Medical Association). **One Health: A New Professional Imperative**. 1. Ed., Schaumburg: AVMA Press, p. 76, 2008

AZEVEDO, S.S. et al. Anticorpos anti-*Brucella abortus*, anti-*Brucella canis* e anti-*Leptospira* spp. em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Online.

BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOSFILHO, J.; DE OLIVEIRA, M.P. et al. An outbreak case of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among elderly inpatients of an intensive care unit of a tertiary hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.68, p.449-455, 2010.

BALASSIANO, I.T.; DOS SANTOSFILHO, J.; VITAL-BRAZIL, J.M. et al. Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.99, p.249-55, 2011.

BANDELJ, P. et al. Zero prevalence of *Clostridium difficile* in wild passerine birds in Europe. **FEMS Microbiology Letters**, v.321, p.183–185, 2011.

BARLING, K.S. et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.217, p.1356–1360, 2000.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.328-337, 2004.

BENETTI, A.H. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região Sudoeste do Estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p. 29-33, 2009.

BENGIS, R.G.; KOCK, R.A.; FISCHER, J. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Épizooties**, v.21, p.53-65, 2002.

BERNARDI, F. et al. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. **Journal of General Virology**, v.86, p.3153-3162, 2005.

BETANCOURT, O. et al. *Microsporium canis* em gatos dermatologicamente sanos em Temuco, Chile. **Iberoamericana de Micologia**, v.26, p.206-210, 2009.

BHARTI, A.R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**. v.3, p.757–771, 2003.

BOJESEN, A.M.; OLSEN, K.E.; BERTELSEN, M.F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.329-335, 2006.

BORNSTEIN, S.; MORNER, T.; SAMUEL, W.M. *Sarcoptes scabiei* and sarcoptic mange. In: SAMUEL, W.M.; PYBUS, M. J.; KOCAN, A.A. **Parasitic diseases of wild mammals**, 2. ed., Ames: Iowa State University Press, p.107–119, 2001.

BORRIELLO, S.P. et al. Household pets as a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. **Journal of Clinical Pathology**, v.36, p.84-87, 1983.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, 17 fev. 1998. Seção 1, p. 1.

BROWN, C. Virchow revisited: emerging zoonoses. **ASM News**, v.69, p.493-497, 2003.

CAÑON-FRANCO, W.A. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em canídeos silvestres do Brasil. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 2002.

CARNIELI JR, P. et al. Characterization of Rabies virus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. **Virus Research**, v.131, p.33-46, 2008.

CATENACCI, L.S. et al. *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.

CHECK, E. Health concerns prompt US review of. **Nature**, v.427, p.277, 2004.

CHOMEL, B.B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F.-X. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.6-11, 2007.

CLEAVELAND, S. et al. The conservation relevance of epidemiological research into carnivore viral diseases in the serengeti. **Conservation Biology**, v.21, p.612-622, 2007.

CORRÊA, S.H.R.; PASSOS, E.C. Wild Animals and Public Health. In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State University Press. p.493-499, 2001.

COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1314–1320, 2002.

CURI, N.H.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S.A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p.99–101, 2006.

CUTLER, S.J. et al. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.1-7, 2010.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**, v.78, p.103-116, 2001.

DAVIDSON, W.R. et al. Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v.28, p.28-33, 1992.

DEEM, S.L. et al. Sarcoptic mange in free-ranging pampas foxes in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, p.625-628, 2002.

DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**, v.166, p.257-265, 2008

DÍAZ LUQUE, J.A. et al. Clinical signs suggestive of mange infestation in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) in the Moxos Savannahs of Beni, Bolivia. **Mastozoología Neotropical**, v.21, p.135-138, 2014.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, p.1-16, 2003.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.57-72, 2004.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2.ed. New York: CRC Press Taylor and Francis Group, 2010. 313p.

DUBEY, J.P. et al. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*) **Veterinary Parasitology**, v.201, p.150–153, 2014.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, p.58–85, 2013.

ESTEVEZ, F.M. et al. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.283-288. 2005.

FAINE et al. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne: MediSci, 1999. 272p

FERROGLIO, E. et al. *Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps. **Parasite & Vectors**, v.7, p.196, 2014.

FIGUEIREDO, F.B. et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.200–201, 2008.

FORNAZARI, F.; LANGONI H. Principais zoonoses em mamíferos selvagens. **Veterinária e Zootecnia**, v.21, p.10-24, 2014.

FOWLER, M. E. Zoo and Wild Animal Medicine. 2.ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1986, 992p.

GAMITO, M.S.R. **Dermatites parasitárias no cão**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2009.

GASCOYNE, S.C. et al. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Serengeti region, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases**, v.29, p.396-402, 1993.

GENNARI, S.M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.337-340, 2004.

GIRIO, R.J.S. et al. Pesquisa de infecção por *Leptospira interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.65, p.87, 1999.

GODFROID, J. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Veterinary Research**, v.36, p.313–326, 2005.

GODOY, S.N. **Patologia comparada de passeriformes oriundos do tráfico – Implicações na soltura**. 2006. 110f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

GONDIM, L.F.P. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife: a review. **Trends in Parasitology**, v.22, p.247-252, 2006.

GONTIJO, C.M.; MELO, M.N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.338-49, 2004.

GUERRA-NETO, G. **Frequência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em felídeos neotropicais em cativeiro no Brasil**. 2006. 50f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

HAYDON, D.T. et al. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging Infection Diseases**, v.8, p.1468-1473, 2002.

HENNEMAN III, W.W.; THOMPSON, S. D.; KONECNY, M. J. Metabolism of crab-eating foxes, *Cerdocyon thous*: ecological influences on the energetics of canids. **Physiological Zoology**, v.56, p.319–324, 1983.

HEUKELBACH, J.; FELDMEIER, H. Scabies. **The Lancet**. v.367, p.1767-1774, 2006.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p.634-640, 2002.

HOFMEYR, M. et al. Rabies in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in the Madikwe Game Reserve, South Africa. **Veterinary Record**, v.146, p.50-52, 2000.

INSTITUTO HÓRUS DE DESENVOLVIMENTO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL. Fauna - Mammalia. 2006. Disponível em: <<http://www.institutohorus.org.br>>. Acesso em: 10/01/2017.

JARDINE, C. et al. *Clostridium difficile* in wild small mammals. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.033985-0#tab2>> Acesso em: 11/02/2017

JAVMA (Journal of American Veterinary Medical Association). **One medicine approach hinges on local leadership and participation**, v.232, p.817-819, 2007

JHUNG, M.A. et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1039-1045, 2008.

JORGE, R.S.P. et al. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecologia Australis**, v.14, p.686-710, 2010.

JUSI, M.M. et al. Molecular and serological detection of *Leishmania* sp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.219-222, 2011.

KARESH, W.B. et al. Wildlife trade and global disease emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.1000-1002, 2005.

KING, J.S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.40, p. 945-950, 2010.

KRUSE, H.; KIRKEMO, A.M.; HANDELAND, K. Wildlife as source of zoonotic infections. **Emerging Infection Diseases**, v.10, p.2067-2072, 2004

LENHARO, D.K.; SANTIAGO, M.E.B.; LUCHEIS, S.B. Avaliação Sorológica para Leptospirose em Mamíferos Silvestres Procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, p.333-341, 2012.

LEVENBERG, I.G. *Microsporium* infection in silver-gray foxes. **Trudy Vesoyies Institute Veterinary**, v.16, p.379-382, 1960.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.296-326, 2001

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. 2000. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais e Instituto de Biologia. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/sbf/chm/relpub.html> Acesso em: 03/02/2017.

LILENBAUM, W. et al. Leptospirosis antibodies in mammals from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.73, p.319-321, 2002

LIMA, B. et al. Essential oils of medicinal plants from the Central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, p.924-936, 2011.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.82, p.327-333, 1999.

LINDSTRÖM, E. et al. Disease reveals the predator: sarcoptic mange, red fox predation, and prey populations. **Ecology**, v.75, p.1042-1049, 1994.

LOBATO, F.C.F. et al. Enterotoxemia em bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.952-954, 2006.

LOBATO, F.C.F. et al. Clostridioses dos pequenos ruminantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.23-34, 2007.

LOBATO, F.C.F. et al. Clostridioses dos Animais de Produção. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.29-48, 2013.

LOMBARDI, M.C. et al. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, p.1243-1246, 2014.

LOO, V.G. et al. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. **The New England Journal of Medicine**, v.365, p.1693–1703, 2011.

LUNA-ALVAREZ, M.A. et al. Serological survey of leptospirosis in captive wildlife at the Chapultepec Zoo in Mexico City. **Veterinaria (Mexico)**, v.27, p.229-234, 1996.

LUPPI, M.M. et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.146-151, 2008.

MACIEL, A.S.; VIANA, J.A. Dermatofitose em cães e gatos. **Revista Clínica Veterinária**, v.56, p.48-56, 2005.

MAIA, O.B.; GOUVEIA, A.M.G. Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, p.25-32, 2002.

MALMASI, A., et al. *Microsporium canis* infection in a red fox (*Vulpes vulpes*). **Iranian Journal of Veterinary Reserarch**, v.10, p.189-191, 2009.

MARVULO, M.F.V. Zoonoses. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. 1. ed. São Paulo: Roca, p.1250– 1256, 2006.

MARÍ SAÉZ, A. et al. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. **EMBO Molecular Medicine**, v.7, p.17-23, 2015.

MATTOS, B.C. et al. Seroprevalence of antibodies anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* in captive wild canids. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, p.267-272, 2008.

MCALLISTER, M.M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

MCCLANE, B.A. et al. The enterotoxic clostridia. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag; p.698– 752, 2006.

MERMIN, J. et al. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.253-261, 2004.

MOHAN RAO, A.M.K. Preventive measures for leptospirosis: Rodent control. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.24, p.325-328, 2006.

MÖRNER, T.; OBENDORF, D.L.; ARTOIS, M. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, v.21, p.67-76, 2002.

NASCIMENTO, C.O. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in Brazil. **Acta Tropica**, v.146, p.60-65, 2015.

- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana* 11.ed. Rio de Janeiro - São Paulo: Atheneu, 2005, 498p
- NRC (National Research Council). **Committee on Achieving Sustainable Global Capacity for Surveillance and Response to Emerging Diseases of Zoonotic Origin**, 1.ed., Washington: National Academies Press, p. 152, 2008.
- NUNES, O.C. **Animais silvestres e zoonoses: O exemplo da salmonelose em jabutis-piranga (*Geochelone carbonaria*)**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2007.
- OMS – **Organização Mundial da Saúde**. 2004. Report of the Scientific Working Group Meeting on Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr>> Acesso em: 10/02/2017.
- PASTER, B.J. et al. Phylogenetic Analysis of the Spirochetes. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.6101- 6109, 1991.
- PATZ, J.A. et al. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal of Parasitology**, v.30, p.1395-1405, 2000.
- PEARCE-DUVET, J.M.C. The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease. **Biological Reviews**, v.81, p.369-382, 2006.
- PENCE, D.B.; WINDBERG, F. Impact of a sarcoptic mange epizootic on a coyote population. **Journal of Wildlife Management**, v.58, p.624-633, 1994.
- PINCHBECK, L. R.; HILLIER, A. Escabiose, Sarna Notoédrica e Queiletielose. In: BIRCHARD, S.J. **Manual Saunders, Clínica de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, p.473-478, 2008.
- PINHEIRO, A.D.Q. et al. Dermatofitose no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p.287-294, 1997.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.136, p.1915-1934, 2009.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3.ed. Santa Maria: Palotti, 2007, 722p.

RODRIGUES, T.C.S., et al. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in free-ranging wild canids from the Brazilian savanna. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.734-740, 2015.

RODWELL, G.E. et al. The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus. **International Journal of Dermatology**, v.47, p.339-343, 2008.

ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? **Trends in Parasitology**, v.21, p.439-440, 2005.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, v.2, p.24-28, 1997.

