



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**Isolamento e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* de gatos ferais no  
Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil**

**RENATA PIMENTEL BANDEIRA DE MELO**

**RECIFE**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**Isolamento e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* de gatos ferais no  
Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil**

**RENATA PIMENTEL BANDEIRA DE MELO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

**RECIFE**

**2016**

Ficha catalográfica

M528i Melo, Renata Pimentel Bandeira de.  
Isolamento e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* de gatos ferais no Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil / Renata Pimentel Bandeira de Melo. – Recife, 2016.  
54 f : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical )  
– Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.

Inclui referências.

1. *Felis catus*. 2. Genotipagem. 3. Bioensaio em Camundongos. 4. Toxoplasmose. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador II. Título.

CDD 636.089

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

**RENATA PIMENTEL BANDEIRA DE MELO**

**Isolamento e caracterização genética de *Toxoplasma gondii* de gatos ferais no Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil**

Aprovada em 18 de fevereiro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota (Orientador)  
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

---

Dr<sup>a</sup>. Érica Paes Barreto Xavier de Moraes Oliveira  
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flaviana Santos Wanderley  
Núcleo de Ciências Biológicas (NUCIB/UNCISAL)

---

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto  
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFAL)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Lúcia e Daniel, minha fonte de inspiração e admiração, meus maiores incentivadores, que nunca mediram esforços para nos proporcionar oportunidades. Obrigada pelo apoio e amor incondicionais. À minha irmã Clarissa, pela amizade, cumplicidade e parceria. À minha avó Auristella (*in memorian*), a pessoa mais paciente e generosa que conheci. Apesar da ausência, continua nos iluminando com sua força, incentivo e fé. A toda a minha grande família: de sangue e de coração. Obrigada pelo apoio e incentivo constantes.

Ao meu companheiro, meu amigo, meu amor e meu porto seguro, Rodrigo.

À Amapola (*in memorian*), nossa gorda, por todo o carinho, lambidas e mordidas, obrigada por fazer parte da nossa família. À Laka, nossa louca Labralata, o mais novo membro da família. Obrigada pelo carinho e companheirismo ao longo da escrita desta dissertação, por me distrair nos momentos necessários e nos mais inoportunos.

A cada um dos meus mestres, professores e orientadores, que contribuíram para a minha formação acadêmica e me conduziram nessa caminhada. Em especial à Prof. Andréa Alice, ao Prof. José Wilton, Dr. Érica Moraes, Prof<sup>a</sup> Flaviana Wanderley, Prof. Leonildo Galiza, Prof. Mateus Matiuzzi, Prof. Rinaldo Mota e Prof. Wagner Porto, pelos exemplos de profissionalismo e ética, pelos ensinamentos e confiança.

Ao Prof. Rinaldo Mota, por ser mais que um orientador, por acreditar, incentivar, ensinar e aprender; pela credibilidade e confiança depositas em mim. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas ao longo desses anos de trabalho, amizade e parceria. Agradeço pelo meu crescimento científico, profissional e pessoal.

Agradeço a toda a Família do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, pela amizade, ajuda, convivência e aprendizado diários, nossas realizações não seriam possíveis sem vocês. Em especial, agradeço a Fernando Magalhães e Eduardo Guelfer, pelo auxílio na coleta e envio de amostras. E aos amigos que ajudaram diretamente na execução deste projeto de pesquisa: Adrienne Mota, Camila Pedrosa, Débora Viegas e Jonatas Campos. Agradeço ainda aos amigos Moriarty: Camila, Jonatas e Pomy Kim, pela amizade, ensinamentos e companheirismo, principalmente naqueles dias com jornada de 10 horas de trabalho. Obrigada pela disponibilidade nas coletas, necropsias, bioensaios e afins. À Dona Guiomar e Cleide, pela organização do nosso departamento.

A todos do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL), representados pelo Prof. Dr. João Luis Garcia e Dr. Luiz Daniel de Barros, obrigada pelas orientações e análises genotípicas.

Ao Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira, pelas sugestões e grande contribuição na elaboração do artigo.

Aos meus amigos, de infância, colégio e faculdade, vocês sabem quem são. À minha amiga de infância e colega de profissão, Marcela, obrigada pela verdadeira amizade, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa no período do estudo e financiamento do projeto de pesquisa.