SANTOS, J.L.C. et al. Parasites of domestic and wild canids in the region of Serra do Cipó National Park, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.270-277, 2012.

SEIMENIS, A.M. The spread of zoonoses and other infectious diseases through the international trade of animals and animal products. **Veterinaria Italiana**, v.44, p.591-599, 2008.

SILLERO-ZUBIRI, C. et al. Rabies and mortality in ethiopian wolves (*Canis simensis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.32, p.80-86, 1996.

SILVA, J.C.R. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.102, p.217-224, 2001.

SILVA, J.C.R. 2004. Zoonoses e Doenças Emergentes Transmitidas por Animais Silvestres. Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens/ABRAVAS. Disponível em: <http://r1.ufrj.br/adivaldofonseca/wp-content/uploads/2014/06/Ramos-Silva-JC-2004-Doencas-Emergentes-e-Zoonoses-Animais-Silvestres-www-abravas-org-br-.pdf>. Acesso em: 02/fevereiro/2017.

SILVA, J.C.R. Toxoplasmose. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. 1.ed. São Paulo: Roca; p.768-784, 2006.

SILVA, L.L.H. et al. Dermatofitose na saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.102-103, 1998.

SILVA, R.O. et al. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. **Anaerobe**, v.28, p.207-211, 2014a.

SILVA, R.O. et al. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. **Anaerobe**, v.30, p.99-101, 2014b.

SONGER, J.G. et al. Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.377-380, 2009.

STUBBS, S. et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. **FEMS Microbiology Letters**, v.186, p.307-312, 2000.

SUTEU, O. et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Romania are carriers of *Toxoplasma gondii* but not *Neospora caninum*. **Journal of Wildlife Diseases**, v.50, p.713-716, 2014.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Science**, v.356, p.983-989, 2001.

TENÓRIO, M.S. et al. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **Journal of Zoology and Wildlife Medicine**, v.42, p.608-616, 2011.

TENTER, A.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.217-258, 2000.

TORO, R.R. Las especies silvestres en la transmisión de zoonosis en las Américas. **In: 9ª Reunión Interamericana a Nivel Ministerial, sobre el Control de la Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis**, 1976, Caracas. Venezuela: Organización Panamericana de La Salud; 1976. p.69-79.

VITALIANO, S.N. et al. 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.

ZANELLA, J.R.C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.510-519, 2016.

ZEIRA, O. et al. Suspected neurotoxicity due to *Clostridium perfringens* type B in a tiger (*Panthera tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.43, p.666-669, 2012.

ZHANG, Y. et al. Hemorrhagic enterocolitis and death in two felines (*Panthera tigris altaica* and *Panthera leo*) associated with *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.43, p.394-396, 2012.

WEILER, G.J.; GARNER, G.W.; RITTER, D.G. Occurrence of rabies in a wolf population in northeastern Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, p.79-82, 1995.

CAPÍTULO 1

**First isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from crab-eating fox
(*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1766).**

(artigo publicado no periódico Acta Tropica – Qualis A2)

**First isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from crab-eating fox
(*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1766).**

Jonatas Campos de Almeida¹, Renata Pimentel Bandeira de Melo¹, Camila de Moraes Pedrosa¹, Marcelo da Silva Santos², Luiz Daniel de Barros³, João Luis Garcia³, Wagner José Nascimento Porto⁴, Rinaldo Aparecido Mota¹.

¹ Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Infectious-Contagious Diseases of Domestic Animals, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

² Harmonia Veterinary Hospital, Estrada do Encanamento, 52070-000, Recife, PE, Brazil.

³ Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Animal Protozoology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

⁴ Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Universidade Federal de Alagoas, Fazenda São Luís, 57000-000, Viçosa, AL, Brazil

*Corresponding author: Tel.: +55 81 33206427. E-mail address: rinaldo.mota@hotmail.com (R.A.Mota).

Abstract

Wild animals may play an important role in the transmission and maintenance of *Toxoplasma gondii* in the environment. The purpose of the present study was to isolate and genotype *T. gondii* from a free-ranging crab-eating fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1766). A crab-eating fox in critical health condition was attended in a veterinary hospital in Recife, Pernambuco State, Brazil. The animal died despite emergency treatment. The brain was collected aseptically and destined for mouse bioassay. One isolate of *T. gondii* was obtained, and Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was used to assess genetic variability at 11 markers (SAG1, SAG2, altSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c228, c292, L358, PK1 and APICO). A murine model was used to assess the virulence of the isolate. Using the PCR-RFLP, genotype ToxoDB #13 was identified, which is considered an atypical strain. The isolate was classified as avirulent in the murine model. This is the first study to report *T. gondii* infection in the crab-eating fox.

Keywords: bioassay; genotyping; toxoplasmosis; wild canids

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan of worldwide distribution, and is thought to be capable of infecting all warm blooded animals (Tenter et al., 2000; Dubey, 2010). Felids are the only definitive hosts, shedding *T. gondii* oocysts in feces and thus contaminating the environment (Dubey et al., 2010). Canids are intermediate hosts and are involved in the mechanical transmission of the parasite (Lindsay et al., 1997).

Wild animals may play an important role in both the transmission and maintenance of *T. gondii* in the environment, but data regarding the molecular epidemiology of *T. gondii* in these animals is scarce (Pena et al., 2011; Canon-Franco et al., 2013). Wild animals are good indicators of environmental contamination by *T. gondii* oocysts (Gennari et al., 2004). *T. gondii* infection have been described in various wildlife species, particularly in canids due to their feeding habits (Wolfe et al., 2001). In wild environments, crab-eating foxes (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1766) are hunted and commercialized for animal or human consumption, being frequently ingested undercooked (Catenacci et al., 2010).

Genetic studies of *T. gondii* isolated from domestic animals in Brazil have shown a high diversity (Shwab et al., 2014), characterized by an epidemic population structure (Pena et al., 2008). Although commonly classified into one of the clonal lineages in Europe and North America (Type I, II, III), atypical strains are prevalent in Brazil, probably due to the local biodiversity (Pena et al., 2008). Thus, atypical *T. gondii* isolates obtained from wildlife are significant findings in the population structure of this protozoan (Wendte et al., 2011).

The purpose of the present study was to isolate and genotype *T. gondii* from a free-ranging crab-eating fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1766).

2. Material and methods

2.1. History, serological analysis and mouse bioassay

A young female crab-eating fox in critical health condition was attended in a veterinary hospital in Recife, Pernambuco State, Brazil. On physical examination, the fox was found to have a compound fracture of the left humerus, numerous body lacerations and severe bleeding. The animal died despite the emergency treatment. During necropsy, blood samples

were obtained by cardiac puncture and centrifuged after clot retraction at 700 x g for 10 minutes. The serum was stored at -20°C for further serological analysis. The brain was collected aseptically and destined for mouse bioassay.

A Modified Agglutination Test (MAT) was performed to detect *T. gondii* IgG antibodies as described by Desmonts and Remington (1980). Positive and negative controls were included. For the bioassay, the whole brain was macerated, homogenized with 100 mL of saline solution, filtered and centrifuged at 700 x g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended with 50 mL of saline solution and centrifuged at 470 x g for 10 minutes. The supernatant was again discarded and the pellet was resuspended in 3 ml of saline solution containing 1.000 IU of penicillin and 100 µg of streptomycin per ml. Three Swiss Webster mice (25-30g) were inoculated subcutaneously with 1 ml of the final solution. The mice were observed daily for six weeks and then euthanized, at which point blood and tissue samples were taken (brain and lungs). Blood samples were centrifuged and the serum was submitted to the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for detection of *T. gondii* IgG antibodies (cut-off 1:16), as previously described (Camargo, 1964). Tissue imprints of brain and lungs were studied for *T. gondii* cysts and tachyzoites, respectively.

For virulence assessment, the isolate of *T. gondii* was inoculated into a monolayer culture of African green monkey kidney cells MARC-145 and incubated at 37°C in a 5% CO₂. The medium was changed after 24h. Blind passages of isolation cultures were made at 4 to 7-day intervals until the parasite was observed microscopically in order to keep the total amount of cultured cells to a minimum. The amount of tachyzoites was determined by Trypan blue exclusion, followed by direct counting in a Neubauer chamber (Regidor-Cerrillo et al., 2008). An aliquot of 10⁷ tachyzoites was inoculated intraperitoneally into three mice. The mice were observed daily for four weeks and euthanized at the end of this period, when blood and brain samples were collected. The serum was submitted to IFAT and the brain was studied for *T. gondii* cysts.

2.2. DNA extraction and molecular diagnosis

DNA was extracted from the crab-eating fox and mice brain samples using a commercial kit "Wizard SV Genomic DNA Purification System" (Promega®), according to the manufacturer's protocol. Positive and negative controls were included. For detection of *T. gondii* DNA, a single tube nested PCR was performed. The amplification reactions were

performed with the external primers TgNN1 (3'-5'-CCTTTGAATCCCAAGCAAACATGAG) and TgNN2 (3'-5'-GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA) and internal primers TgNP1 (5'-GTGATAGTATCGAAAGGTAT-3') and TgNP2 (ACTCTCTCTCAAATGTTCCCT 5'-3'), amplifying the ITS1 region (Hurtado et al., 2001). The positive control of the reaction was a suspension of RH strain tachyzoites (10^4 tachyzoites / mL) and ultrapure water was used as the negative control. The amplified products of 227 base pairs (bp) corresponding to *T. gondii* DNA were detected by agarose gel electrophoresis at 1.5% stained with BlueGreen (LGC®), visualized by ultraviolet light and photo documented.

2.3. Multilocus PCR-RFLP and phylogenetic analysis

Genotyping was performed by PCR-RFLP using 11 molecular markers (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 and Apico) as described by Su et al. (2010). The DNA target was first amplified by multiplex PCR using external primers for all markers, followed by nested PCR for the individual markers. Subsequently, the nested PCR products were digested with restriction enzymes at the specific temperature and time conditions for each marker. All products were separated by electrophoresis on 3% agarose gel containing Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) and visualized using the Safe Imager™ (Invitrogen®, USA). The results were identified, compared, and classified according to the genotypes present in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). For phylogenetic analysis, the bands patterns of the electrophoresis (genotypic data of restriction polymorphism) obtained by enzymes cuts in PCR-RFLP were transformed into binary data and tabulated. The SplitsTree program was used for phylogenetic reconstruction between the genotype obtained in the present study and previous isolates obtained in Brazil and worldwide.

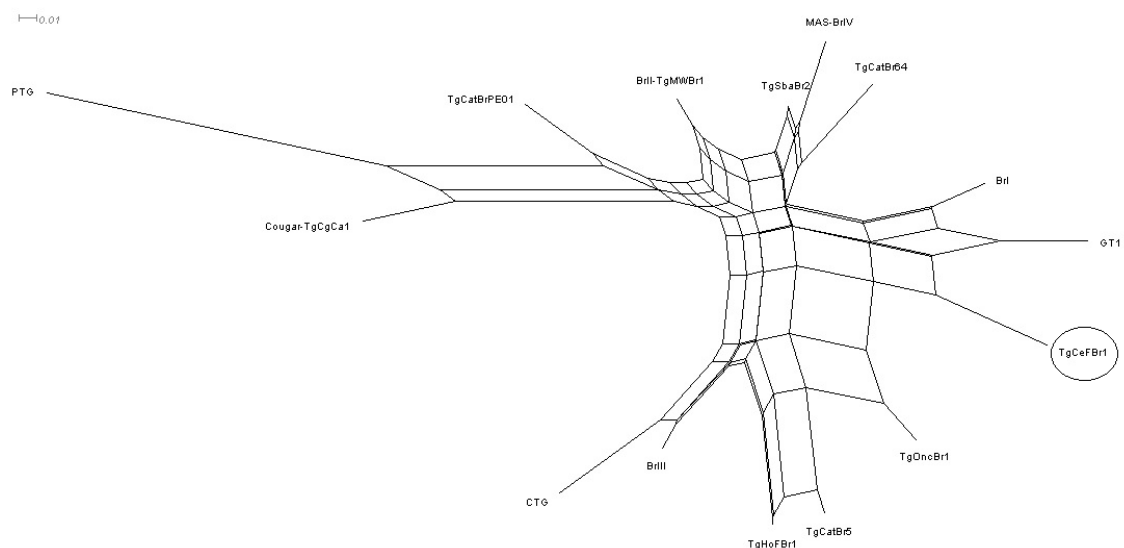
2.4. Animal ethics

All experiments performed on mice were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Animal Use Ethics Committee from the Federal Rural University of Pernambuco (protocol no. 27/2015).

3. Results

The crab-eating fox and the three mice from the bioassay were positive for antibodies anti-*T. gondii* by MAT with titer of 1:50 and IFAT with 1:128, respectively. The mice from the bioassay showed no clinical signs and survived for six weeks post-inoculation (p.i), when they were euthanized. *Toxoplasma gondii* tissue cysts were observed in the brains of two inoculated mice. This isolate was designated as TgCeFBr1. Considering that no infected mice died of toxoplasmosis, the isolate obtained was considered of low pathogenicity. By PCR, this isolate exhibited a band compatible (227 bp) with the positive control of the reaction (RH strain). According to PCR-RFLP, genotype #13 was identified, with the following alleles: SAG1 = I, SAG2 = I, alt.SAG2 = I, SAG3 = I, BTUB = I, GRA6 = III, c22-8 = II, c29-2 = III, L358 = III, PK1 = I, and Apico = III. This genotype is considered an atypical strain (Figure 1).

Fig. 1. Phylogenetic analysis of the *Toxoplasma gondii* isolate obtained in the present study (circle), with the following strains used as references: *MAS*, *GT1*, *TgRsCr*, *TgCgCa1*, *TgCatBr64*, *TgCatBr5*, *TgHoFBr1*, *TgOncBr1*, *TbSbaBr2*, *PTG*, *BrI*, *BrII*, *TgMWBr1*, *BrIII*, *BrIV* and *CTG*.



No mice from the virulence assay showed clinical signs and all three survived for four weeks p.i. Both *T. gondii* cysts in brain and *T. gondii* antibodies in serum (titer 1:64) were

observed in all inoculated mice, confirming infection by *T. gondii*. Thus, the isolate was classified as avirulent in the murine model.

4. Discussion

There is a lack of data concerning the isolation of *T. gondii* from wild animals, particularly in South America. *Toxoplasma gondii* isolates from free-living wild animals provide valuable information on its population structure in wildlife (Vitaliano et al., 2014). To the best of the author's knowledge, this is the first report of isolation of *T. gondii* in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) worldwide.

Several studies have identified *T. gondii* antibodies in wild canids by means of different serological techniques (Andre et al., 2010; Catenacci et al., 2010). The modified agglutination test was developed for screening *T. gondii* infection using serum and blood samples from all species, including humans. It is an easy to perform technique that does not require special equipment or species-specific reagents (Dubey, 2010; Al-Adhami et al., 2016). DNA from *T. gondii* has been reported in brain tissues of wild canids (Suteu et al., 2014; Nascimento et al., 2015), suggesting that these species are important intermediate hosts that contribute to the maintenance of the *T. gondii* life cycle in wildlife. Vitaliano et al. (2014) obtained *T. gondii* isolates from the hoary-fox (genotype # 237; TgHoFBr1) and the maned-wolf (genotype #11, BrII; TgMWBr1) in São Paulo State, Brazil. In Central and South America the genotype #13 is considered one of the 10 most frequently described genotypes, accounting for 2.5% of the isolates and the most prevalent genotype in Northeastern Brazil (Shwab et al., 2014). The genotype #13 obtained from the free-range crab-eating fox has been previously described in the red-handed howler monkey (Pena et al., 2011) from Northeastern Brazil.

Other *Toxoplasma gondii* isolates obtained from Brazilian wild canids have shown high virulence in mice model (Vitaliano et al., 2014), which differs from the low virulence of the genotype obtained in this study. The phylogenetic networks displayed in Figure 1 show that the genotype isolated in this study is close to genotypes GT1 and TgOncBr1 (isolated from an oncilla; *Leopardus tigrinus*). The pathogenicity of some infectious diseases may threaten wildlife, which is of particular importance regarding wildlife species at risk of extinction. Similar to our findings regarding this *T. gondii* strain isolated from a crab-eating fox, other *T. gondii* strains isolated from other wildlife species have been avirulent in murine models

(Aubert et al., 2010). In this study, the number of subjects undergoing the virulence assay was low considering the complete absence of clinical signs in the three mice used for isolation. Infection of wild animals not only facilitates the spread of *T. gondii* genotypes but also acts as a driving force for the genetic diversity of the parasite (Dubey et al., 2006; Grigg and Sundar, 2009). Our study was the first to demonstrate *Toxoplasma gondii* in the crab-eating fox

References

- André, M.R., Adania, C.H., Teixeira, R.H., Silva, K.F., Jusi, M.M., Machado, S.T., de Bortolli, C.P., Falcade, M., Sousa, L., Alegretti, S.M., Felipe, P.A., Machado, R.Z., 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *J. Parasitol.* 96, 1007-1009. doi: 10.1645/GE-2502.1.
- 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., 2010. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet. Parasitol.* 171, 346-349. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.03.033.
- Al-Adhami, B.H., Simard, M., Hernández-Ortiz, A., Boireau, C., Gajadhar, A.A., 2016. Development and evaluation of a modified agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection using tachyzoites cultivated in cell culture. *Food and Waterborne Parasitol.* 2, 15–21. doi: 10.1016/j.fawpar.2015.12.001.
- Camargo, M.E., 1964 Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6, 117-118. PMID: 14177810.
- Cañón-Franco, W.A., Araújo, F.A., López-Orozco, N., Jardim, M.M., Keid, L.B., Dalla-Rosa, C., Cabral, A.D., Pena, H.F., Gennari, S.M., 2013. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: molecular detection and genotypic characterization. *Vet. Parasitol.* 197, 462-469. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.019.

Catenacci, L.S., Griese, J., da Silva, R.C., Langoni, H., 2010. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. *Vet. Parasitol.* 16, 190-192. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.019.

Desmonts, G., Remington, J., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11, 562-568. PMID: 7000807.

Dubey, J.P., Patitucci, A.N., Su, C., Sundar, N., Kwok, O.C.H., Shen, S.K., 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Vet. Parasitol.* 140, 76-82. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.023.

Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, CRC Press, Florida.

Gennari, S.M., Canón-Franco, W.A., Yai, L.E., de Souza, S.L., Santos, L.C., Farias, N.A., Ruas, J., Rossi, F.W., Gomes, A.A., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. *Vet. Parasitol.* 121, 337-340. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.02.023.

Grigg, M.E., Sundar, N., 2009. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int. J. Parasitol.* 39, 925-933. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.005.

Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A.L., 2001. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.* 102, 17-27. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00526-X.

Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Butler, J.M., Blagburn, B.L., 1997. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.* 73, 27-33. PMID: 9477489.

Nascimento, C.O., Silva, M.L., Kim, P.C., Gomes, A.A., Gomes, A.L., Maia, R.C., Almeida, J.C., Mota, R.A., 2015. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in Brazil. *Acta Trop.* 146, 60-65. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.02.016.

Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561-569. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.09.004.

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., 2011. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Vet. Parasitol.* 175, 377-381. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.015.

Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Pereira-Bueno, J., Aduriz, G., Navarro-Lozano, V., Risco-Castillo, V., Fernández-García, A., Pedraza-Díaz, S., Ortega-Mora, L.M., 2008. Isolation and genetic characterization of *Neospora caninum* from asymptomatic calves in Spain. *Parasitology* 135, 1651-1659. doi: 10.1017/S003118200800509X.

Shwab, E.K., Zhu, X.Q., Majumdar, D., Pena, H.F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453-461. doi: 10.1017/S0031182013001844.

Su, C., Schwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 137, 1-11. doi: 10.1017/S0031182009991065.

Suteu, O., Mihalca, A.D., Paștiu, A.I., Györke, A., Matei, I.A., Ionică, A., Balea, A., Oltean, M., D'Amico, G., Sikó, S.B., Ionescu, D., Gherman, C.M., Cozma, V., 2014. Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Romania are Carriers of *Toxoplasma gondii* but not *Neospora caninum*. J. Wildl. Dis. 50, 713-716. doi: 10.7589/2013-07-167.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30, 1217-1258. PMID: 11113252

Vitaliano, S.N., Soares, H.S., Minervino, A.H., Santos, A.L., Werther, K., Marvulo, M.F., Siqueira, D.B., Pena, H.F., Soares, R.M., Su, C., Gennari, S.M., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 3, 276-283. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.09.003

Wendte, J.M., Gibson, A.K., Grigg, M.E., 2011. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: new perspectives from parasite genotypes in wildlife. Vet. Parasitol. 182, 96-111. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.018.

Wolfe, A., Hogan, S., Maguire, D., Fitzpatrick, C., Vaughan, L., Wall, D., Hayden, T.J., Mulcahy, G., 2001. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. Vet. Rec. 149, 759-763. PMID: 11808662.

CAPÍTULO 2

Co-Infection by *Sarcoptes scabiei* and *Microsporium gypseum* in Free-Ranging Crab-Eating Fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766).

(artigo aceito no periódico Brazilian Archives of Biology and Technology – Qualis B2)

Co-Infection by *Sarcoptes scabiei* and *Microsporium gypseum* in Free-Ranging Crab-Eating Fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766).

Jonatas Campos de Almeida¹, Carlos Adriano de Santana Leal¹, Renata Pimentel Bandeira de Melo¹, Pedro Paulo de Feitosa Albuquerque¹, Camila de Moraes Pedrosa¹, Fabiana Correa Zermiani², Roberto Citelli de Farias², Rinaldo Aparecido Mota¹.

1 Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Infectious-Contagious Diseases of Domestic Animals, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco state, Brasil

2 Zoo Botanical Park Arruda Câmara, CEP 58020-325, João Pessoa, Paraíba state, Brazil.

Correspondence: Rinaldo Aparecido Mota. Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife/PE, Brasil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

ABSTRACT

*The aim of the present study was to describe the clinical manifestation, treatment and outcome of a case of co-infection by *Sarcoptes scabiei* and *Microsporum gypseum* in *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) from Northeastern Brazil.*

Key words: dermatophytes, public health, sarcoptic mange, wild canid, zoonose

INTRODUCTION

There are several diseases that may be transmitted from not only domestic but also from wild animals, thus wildlife is an important component in the transmission chain of zoonosis¹. Nowadays, zoonoses with a wildlife reservoir constitute a public health issue worldwide and its importance has been recognized, demanding attention from scientific community². Foxes are known to carry many species of ectoparasites, the majority of which are potentially transmissible to humans, pets and livestock³.

Despite the public health issue, there are few data about the real impact of skin diseases on wild carnivores. Coyote populations (*Canis latrans*) from Texas were monitored from 1974 to 1991, and sarcoptic mange was identified affecting 69% of animals, resulting in reproductive disorders such as the pregnancy rate reduced and ovulation problems⁴. Concerning to the occurrence of dermatophytes in wild canids, further studies are necessary in order to provide

new insights and advances related to the diagnosis, treatment and control of this mycotic infection.

The activities of wildlife veterinarians in zoo management are inestimable since they apply their knowledge and skills for the improvement of habitat conditions, nutrition, health and breeding of captive wild animals⁵. Thus, the exposure to zoonotic diseases is one of the most important health risks for wildlife veterinarians due a close association with wild animals.

Accordingly, the present case report describes the clinical manifestation, treatment and outcome of a case of zoonotic dermatoses caused by *Sarcoptes scabiei* and *Microsporium gypseum* in *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) from Brazil.

MATERIAL AND METHODS

During the autumn, five free-range *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) were caught by veterinarians of a Zoo from Paraíba state, Northeastern Brazil. The animals were caught due their health condition and after a first clinical examination were referred to the quarantine room. These animals were estimated 4-month-old (young animals), being four females and one male, and their mother probably was killed in a traffic accident. The five animals were alert and responsive, and except for the skin lesions, were otherwise healthy. Chemical restraint (1% xylazine hydrochloride and 10% cetamine hydrochloride) was required to examine the crab-eating foxes.

The body surface of each crab-eating fox was examined carefully for the presence of ectoparasites such as ticks, fleas and lice. They were collected in microtubes containing 70% ethanol and fleas were washed and stored in 10% KOH solution for 24 hours before identification. An identification key was used for species identification⁶.

Two skin scrapings from affected body parts of the crab-eating foxes were collected for mite isolation. Each skin scrapings were digested in 10% KOH and were meticulously examined for the presence and identification of mites. Detected mites were identified properly⁷.

In order to carry out the mycological diagnosis hair and scabs were collected by coat brushing and multiple skin scrapings using sterile scalpel blade. Each sample was clarified with a 30% KOH on a glass slide for 30 minutes, followed by identification of fungal structures as hyphae and arthroconidia (arthrospores) according to previous study⁸. Hair and

scabs samples were cultured in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar with yeast extract, chloramphenicol and cycloheximide. Petri dishes were incubated aerobically at 25°C and examined daily for five weeks⁹. Yeasts were evaluated macroscopically and their microscopic characteristics were observed by smear stained by Gram method. Filamentous fungi were identified by observation of texture, topography and color of the obverse and reverse of the colonies, and microscopic characteristics such as type of conidia and hyphae. Microscopic analysis was performed properly¹⁰.

The crab-eating foxes were treated with ivermectin (Ivomec®, Merial, São Paulo, Brazil) 200ug/kg orally, once per week, during six weeks.

RESULTS AND DISCUSSION

Dermatological investigation revealed moderate alopecia patches (hair loss) distributed in head, ears, trunk, extremities and tail (Fig. 1). Foul odor, mild to moderate scratch, small swellings and moderate incrustations also reported. The skin was wrinkled and crusty with a flaky appearance.



Figure 1 Alopecia and moderate incrustations in the ear of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766).

The fleas *Ctenocephalides felis* and *C. canis* were found in all five animals. A total of 20 fleas (thirteen *C. felis* and seven *C. canis*) were collected with a mean of four fleas per animal. Neither ticks nor lice were reported. *Sarcoptes scabiei* were identified in all five crab-eating fox (Fig. 2).

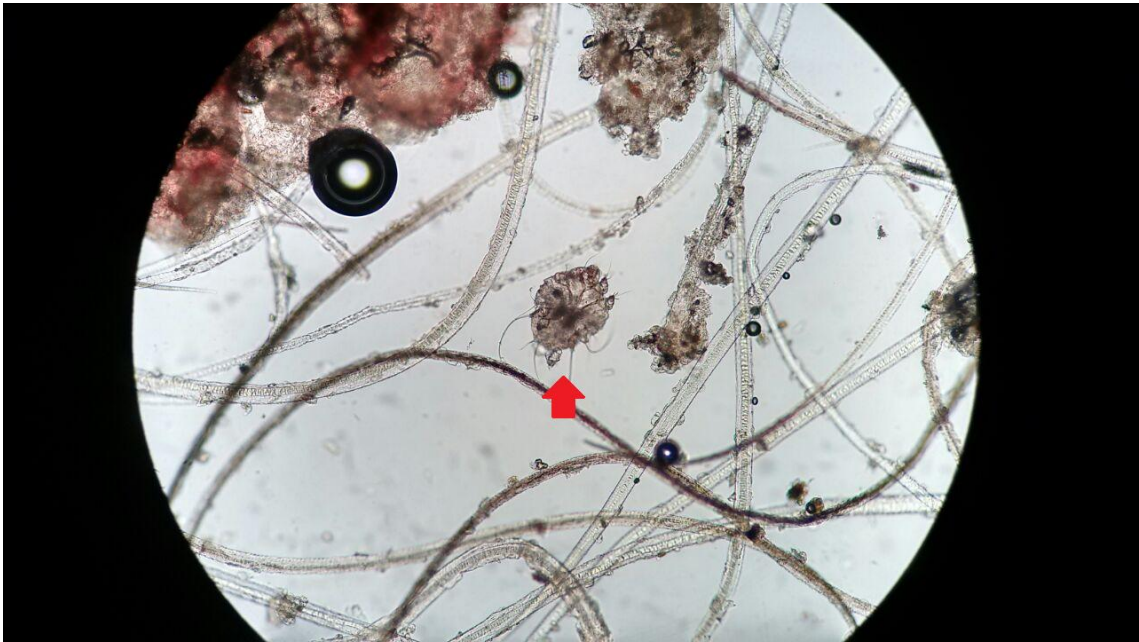


Figure 2 Skin scraping containing *Sarcoptes scabiei* mite (red arrow) (objective: 10x).

Hair follicles parasitized by arthroconidia were observed by direct examination in 1/5 of the samples analyzed. However this findings clearly suggests a fungal infection by dermatophytes, all samples were submitted for fungal culture to confirm the result obtained by the direct examination, once this technique is considered the gold standard". After three days of incubation, in all five samples were observed colonies with the following characteristics: the colony surface was matte, yellowish, convex, and wrinkled, and the undersurface was flat. These characteristics were compatible with those of *Malassezia pachydermatis*. With approximately seven days of culture, a flat colony, cream color at the surface and a yellow-brown reverse pigment was observed in one sample. Microscopically numerous symmetrical macroconidia, thick-walled, asperulate spindle-shaped with 3-5 septa were visualized. These characteristics were compatible with those of *Microsporum gypseum*.

After two weeks of treatment a significant improvement in the skin condition was observed with approximately 50% size reduction of the lesions. Four weeks post initial treatment

almost all lesions had resolved and, for this reason, the treatment was maintained for two additional weeks, during which all lesions had resolved completely. There is a limited data about the occurrence and treatment of zoonotic dermatoses in wild canids, especially in crab-eating fox. To the best of the author's knowledge, this is the first case report of co-infection by *Sarcoptes scabiei* and *Microsporum gypseum* in free-ranging crab-eating fox. The association between *M. pachydermatis* and *S. scabiei* was also observed previously¹¹.

In Europe, sarcoptic mange infections are endemic and has been described a high prevalence in red foxes (*Vulpes vulpes*), leading to substantial mortality and reducing the population of red foxes over 70%^{12,13,14}. Dangerous sarcoptic mange outbreaks have been described in some species worldwide, with mortality rates of up to 90%^{15,16,17,18}. This wild canid may visit human settlements attracted by accessible food sources¹⁹, increasing incidence of accidental pseudo scabies infestation of man, pets and domestic animals³. Have been reported the possibility of adaptation between *S. scabiei* and red fox populations²⁰ with description of non-fatal, restricted, subclinical cases in red foxes²¹. Little is known about *S. scabiei* infection in crab-eating foxes, but it is believed they may play a role in sarcoptic mange infection similar those by red foxes.

Dermatophytosis is an infection of the skin and its appendages caused by a group of closely related species of fungi of the genera *Microsporum*, *Trichophyton* and *Epidermophyton*²². There are few studies about fungal diseases in wild animals. Nonetheless, it is important to remember that many ringworm infections may be transmitted from animals to humans, being considered a public health problem^{10,23}. *Microsporum canis* was first reported in silver-grey foxes²⁴ and in red fox in a close contact with an asymptomatic Persian cat²⁵. The relationship between the presence of dermatophytes on the hair coats of dogs and cats without skin lesions in their respective owners and other pets have been investigated²⁶. In the present study, the crab-eating foxes affected were young (approximately 4-months-old), in accordance with a previous study that observed a higher incidence of dermatophytosis in animals less than one-year-old²².

Pathogens have been found associated with *Ctenocephalides* as biological vectors or intermediate hosts, such as bacteria, helminths and protozoa, representing a potential health risk for humans²⁷. Thus, it is important to choose the adequate approach to prevent vector-borne outbreak diseases into Zoos or Center of Triage of Wild Animals, threatening other carnivore species.

The literature no provides well established protocols to treat sarcoptic mange infection and dermatophytosis in wild canids. In the most of cases, the treatment of these skin infections in dogs is adopted as model to treat wild canids achieving good results²⁵. The present case report also reports the treatment of sarcoptic mange infection in wild canid with success. In this case no antifungal treatment was performed. The complete resolution of the skin lesions may be explained by the fact that the animal is considered as carrier agent of *M. gypseum*, a common situation noticed in cats. The same condition should not be ruled out in case of dermatophytosis in wild animals^{28,29}.

Based on the above, information about zoonotic dermatoses in wild canids is scarce, complicating diagnosis and correct approaching of these diseases. Thus, researches are required in this field to better understand the epidemiology, pathogenesis and treatment of zoonotic dermatoses and even to develop control measures.

REFERENCES

- 1 Letková V, Lazar P, Čurlík J, Goldová M, Kočišová A, Košuthová L, et al. The red fox (*Vulpes vulpes* L.) as a source of zoonoses. *Veterinarski Arhiv*. 2006; 76: 73-81.
- 2 Jorge RSP, Rocha FL, Júnior JAM, Morato RG. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecol Austral*. 2010, 14: 686-710.
- 3 Kočišová A, Lazar P, Letková V, Čurlík J, Goldová M. Ectoparasitic species from red foxes (*Vulpes vulpes*) in East Slovakia. *Veterinarski Arhiv*. 2006; 76: 59-63.
- 4 Pence DB, Windberg LA. Impact of a Sarcoptic Mange Epizootic on a Coyote Population. *J Wildlife Manage*. 1994; 58: 624-633.
- 5 Kumar HR, Srivatsav UC. The zoo veterinary profession: challenging, interesting, vibrant and fulfilling. *Zoo's Print*. 2010; 25: 15-16.

- 6 Furman C, Catts DM. Manual of Medical Entomology. 4th edition. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
- 7 Wall R, Shearer D. Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control. 2nd edition. Ames: Wiley-Blackwell, 1997.
- 8 Muller CEV, Kirk GHV. Doenças parasitárias da pele. In: Scott DW, editor. Dermatologia de Pequenos Animais. 5th edition. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p. 385-388, 390-392, 394-397, 399.
- 9 Cruz LCH. Micologia Veterinária. 2nd edition. Rio de Janeiro: Revinter, 2010.
10. Albano APN, Mendes JF, Felício AP, Coimbra MAA, Leite ATM, Minello LF, et al. Microbiota fúngica de felídeos silvestres hígidos encaminhados a centros de triagem no Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. *Rev Cient Med Vet.* 2011; 9: 654-658.
- 11 Salkin IF, Stone WB, Gordon MA. Association of *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis* with sarcoptic mange in New York State. *J Wildl Dis.* 1980; 16: 509-514.
- 12 Forchhammer MC, Asferg T. Invading parasites cause a structural shift in red fox dynamics. *Proc Biol Sci.* 2000; 267: 779-786.
- 13 Goldová M, Lazar P, Letková V, Kočišová A, Čurlík J, Soroka J. Occurrence of *Sarcoptes scabiei* in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) in East Slovakia. Proceedings of the 3rd International Symposium on Wild Fauna, 24-28 may, Italy, 2003, 313-317.

- 14 Soulsbury CD, Iossa G, Baker PJ, Harris S. Environmental variation at the onset of independent foraging effects full-grown body mass in the red fox. *Proc Biol Sci.* 2008; 22: 2411-2418.
- 15 Mörner T. Sarcoptic mange in Swedish wildlife. *Rev Sci Tech.* 1992; 11: 1115-1121.
- 16 Lindström ER, Andrén H, Angelstam P, Cederlund G, Hörnfeldt B, Jäderberg L, Lemnell P-A, et al. Disease reveals the predator: sarcoptic mange, red fox predation, and prey populations. *Ecology.* 1994; 75: 1042-1049.
- 17 Martin RW, Handasyde KA, Skerratt LF. Current distribution of sarcoptic mange in wombats. *Aust Vet J.* 1998; 76: 411-414.
- 18 Kalema-Zikusoka G, Koch RA, Macfie EJ. Scabies in freeranging mountain gorillas (*Gorilla berengei berengei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Vet Rec.* 2002; 150: 12-15.
- 19 Balestrieri A, Remonti L, Ferrari N, Ferrari A, Lo Valvo T, Robetto S, et al. Sarcoptic mange in wild carnivores and its co-occurrence with parasitic helminthes in the Western Italian Alps. *Eur J Wildl Res.* 2006; 52: 196-201.
- 20 Davidson RK, Bornstein S, Handeland K. Long-term study of *S. scabiei* infection in Norwegian red fox (*Vulpes vulpes*) indicating host/parasite adaptation. *Vet Parasitol.* 2008; 156: 277-283.
- 21 Mörner T, Christensson D. Experimental infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) with *S. scabiei* var. *vulpes*. *Vet Parasitol.* 1984; 15: 159-164.

- 22 Carlotti DN, Bensignor E. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypseum* (20 cases) in dogs. *Vet Dermatol.* 1999; 10: 17-27.
- 23 Lima B, López S, Luna L, Agüero MB, Aragón L, Tapia A, et al. Essential oils of medicinal plants from the Central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. *Chem Biodivers.* 2011; 8: 924-936.
- 24 Levenberg IG. *Microsporum* infection in silver-gray foxes. *Trudy Vesoyies Inst Vet Sanit.* 1960; 16: 379-382.
- 25 Malmasi A, Khosravi AR, Selk-Ghaffari M, Shojaee-Tabrizi A. Scientific Report *Microsporum canis* infection in a red fox (*Vulpes vulpes*). *Iran J Vet Res.* 2009; 10: 189-191.
- 26 Cafarchia C, Romito D, Capelli G, Guillot J, Otranto D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. *Vet Dermatol.* 2006; 17: 327-331.
- 27 Linardi PM. Pulgas. In: Marcondes CB, editor. Entomologia médica e veterinária. 2nd edition. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 157-179
- 28 Farias MR, Condas LAC, Ramalho F, Bier D, Muro MD, Pimpão CT. Avaliação do estado de carreador assintomático de fungos dermatofíticos em felinos (*Felis catus* – Linnaeus, 1793) destinados à doação em centros de controle de zoonoses e sociedades protetoras de animais. *Vet Zoot.* 2011; 18: 306-312.
- 29 Ferreira L, Sanches EMC, Spanemberg A, Ferreira RR, Machado MLS, Roehe C, et al. Zoonoses micóticas em cães e gatos. *Acta Sci Vet.* 2007; 35: 296-299.

CAPÍTULO 3

**Isolation of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in crab-eating fox
(*Cerdocyon thous* – Linnaeus 1776) from Northeastern Brazil**

**(artigo encaminhado para o periódico Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia – Qualis A2)**

**Isolation of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in crab-eating fox
(*Cerdocyon thous* – Linnaeus 1776) from Northeastern Brazil**

[Isolamento de *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* em cachorro-do-mato
(*Cerdocyon thous* – Linnaeus 1776) da região nordeste do Brasil]

J.C. Almeida¹, R.O.S. Silva², F.C.F. Lobato², R.A. Mota^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife, PE

² Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, MG

*** Corresponding author (autor para correspondência):**

E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of the present study was to isolate *C. perfringens* and *C. difficile* in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Northeastern Brazil. Stool samples of 18 captive crab-eating foxes from four states of Northeastern Brazil (Alagoas, Bahia, Paraíba e Pernambuco) were collected and subjected to *C. perfringens* and *C. difficile* isolation. Suggestive colonies of *C. perfringens* were then analyzed for genes encoding the major *C. perfringens* toxins (alpha, beta, epsilon and iota), beta-2 toxin (*cpb2*), enterotoxin (*cpe*), and NetB- (*netB*) and NetF- (*netF*) encoding genes. *C. difficile* strains were analyzed by multiplex-PCR for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*). Unthawed aliquots of stool samples positive for toxigenic *C. difficile* were subjected to a commercial ELISA to evaluate the presence of A/B toxins. *Clostridium perfringens* (type A) was isolated from five (27%) samples, and only one sample was positive for beta-2 encoding gene (*cpb2*). Two (11%) stool samples were positive for *C. difficile*, but negative for A/B toxins. These two wild canids were also positive for *C. perfringens* type A. This is the first report of *C. difficile* in crab-eating fox.

Keywords: *Clostridium*; public health; wild canids

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar *C. perfringens* e *C. difficile* em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) da região nordeste do Brasil. Amostras de fezes de 18 cachorros-do-mato mantidos em cativeiro e oriundos de quatro estados da região nordeste do Brasil (Alagoas,

Bahia, Paraíba e Pernambuco) foram coletadas e submetidas a isolamento de *C. perfringens* e *C. difficile*. As colônias sugestivas de *C. perfringens* foram analisadas para os genes que codificam as principais toxinas de *C. perfringens* (alfa, beta, epsilon e iota), toxina beta-2 (*cpb2*), enterotoxina (*cpe*) e NetB- (*netB*) e NetF- (*netF*). As cepas de *C. difficile* foram analisadas por PCR-multiplex para o gene *tpi*, toxinas A (*tcdA*) e B (*tcdB*) e um gene de toxina binária (*cdtB*). Alíquotas de amostras de fezes positivas para *C. difficile* toxigênico foram submetidas a um ELISA comercial para avaliar a presença de toxinas A/B. *Clostridium perfringens* (tipo A) foi isolado de cinco (27%) amostras, e apenas uma amostra foi positiva para o gene da toxina beta-2 (*cpb2*). Duas (11%) amostras de fezes foram positivas para *C. difficile*, mas negativas para toxinas A/B. Estes dois canídeos silvestres também foram positivos para *C. perfringens* tipo A. Este é o primeiro relato de *C. difficile* em cachorro-domato.

Palavras-chave: *Clostridium*, saúde pública, canídeos silvestres

INTRODUCTION

The crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) is a member of the Canidae family and is widely distributed in South America countries, including Colombia, Venezuela, Paraguay, Uruguay, Argentina and Brazil. Recent studies have suggested that *C. thous* could act as a reservoir of some pathogens, including some responsible for re-emerging diseases like visceral leishmaniasis, brucellosis, canine rangellosis and rabies (Carnieli Jr *et al.*, 2009, Oliveira-Filho *et al.*, 2012, Soares *et al.*, 2014, Tunon *et al.*, 2015). The concern about the transmission of diseases from this wild specie to humans and also to domestic animals is increasing in light of the expansion of urban areas at the expense of areas with native vegetation (Souza *et al.*, 2016).

Clostridium perfringens and *Clostridium difficile* are Gram-positive sporogenic anaerobic bacterium and are recognized as pathogens responsible for intestinal disease in human and animals (Silva and Lobato *et al.*, 2015, Rodriguez *et al.*, 2016). *C. perfringens* is commonly found in the enteric microbiota of healthy animals but also responsible for a several diseases in humans and animals. *C. perfringens* strains are divided into five types (from A to E) according to four major toxins (alpha, beta, epsilon and iota), while some additional toxins have been associated with intestinal infections (Uzal *et al.*, 2014). The screening for virulence

factors genes could contribute to the knowledge of *C. perfringens* epidemiology in wild animals but, despite few studies, the main genotypes and the most common additional virulence factors of *C. perfringens* strains isolated from Canidae are largely unknown (Silva *et al.*, 2016). *C. difficile* produces toxin A and toxin B, known as the main virulence factors of this microorganism. Some strains may also produce a binary toxin (CDT) associated with enhanced virulence (Schwan *et al.*, 2009). *C. difficile* infection (CDI) commonly occurs in elderly hospitalized patients submitted to antibiotic therapy, so CDI is recognized as a primarily nosocomial disease (Loo *et al.*, 2011). On the other hand, this concept is now being challenged due to cases of CDI reported in populations without any previous antibiotic therapy or hospitalization (Hensgens *et al.*, 2012). Some studies have also shown a genetic overlap from *C. difficile* strains from humans and animals, suggesting it might be a zoonotic pathogen (Knetsch *et al.*, 2014).

In light of this, the purpose of this study was to isolate *C. perfringens* and *C. difficile* in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Northeastern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Animal Use Ethics Committee from Universidade Federal Rural de Pernambuco (license number 27/2015) and by the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) under number 47677.

Captive crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) from different states of Northeastern Brazil were sampled by this study as follows: eight animals from Pernambuco (PE), three animals from Alagoas (AL), four from Bahia (BA) and ten from Paraíba (PB). Chemical restraint (1% xylazine hydrochloride and 10% cetamine hydrochloride) was required. In Paraíba state was not possible to collect fecal samples individually due to local management conditions; thereby the crab-eating foxes were grouped according to their relationship to each other, resulting in three pools of stool samples. In this specific case, fresh fecal samples were collected manually from the ground. Thus, eighteen fecal specimens (15 individually samples and three pools) were collected in sterile containers and were kept cool at -20°C until further processing. None

of the sampled animals had diarrhea or any other clinical signs previously or at the sampling moment.

To perform the isolation of *C. perfringens*, 0.08–0.12g of feces were serially diluted by factors of 10, ranging from 10^{-1} to 10^{-3} . Aliquots of 10 μ l of each dilution were plated on sulfite polymyxin sulfadiazine agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and were anaerobically incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, all sulfate-reducing colonies from each dilution were subjected to a previously described PCR protocol (Vieira *et al.*, 2008) for the detection of genes encoding the major *C. perfringens* toxins (alpha, beta, epsilon and iota), beta-2 toxin (*cpb2*) and enterotoxin (*cpe*). The PCR protocol described by Keyburn *et al.* (2008) and Gohari *et al.* (2015) was applied for the detection of the NetB- and NetF-encoding genes (*netB* and *netF*, respectively). The PCR product was subjected to electrophoresis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). The bands were visualized under ultraviolet light in a photodocumentation system.

The isolation of *C. difficile* spores was carried out as follows: equal volumes of fecal samples and 96% ethanol (v/v) were mixed. After incubation at room temperature for 30 minutes, 50 μ l aliquots were inoculated on plates contained with 7% horse blood and 0.1% sodium taurocholate (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). After anaerobic incubation at 37°C for at least 72 hours, all colonies with suggestive morphology were subjected to a multiplex-PCR for a housekeeping gene (*tpi*), toxins A (*tcdA*) and B (*tcdB*) and a binary toxin gene (*cdtB*). Unthawed aliquots of stool positive samples for *C. difficile* were subjected to a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit to evaluate the presence of A/B toxins (*C. difficile*Tox A/B II - Techlab Inc., Blacksburg, VA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

C. perfringens was isolated from 27% (5/18) samples, all genotyped as type A. Four positive samples were detected in animals from Pernambuco. The other positive sample was a pool of fecal sample of three adults crab-eating foxes from Paraíba. The isolation of *C. perfringens* type A and the absence of other genotypes corroborate previous studies with some Canidae species (Silva *et al.*, 2014a). It is also interesting to note that only one sample, obtained from Pernambuco state, was positive for beta-2 encoding gene (*cpb2*), while Silva

et al. (2014a) reported 34.6% rate in a study with several carnivore species including *C. thous*, *Puma concolor* (cougar), *Leopardus tigrinus* (oncilla), *Leopardus pardalis* (ocelot), *Chrysocyon brachyurus* (maned wolf) and others. Other additional toxin genes, including enterotoxin (*cpe*), NetB (*netb*) and the recently described NetF (*netF*) were not detected in the present study.

All positive crab-eating foxes were asymptomatic at the sampling moment and there were no previous episodes of diarrhea, so the isolated *C. perfringens* by the present study might be part of their microbiota. However severe clinical cases of *C. perfringens* infection in wild carnivores have been described, such as the death of a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) and a lion (*Panthera leo*) by hemorrhagic enterocolitis caused by *C. perfringens* type A (Zhang *et al.*, 2012) and a suspected case of neurotoxicity in a tiger (*P. tigris*) due to *C. perfringens* type B (Zeira *et al.*, 2012). Despite the known potential of *C. perfringens* as an enteropathogen for wild Canidae and Felidae, virulence factors involved in enteric disease are still clouded. Recent studies described two novel pore-forming toxins (NetB and NetF) that are clearly associated with necrotic enteritis and hemorrhagic diarrhea in dogs and broiler chicken, respectively (Keyburn *et al.*, 2008, Gohari *et al.*, 2015). Further studies, including diarrheic animals, are essential to clarify if any of the described toxin genes could be used as a virulence marker for *C. perfringens* isolated from wild carnivore species.

Two (11%) stool samples were positive for *C. difficile*, but negative for A/B toxins by ELISA. These strains, one toxigenic (A+B+CDT-) and one non-toxigenic (A-B-CDT-), were isolated from animals from Pernambuco and Alagoas state, respectively. These two wild canids were also positive for *C. perfringens* type A. Both animals were apparently healthy during the sampling, but one of them was under antibiotic therapy due a surgery to repair a fractured pelvis. To the best of the author's knowledge, this is the first report of *C. difficile* in crab-eating fox. A low rate of fecal shedding of *C. difficile* has been described in several wild species, including synanthropic and wild rodents, zebra, procynoids and some wild carnivores (Himsworth *et al.*, 2013, Silva *et al.*, 2013, Álvarez-Pérez *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2014a,b). Similar to the present study, Silva *et al.* (2014a) described the isolation of *C. difficile* from an apparently healthy maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and from a diarrheic ocelot (*Leopardus pardalis*), both under antibiotic therapy at the time of collection. The influence of antibiotic administration on the incidence of CDI is well-known in humans and also in some domestic animals (Rodriguez *et al.*, 2016). *C. difficile* infection (CDI) has been detected also in other non-carnivore species, including elephants, harbor seals (Bojensen *et al.*, 2006,

Anderson *et al.*, 2015). Anyway, both *C. difficile* positive animals in the present study were apparently healthy and, even in the crab-eating foxes positive for a toxigenic strain, an unthawed stool sample were negative for A/B toxins, thus both cases should be interpreted as fecal shedding and not to CDI.

CONCLUSION

This study suggests that crab-eating foxes not only could carry *C. difficile*, but also could shed these bacteria in their feces. It is important to emphasize that this is the first report of *C. difficile* in crab-eating fox. Concerning to the detection of *C. perfringens*, the microorganism may be considered part of the normal intestinal microbiota of these wild carnivores. Additional studies are needed to clarify the role of *C. perfringens* and its virulence factors in wild carnivore species.

REFERENCES

ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; BLANCO, J.L.; MARTÍNEZ-NEVADO, E. *et al.* Shedding of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 by zoo animals, and report of an unstable metronidazole-resistant isolate from a zebra foal (*Equus quagga burchellii*). *Vet. Microbiol.*, v.169, p.218-222, 2014.

ANDERSON, C.E.; HAULENA, M., ZABEK, E. *et al.* Clinical and epidemiologic considerations of *Clostridium difficile* in harbor seals (*Phoca vitulina*) at a marine mammal rehabilitation center. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.46, p.191-197, 2015.

BOJESEN, A.M.; OLSEN, K.E.; BERTELSEN, M.F. Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*. *Vet. Microbiol.*, v.116, p.329-335, 2006.

CARNIELI JR., P.; CASTILHO, J.; FAHL, W.O. *et al.* Molecular characterization of rabies virus isolates from dogs and crab-eating foxes in Northeastern Brazil. *Virus Res.*, v.141, p.81-89, 2009.

GOHARI, I.M.; PARREIRA, V.R.; NOWELL, V.J. *et al.* A Novel Pore-Forming Toxin in Type A *Clostridium perfringens* Is Associated with Both Fatal Canine Hemorrhagic Gastroenteritis and Fatal Foal Necrotizing Enterocolitis. *PLoS One*, 10:e0122684, 2015.

HENSGENS, M.P.; KEESSEN, E.C.; SQUIRE, M.M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin. Microbiol. Infect.*, v.18, p.635-645, 2012.

HIMSWORTH, C.G.; PATRICK, D.M.; MAK, S. *et al.* Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, v.80, p.1299-1305, 2014.

KEYBURN, A.L.; BOYCE, J.D.; VAZ, P. *et al.* NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.*, 4:e26, 2008.

KNETSCH, C.W.; CONNOR, T.R.; MUTREJA, A. *et al.* Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Euro Surveill.*, v.19, p.20954, 2014.

LOO, V.G.; BOURGAULT, A.M.; POIRIER, L. *et al.* Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N. Engl. J. Med.*, v.365, p.1693-1703, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, E.F.; PINHEIRO, J.W.; SOUZA, M.M. *et al.* Serologic survey of brucellosis in captive neotropical wild carnivores in northeast Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.43, p.384-387, 2012.

RODRIGUEZ, C.; VAN BROECK, J.; TAMINIAU, B. *et al.* *Clostridium difficile* infection: Early history, diagnosis and molecular strain typing methods. *Microb. Pathog.*, v.97, p.59-78, 2016.

SCHWAN, C.; STECHER, B.; TZIVELEKIDIS, T. *et al.* *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.*, 5:e1000626, 2009.

SILVA, R.O.; D'ELIA, M.L.; MAGALHÃES-SOARES, D.F. *et al.* *Clostridium difficile*-associated diarrhea in an ocelot (*Leopardus pardalis*). *Anaerobe.*, v.20, p.82-84, 2013.

SILVA, R.O.; D'ELIA, M.L.; TOSTES-TEIXEIRA, E.P. *et al.* *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe.*, v.28, p.207-211, 2014a.

SILVA, R.O.; RIBEIRO-ALMEIDA, L.; OLIVEIRA-JUNIOR, C.A. *et al.* Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe.*, v.30, p.99-101, 2014b.

SILVA, R.O.; LOBATO, F.C. *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe.*, v.33, p.14-17, 2015.

SILVA, R.O.; ALMEIDA, L.R.; OLIVEIRA-JUNIOR, C.A. *et al.* Isolation and genotyping of *Clostridium perfringens* from free-living South American coati (*Nasua nasua*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v.47, p.333-336, 2016.

SOARES, J.F.; DALL'AGNOL, B.; COSTA, F.B. et al. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.28, p.156-163, 2014.

SOUZA, D.N.; CARNIELI JR, P.; MACEDO, C.I. et al. Phylogenetic analysis of rabies virus isolated from canids in North and Northeast Brazil. *Arch. Virol.*, v.162, p.71-77, 2016.

TUNON, G.I.; MOURA, T.R.; JESUS, A.R. et al. In vitro infection by *Leishmania infantum* in the peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages from crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). *Vet. Parasitol.*, v.15, p.417-21, 2015.

UZAL, F.A.; FREEDMAN, J.C.; SHRESTHA, A. et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.*, v.9, p.361–377, 2014.

VIEIRA, A.A.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M. et al. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from diarrheic piglets. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, p.513-516, 2008.

ZEIRA, O.; BRIOLA, C.; KONAR, M. et al. Suspected neurotoxicity due to *Clostridium perfringens* type B in a tiger (*Panthera tigris*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v.43, p.666–669, 2012.

ZHANG, Y.; HOU, Z.; MA, J. Hemorrhagic enterocolitis and death in two felines (*Panthera tigris altaica* and *Panthera leo*) associated with *Clostridium perfringens* type A. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.43, p.394-396, 2012.

CAPÍTULO 4

Molecular and serological investigation of infectious diseases in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil

(artigo encaminhado para o periódico Acta Parasitologica – Qualis B1)

Molecular and serological investigation of infectious diseases in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus, 1776) from northeastern Brazil

Jonatas C. Almeida¹, Renata P.B. Melo¹, Pomy C.P. Kim¹, Neurisvan R. Guerra², Leucio C. Alves², Diego F. Costa³, Clebert José Alves³, Wagner J.N. Porto⁴, Rinaldo A. Mota¹.

¹ Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Infectious-Contagious Diseases of Domestic Animals, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

² Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Parasitology and Epidemiology, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

³ Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, S/N, 58700-970, Patos, PB, Brazil.

⁴ Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Universidade Federal de Alagoas, Fazenda São Luís, 57000-000, Viçosa, AL, Brazil

Abstract

The aim of this study was to detect DNA and anti-*Leishmania* spp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from northeastern Brazil. Twenty-five crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from different states of northeastern Brazil were sampled by this study. Blood samples were collected by cephalic or jugular vein punctures. The sera obtained were submitted to

PCR and serological analysis as follows: MAT for *T. gondii*, NAT for *N. caninum*, ELISA for *L. chagasi* and MAT for *Leptospira* spp. The frequency of anti-*T. gondii* antibodies was 50% and 29.41% for free-range and captive wild canids, respectively. The frequency of anti-*N. caninum* antibodies observed by this study was 62.50% and 23.52% for free-range and captive wild canids, respectively. The frequency of anti-*L. chagasi* antibodies was 4.0% for captive wild canids. Co-infections cases were identified as follows: one captive wild canid seropositive for *T. gondii* and *L. chagasi* and two free-range animals seropositive for *T. gondii* and *N. caninum*. There were no positive serum samples for *Leptospira*. All PCR assays performed were negative for the pathogens analyzed. This study describes the presence of *T. gondii*, *N. caninum* e *L. chagasi* in wild canids from northeastern Brazil and highlights the necessity of further studies on infectious diseases in free-range and captive wild canids.

Keywords: *Leishmania*, *Leptospira*, *Neospora*, *Toxoplasma*, wild canids

Introduction

Wildlife populations may play an important role of reservoir for pathogens that constitute an active threaten for conservation of global diversity and human health (Morse *et al.* 1994; OIE 2010).

The number of infectious diseases affecting wildlife in this century is greater than at any time during the last century. In the past, predominate sporadic and self-limited outbreaks, and currently have been described infectious diseases causing major outbreaks and an irretrievable losses in wildlife. Infectious diseases represent a potential risk to the biodiversity, modifying behavior or structure of animal populations and leading some species to the complete extinction (Daszak *et al.* 2000; Williams *et al.* 2002).

By means clever and interesting adaptations systems, pathogens are able to cross species barriers and infect a wide range of hosts, ensuring their multiplication and survival in different situations (King 2004). An extensive literature survey of human pathogens reported more than 1,400 different species of pathogens, more than half known is classified as zoonotic (Taylor *et al.* 2001; Woolhouse *et al.* 2001). Of all pathogen species described in humans, 38.24% are bacteria, 22.53% are fungi, 20.40% are helminthes, 14.78% are viruses or prions and 4.05% are protozoa (Woolhouse and Gowtage-Sequeria 2005). There is a greater interface between human populations and wildlife habitat due recreational interests and progressive changes in the environmental caused by expansion of human civilizations. On the other hand, little is known about diseases in wildlife populations and often an absence of strategies for control and prevention of infectious diseases in wildlife (Daszak *et al.* 2000; King 2004).

Accordingly, the purpose of this study was to investigate DNA and anti- *Leishmania* spp., *Leptospira* spp., *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in captive and free-range crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from northeastern Brazil.

Material and Methods

Animals and sampling

This study was in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Animal Use Ethics Committee from Universidade Federal Rural de Pernambuco (protocol number 27/2015) and by Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) license number 47677

Twenty-five crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from different states of northeastern Brazil were sampled by this study (Table 1). Eight crab-eating fox from Pernambuco state were considered as free-range wild canids since the samples were collected until five days after the animal has been attended in the private and teaching hospitals. Seventeen crab-eating fox were more than 30 days in Zoo (Alagoas and Paraíba states) or Center of Triage of Wild Animals (Alagoas and Bahia states), thus they were classified as captive animals.

Table 1. Distribution of the crab-eating foxes (*Cerdocyon thous* – Linnaeus 1776) sampled, according to Brazilian State and origin (Zoo, Center of Triage of Wild Animals, Private Veterinary Hospital and Veterinary Teaching of Universidade Federal Rural de Pernambuco).

Brazilian State	Origin			
	Zoo	Center of Triage of Wild Animals	Private Veterinary Hospital	Veterinary Teaching Hospital of Universidade Federal Rural de Pernambuco
Alagoas	$n = 2$	$n = 1$	**	**
Bahia	**	$n = 4$	**	**
Paraíba	$n = 10$	**	**	**
Pernambuco	**	**	$n = 5$	$n = 3$

Blood samples for molecular and serological analysis (3-5 ml) were collected by cephalic or jugular vein punctures, using physical or chemical restraint (ketamine 10 mg/kg and

xylazine 1 mg/kg). Blood samples destined from serological analysis were centrifuged at 700 x g for 10 minutes, and the sera obtained were stored at -20°C until further processing.

Serological analysis

The in-house MAT was performed using *T. gondii* and *N. caninum* antigen produced from in vitro cultured tachyzoites. All serum samples were researched for *Toxoplasma gondii* (cut-off value: 1:25) and *Neospora caninum* (cut-off value: 1:50) IgG antibodies through Modified Agglutination Test (MAT) and *Neospora* agglutination test (NAT) as described by Desmonts and Remington (1980) and Romand *et al.* (1998), respectively. Briefly: in each well of the microplate 25 μL of the antigen solution and 25 μL of the serum sample were mixed. Positive and negative control were also included. The microplate was covered with a sealing tape and incubated at 37°C for 24 hours. A blue dot at the bottom of the well was considered as a negative result and a clear bottom of the well was considered as a positive result.

Anti-*Leishmania chagasi* antibodies were investigated by ELISA technique using the commercial kit Canine Leishmaniasis EIE (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), according to manufacturer recommendations. All samples were analyzed in duplicate.

The leptospirosis diagnosis was performed by means of Microscopic Agglutination Test (MAT), according to standard methods (OIE 2014), using the following antigens: Serogroup Sejroe (Hardjobovis, Sejroe, Wolffi, Guaricura, Hardjoprajitno), Serogroup Icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae, Copenhageni), Serogroup Australis (Australis, Bratislava), Serogroup Canicola (Canicola), Serogroup Autumnalis (Autumnalis), Serogroup Bataviae (Bataviae), Serogroup Ballum (Castellonis), Serogroup Hebdomadis (Hebdomadis), Serogroup Tarassovi (Tarassovi), Serogroup Cynopteri (Cynopteri), Serogroup Djasiman (Djasiman) and Serogroup Pomona (Pomona). All samples with agglutinating activity at a

dilution of 1:100 were considered positive. The positive samples were titrated serially using a ratio of two. The cutoff point was the sample with the highest dilution that produced 50% agglutination compared with the control. The highest titer obtained was used to identify the causative serovar (Cole *et al.* 1973).

Molecular Analysis

Blood samples from the crab-eating foxes were submitted to DNA extraction using the commercial kit "Wizard SV Genomic DNA Purification System" (Promega®), according to the manufacturer's protocol.

For detection of *T. gondii* DNA single tube nested PCR was performed using two pairs of primer, one external (TgNN1 and TgNN2) and another internal (TgNP1 and TgNP2), amplifying a fragment of 227 bp from internal transcribed spacer (ITS1) region (Hurtado *et al.* 2001). Positive control of the reaction was a suspension of RH strain tachyzoites (10^4 tachyzoites/mL) and ultrapure water was used as negative control.

N. caninum DNA detection was carried out by a nested-PCR adapted to a single tube, using the external primers TgNN1 and TgNN2 and internal primers NP1 and NP2 (Buxton 1998; Hurtado *et al.* 2001; Regidor-Cerrillo *et al.* 2014), able to amplify a fragment of 240 bp from ITS1 region of this parasite. A suspension of *N. caninum* tachyzoites (NC7 Spain, 10^1 , 10^{-2} tachyzoites/mL) and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively.

Detection of *Leishmania (L.) donovani*-complex DNA was performed as previously described (Cortes *et al.* 2004), using a set of primers MC1 and MC2 which amplified a 447 bp product concerning to the kinetoplast DNA (kDNA) of the *L. infantum*. Positive control of the

test was parasites from bone marrow of a positive dog to *L. (L.) infantum* and the negative control was a bone marrow of a healthy dog.

The amplified PCR products were visualized under UV light in 1.5% agarose gel stained with BlueGreen (LGC[®] Biotecnologia, Brasil).

Results

Serological analysis for detection of *T. gondii*, *N. caninum* and *L. chagasi* and animal management (free-range or captive) are available in Table 2.

Table 2. Serological detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania chagasi* in crab-eating fox (*Cerdocyon thous* – Linnaeus 1776) from northeastern Brazil.

Serological analysis results				
Brazilian state	<i>L. chagasi</i>	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>	Animal Management
Alagoas	0/3	1/3	1/3	Captive
Bahia	1/4	0/4	1/4	Captive
Paraíba	0/10	3/10	3/10	Captive
Pernambuco	0/8	5/8	4/8	Free-range

The frequency of antibodies anti-*T. gondii* was 36.0% and the frequency according to the animal situation were 50% and 29.41% for free-range and captive wild canids, respectively.

The frequency of *N. caninum* infection observed by this study was 36.0%, and the frequency according to the animal situation were 62.50% and 23.52% for free-range and captive wild canids, respectively. In captive wild canids a frequency of 4.0% of antibodies anti-*L. chagasi* was detected and absence of positive samples in free-range animals. Co-infections cases were identified by serology as follows: one captive wild canid, from Bahia, positive for *T. gondii* and *L. chagasi* and two free-range animals, from Pernambuco, positive for *T. gondii* and *N. caninum*.

All PCR assays performed were negative for the three pathogens analyzed and there were no positive serum samples for *Leptospira*.

Discussion

Antibodies anti-*T. gondii* has been described in wild canids worldwide (Buxton *et al.* 1997; Zarnke *et al.* 2000; Jakubek *et al.* 2001). In Brazil, serological studies have demonstrated a high prevalence of *T. gondii* in wild canids ranging from 63% to 91.7% (Gennari *et al.* 2004; Andre *et al.* 2010; Almeida Curi *et al.* 2012; Proença *et al.* 2013). In contrast, low prevalence (19.2%) was detected in captive wild canids (Catenacci *et al.* 2010). Free-range wild canids are more exposed to *T. gondii* infection due the ingestion of tissues containing cysts (carnivorism) and environmental contamination by oocysts of this parasite (presence of wild felids) (Fornazari and Langoni 2014). On the other hand, an adequate zoo-sanitary management of the captive wild canids reduce the risk of *T. gondii* infection (Zimpel *et al.* 2015).

Toxoplasma gondii DNA has been described in brain of wild canids (Ferroglia *et al.* 2014; Suteu *et al.* 2014; Nascimento *et al.* 2015). Considering that all animals sampled by this study were alive, only blood samples were collected. No evidences of *T. gondii* DNA were found in

the blood samples analyzed. These results were not a surprise to the authors. Most likely, the wild canids of this study were in the chronic phase of toxoplasmosis, thus a low parasitemia hardly ever is detected and the blood PCR has shown a low negative predictive value (Liu *et al.* 2015).

The first reports of antibodies anti-*N. caninum* in free-range and captive Brazilian wild canids (Cañón-Franco *et al.* 2004; Vitaliano *et al.* 2004) suggested the hypothesis that these species may act as definitive hosts of *N. caninum*. Posteriorly, Mattos *et al.* (2008) reported prevalence of 36% in captive crab-eating fox, maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), similar to the prevalence of 41,2% stated by Andre *et al.* (2010) in captive wild canids, including bush-dog (*Speothos venaticus*) and hoary fox (*Lycalopex vetulus*). Other studies did not find anti-*N. caninum* antibodies in free-range wild canids (Melo *et al.* 2002, Almeida Curi *et al.* 2010; Almeida Curi *et al.* 2012). The high frequency of anti-*N. caninum* antibodies (62,50%) observed in free-range wild canids of this study may indicate a substantial environmental contamination by *N. caninum* oocysts (Hamilton *et al.* 2005).

It is believed that the low parasitemia of *N. caninum* is the likely cause of the negative PCR results presented by this study. Nonetheless, *N. caninum* has been isolated (Dubey *et al.* 2014) and detected (Nascimento *et al.* 2015) in brain of wild canids.

Not only domestic canids are important vertebrate reservoir of *L. chagasi*, but also wild canids should be considered relevant for the leishmaniasis life cycle (Ashford 2000). Infection cases have been described in crab-eating fox and hoary fox (*Lycalopex vetulus*) (Curi *et al.* 2006) and bush-dog (*Speothos venaticus*) (Figueiredo *et al.* 2008). In Brazil, the crab-eating fox is the only reservoir of *L. chagasi* (Courtenay *et al.* 1996). Curi *et al.* (2006) and Jusi *et al.* (2011) reported 19% and 21.4% of *Leishmania* spp. prevalence, respectively. The low frequency observed by this study is similar to that stated by Santos *et al.* (2012). This

scientific data is meaningful due the northeastern Brazil is classified as an endemic area for *L. chagasi* (Carvalho *et al.* 2007). Thus, a sylvatic cycle of *L. chagasi* may exists among crab-eating fox from endemic regions and these wild canids may play an important role in leishmaniasis transmission chain and a potential risk to wildlife veterinarians, handlers and public health. None suggestive leishmaniasis clinical signal were observed in the *L. chagasi* positive animal of this study, corroborating with previous study that stated that crab-eating fox rarely presents clinical signs, and the few animals with leishmaniasis clinical cases recover spontaneously, maintaining a low parasite burden (Courtenay *et al.* 2002).

Molecular analysis detected *L. chagasi* DNA in captive bush-dog (Lombardi *et al.* 2014) and crab-eating fox (Tenório *et al.* 2011). *L. chagasi* DNA was not found by this study, however this finding was expected, considering the low parasite burden described in that specie (Courtenay *et al.* 2002).

Unfortunately, epidemiological studies on leptospirosis in free-range wild canids are scarce (Girio *et al.* 1999). Serovars Copenhageni, Grippytyphosa and Hardjo were reported in free-range crab-eating fox (Rodrigues *et al.* 2015). Samples from road-killed wild canids were assayed for *Leptospira* spp., but no positive results were found (Azevedo *et al.* 2009). On the other hand, captive animals are more easily exposed to risk factors for leptospirosis (Rodrigues *et al.* 2015). Serovars Grippytyphosa (Esteves *et al.* 2005), Pyrogenes and Hebdomadis (Lenharo *et al.* 2012) were previously described in captive crab-eating fox. In contrast, all serum samples from captive wild canids of this study were negative for antibodies anti-*Leptospira* spp. The authors interpreted these results as indicative of an appropriate zoo-sanitary management of these captive animals.

Conclusion

This study reported the presence of pathogens with impact on animal and public health in wild canids from northeastern Brazil. Serological evidences of *T. gondii*, *N. caninum* e *L. chagasi* in wild canids raise the necessity of further studies in this field to contribute with data concerning to infectious diseases transmission chain in wild canids from Brazil.

References

Almeida Curi N.H., Araújo A.S., Campos F.S., Lobato Z.I.P., Gennari S.M., Marvulo M.F.V., Silva J.C.R., Talamoni S.A., 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: Disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation*, 19, 3513-3524. DOI: 10.1007/s10531-010-9911-0

Almeida Curi N.H., Coelho C.M., Campos Cordeiro Malta M., Magni E.M., Sábato M.A., Araújo A.S., Lobato Z.I., Santos J.L., Santos H.A., Ragozo A.A., Souza S.L., 2012. Pathogens of wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 48, 1052-1056. DOI: 10.7589/2011-10-304.

André M.R., Adania C.H., Teixeira R.H., Silva K.F., Jusi M.M., Machado S.T., Bortolli C.P., Falcade M., Sousa L., Alegretti S.M., Felipe P.A., Machado R.Z., 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *Journal of Parasitology*, 96, 1007-1009. DOI: 10.1645/GE-2502.1

Ashford R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30, 1269–1281. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00136-3

Azevedo S.S., Silva M.L.C.R., Batista C.S.A., Gomes A.A.B., Vasconcellos A.S., Aves C.J., 2009. Anticorpos anti *Brucella abortus*, anti *Brucella canis* e anti *Leptospira* spp. em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online. DOI: 10.1590/S0103-84782009005000232

Buxton D., Maley S.W., Pastoret P.P., Brochier B., Innes E.A., 1997. Examination of red fox (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Record*, 141, 308-309. PMID: 9330477

Buxton D., Maley S.W., Wright S., Thomson K.M., Rae A.G., Innes E.A., 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 118, 267-279. PMID: 9651804

Cañón-Franco W.A., Bergamaschi D.P., Labruna M.B., Camargo L.M.A., Souza S.L.P., Silva J.C.R., Pinter A., Dubey J.P., Gennari S.M., 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brasil. *Veterinary Parasitology*, 115, 71-74. DOI: 10.1016/S0304-4017(03)00131-6

Carvalho M.R., Lima B.S., Marinho-Júnior J.F., Silva F.J., Valença H.F., Almeida F.de. A., Silva A.L., Brandão-Filho S.P., 2007. Phlebotomine sandfly species from an American

visceral leishmaniasis area in the Northern Rainforest region of Pernambuco State, Brazil.

Cadernos de Saúde Pública, 23, 1227-1232. DOI: 10.1590/S0102-311X2007000500024

Catenacci L.S., Griese J., Silva R.C., Langoni H., 2010. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 169, 190-192. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.12.019.

Cole J.R., Sulzer C.R., Pulsely P.R., 1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. *Applied Microbiology*, 5, 976-980. PMID: PMC380950

Cortes S., Rolão N., Ramada J., Campino L., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 12-17. PMID: 14702834

Courtenay O., Santana E.W., Johnson P.J., Vasconcelos I.A., Vasconcelos A.W., 1996. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 498–502. PMID: 8944254

Courtenay O., Quinnell R.J., Garcez L.M., Shaw J.J., Dye C., 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 1314–1320. DOI: 10.1086/344312

Curi N.H., Miranda I., Talamoni S.A., 2006. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 99–101. DOI: 10.1590/S0074-02762006000100019

Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D., 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443-449. DOI: 10.1126/science.287.5452.443

Desmonts G., Remington J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 562–568. PMID: PMC273461

Dubey J.P., Jenkins M.C., Ferreira L.R., Choudhary S., Verma S.K., Kwok O.C., 2014. Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). *Veterinary Parasitology*, 201, 150–153. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.12.032

Esteves F.M., Guerra-Neto G., Girio R.J.S., Silva-Vergara M.L., Carvalho A.C.F.B., 2005. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp em animais e funcionários do Zoológico Municipal de Uberaba, MG. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 283-288.

Ferroglio E., Bosio F., Trisciuoglio A., Zanet S., 2014. *Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps. *Parasite and Vectors*, 7, 1:196. DOI: 10.1186/1756-3305-7-196

Figueiredo F.B., Gremiao I.D., Pereira S.A., Fedulo L.P., Menezes R.C., Balthazar D.A., 2008. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 200–201. DOI: 10.1016/j.trstmh.2007.10.001

Fornazari F., Langoni H., 2014. Principais zoonoses em mamíferos selvagens. *Veterinária e Zootecnia*, 21, 10-24.

Gennari S.M., Canón-Franco 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., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 121, 337-340.

DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.02.023

Girio R.J.S., Herrera R.C.P., Pereira F.J.G., Mathias L.A., 1999. Pesquisa de infecção por *Leptospira interrogans* em animais da região de Nhecolândia, no Pantanal do Mato Grosso do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, 65, 87.

Hamilton C.M., Gray R., Wright S. E., Gangadharan B., Laurenson K., Innes E.A., 2005. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes*

vulpes) from around the U.K. *Veterinary Parasitology*, 130, 169–173. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.03.020

Hurtado A., Aduriz G., Moreno B., Barandika J., García-Pérez A.L., 2001. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology*, 102, 17-27. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00526-X

Jakubek E.B., Brojer C., Regnersen C., Ugglå A., Schares G., Bjorkman C., 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, 102, 167–172. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00513-1

Jusi M.M., Starke-Buzetti W.A., Oliveira T.M., Tenório M.S., Sousa L.O., Machado R.Z., 2011. Molecular and sorological detection of *Leishmania* sp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20, 219-222. DOI: 10.1590/S1984-29612011000300008

King A., Varughese P., De Serres G., Tipples G.A., Waters J., 2004. Measles elimination in Canada. *Journal of Infectious Diseases*, S236. DOI: 10.1086/378499

Lenharo D.K., Santiago M.E.B., Lucheis S.B., 2012. Avaliação Sorológica para Leptospirose em Mamíferos Silvestres Procedentes do Parque Zoológico Municipal de Bauru, SP. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79, 333-341.

Liu Q., Wang Z.D., Huang S.Y., Zhu X.Q., 2015. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasite and Vectors*, 8, 292. DOI: 10.1186/s13071-015-0902-6

Lombardi M.C., Turchetti A.P., Tinoco H.P., Pessanha A.T., Soave S.A., Malta M.C.C., Paixão T.A., Santos R.L., 2014. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34, 1243-1246. DOI: 10.1590/S0100-736X2014001200017

Mattos B.C., Patrício L.L.F., Plugge N.F.R., Lange R.R., Richartz R.R.T.B., Locatelli-Dittrich R., 2008. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, 17, 267-272. PMID: 20059860

Melo C.B., Leite R.C., Leite F.S.C., Leite R.C., 2002. Serological surveillance on South American wild canids for *Neospora caninum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54, 444-447. DOI: 10.1590/S0102-09352002000400018

Morse S.S. (Ed.). 1994. *Emerging Viruses*, Oxford University Press, USA, 352 pp.

Nascimento C.O., Silva M.L., Kim P.C.P, Gomes A.A., Gomes A.L., Maia R.C., Almeida J.C., Mota R.A. 2015. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in Brazil. *Acta Tropica*, 146, 60-65. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.02.016

OIE – World Organisation for Animal Health Leptospirosis. (Ed.). 2004. Manual of Diagnostic test and Vaccines for Terrestrial Animals, Office International des epizooties, FR, 1404 pp.

OIE – World Organisation for Animal Health. (Ed.) 2010. Training Manual on Wildlife Diseases and Surveillance, Office International des epizooties, FR, 56p

Proença L.M., Silva J.C.R., Galera P.D., Lion M.B., Marinho-Filho J.S., Ragozo A.M.A., Gennari S.M., Dubey J.P., Vasconcellos S.A., Souza G.O., Pinheiro-Junior J.W., Santana V.L.A., França G.L., Rodrigues F.H.G., 2013. Serologic survey of infectious diseases in populations of maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Águas Emendadas Ecological Station, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44, 152-155. DOI: 10.1638/1042-7260-44.1.152

Regidor-Cerrillo J., Arranz-Solís D., Benavides J., Gómez-Bautista M., Castro-Hermida J.A., Mezo M., Pérez V., Ortega-Mora L.M., González-Warleta M., 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how they isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Veterinary Research*, 45, 10. DOI: 10.1186/1297-9716-45-10

Rodrigues T.C.S., Santos A.L.Q., Lima-Ribeiro A.M.C., Lemos F.G., Azevedo F.C., Arrais R.C., Gomes D.O., Tavares T.C.F., 2015. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in

free-ranging wild canids from the Brazilian savanna. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 734-740. DOI: 10.1590/S0100-736X2015000800005

Romand S., Thulliez P., Dubey J.P., 1998. Direct agglutination test for serologic diagnose of *Neospora caninum*. *Parasitology Research*, 84, 50-53. PMID: 9491426

Santos J.L.C., Magalhães N.B., Santos H.A., Ribeiro R.R., Guimarães M.P., 2012. Parasites of domestic and wild canids in the region of Serra do Cipó National Park, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21, 270-277. DOI: 10.1590/S1984-29612012000300016

Şuteu O., Mihalca A.D., Paştiu A.I., Györke A., Matei I.A., Ionică A., Balea A., Oltean M., D'Amico G., Sikó S.B., Ionescu D., Gherman C.M., Cozma V., 2014. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Romania are carriers of *Toxoplasma gondii* but not *Neospora caninum*. *Journal of Wildlife Diseases*, 50, 713-716. DOI: 10.7589/2013-07-167

Taylor L.H., Latham S.M., Woolhouse M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356, 983–989. DOI: 10.1098/rstb.2001.0888

Tenório M.S., Sousa L.O., Paixão M.S., Alves M.F., Paulan S.C., Lima F.L., Jusi M.M., Tasca K.I., Machado R.Z., Starke-Buzetti W.A., 2011. Visceral leishmaniasis in a captive

crab-eating fox *Cerdocyon thous*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42, 608-616. DOI: 10.1638/2010-0245.1

Vitaliano S.N., Silva D.A.O., Mineo T.W.P., Ferreira R.A., Bevilacqua E., Mineo J.R., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 122, 253-260. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.04.004

Zarnke R.L., Dubey J.P., Kwok O.C., Ver Hoef J.M., 2000. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in selected wildlife species from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 36, 219–224. DOI: 10.7589/0090-3558-36.2.219

Zimpel C.K., Grazziotin A.L., Barros-Filho I.R., Guimaraes A.M.S., Santos L.C., Moraes W., Cubas Z.S., Oliveira M.J., Pituco E.M., Lara M.C.C.S.H., Villalobos E.M.C., Silva L.M.P., Cunha E.M.S., Castro V., Biondo A.W., 2015. Occurrence of antibodies anti-*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira interrogans* in a captive deer herd in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 24, 482-487. DOI: 10.1590/S1984-29612015065

Williams E.S., Yuill T., Artois M., Fischer J., Haigh S.A., 2002. Emerging infectious diseases in wildlife. *Revue Scientifique Et Technique*, 21, 139–157. PMID: 11974625

Woolhouse M.E.J., Taylor L.H., Haydon D.T., 2001. Population biology of multi-host pathogens. *Science*, 292, 1109–1112. DOI: 10.1126/science.1059026

Woolhouse M.E.J., Gowtage-Sequeria S., 2005. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1842-1847. DOI: 10.3201/eid1112.050997

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram de forma direta ou indireta a circulação de patógenos e agentes zoonóticos com relevância em saúde única, reforçando a necessidade de contínuos estudos na área para fornecer dados atuais sobre a epidemiologia das zoonoses de origem silvestre, bem como orientar ações de vigilância, tratamento e controle de doenças. Deve-se atentar para um manejo zoo-sanitário adequado dos animais mantidos em cativeiro ou daqueles apreendidos de vida livre, com o intuito de reduzir as possibilidades da disseminação de agentes infecciosos entre animais (silvestres ou não) nessas condições de ambiente. Avaliação sanitária deve ser feita periodicamente para identificar a circulação de agentes de interesse em saúde única, permitindo que sejam efetuadas as devidas correções de manejo e limpeza do ambiente onde estes animais se encontram, evitando a contaminação de solo e fontes de água e do ambiente como um todo. Por fim, a interface humano-animal é um aspecto a ser cuidadosamente observado nesses canídeos, uma vez que a transmissão de agentes zoonóticos é favorecida e surtos dessas doenças podem ocorrer entre profissionais de Zoológicos, Centros de Triagem de Animal Silvestre e Hospitais Veterinários ou mesmo com o público em geral que, eventualmente, possa ter contato com esses animais.