Aos animais necessários ao desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Obrigada a todos que contribuíram para esta realização.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um coccídeo intracelular obrigatório formador de cistos teciduais, responsável pela toxoplasmose, zoonose de grande impacto na saúde pública. É capaz de infectar a maioria dos animais homeotérmicos, incluindo humanos. Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos, apresentando grande importância na epidemiologia da toxoplasmose pela capacidade de eliminar oocistos nas fezes, contaminando o ambiente. Este estudo teve como objetivo isolar e genotipar *T. gondii* em gatos ferais (*Felis catus*) do Arquipélago de Fernando de Noronha, Estado de Pernambuco, Brasil. Durante o período de um ano, gatos ferais fracos foram capturados pelo Centro de Vigilância Animal do Arquipélago. Após contenção química (quetamina 10% e xilazina 1%) foram coletadas amostras de sangue de 31 felinos ferais de diferentes localidades da Ilha. Esses animais doentes, posteriormente, vieram a óbito e fragmentos de encéfalo, coração, pulmão, diafragma e fígado foram coletados. As amostras de sangue foram destinadas à sorologia por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos (IgG) anti-*T. gondii* e os fragmentos de tecido de felinos positivos na RIFI foram submetidos ao bioensaio em camundongos para isolamento do protozoário. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foram detectados em 18/31 (58%) felinos. Sete animais tiveram seus tecidos submetidos ao bioensaio, obtendo-se dois isolados de *T. gondii* não patogênicos para camundongos. A genotipagem foi realizada por meio da PCR-RFLP *multilocus*, utilizando 10 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico). Uma cepa atípica de *T. gondii* (ToxoDB #146) foi identificada, sendo este o primeiro relato deste genótipo em gatos ferais no mundo. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o estudo da epidemiologia molecular deste agente e permitem concluir que a infecção por *T. gondii* ocorre na população de felinos do Arquipélago. Medidas de controle baseadas na educação sanitária devem ser reforçadas para prevenir a infecção dos felinos e reduzir as fontes de infecção para outros hospedeiros intermediários, sobretudo para a população humana desta Ilha.

**Palavras-chave:** *Felis catus*; Genotipagem; Bioensaio em camundongos; Toxoplasmose

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular coccidian, tissue cyst forming, which causes toxoplasmosis, zoonotic disease of great impact in public health. *T. gondii* is able to infect most of warm-blooded animals, including humans. Felids are recognized as the only definitive hosts and are important in toxoplasmosis epidemiology, shedding oocysts in feces, contaminating environment. The purpose of this study was to isolate and genotyping *T. gondii* in feral cats (*Felis catus*) from the Fernando de Noronha Archipelago, Pernambuco state, Brazil. During one year sick feral cats were caught by Archipelago Animal Vigilance Center. After chemical restraint (ketamine 10% and xylazine 1%) blood samples of 31 feral cats from different locations on the island were collected. These weak animals posteriorly died and fragments of brain, heart, lung, diaphragm, and liver were collected. Blood samples were intended to serology by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) for IgG antibody detection and tissue fragments were submitted to mouse bioassay for *T. gondii* isolation. Anti-*T.gondii* antibodies were detected in 18/31 (58%) felines. Tissues from seven animals were submitted to bioassay, obtaining two *T. gondii* isolates non-pathogenic for mouse. Genotyping was performed by PCR-RFLP using 10 molecular markers (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico), identifying an atypical strain of *T. gondii* (ToxoDB #146). This is the first report of this genotype in feral cats worldwide. The results obtained contribute to molecular epidemiology studies of this pathogen and show/demonstrate *T. gondii* infection in feline population of the Archipelago. Control measures based on health education should be reinforced to prevent the cat infection and to reduce infection sources for definitive and intermediate hosts, especially to human population of this island.

**Keywords:** *Felis catus*; Genotyping, Mouse bioassay; Toxoplasmosis



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

**Figura 1** - Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. **16**

**Figura 2** - Formas infectantes de *T. gondii*. (A) Taquizoíto em divisão (entre setas) e taquizoítos individuais (seta). (B) Cisto tecidual contendo bradizoítos em cérebro de camundongo. (C) Oocisto esporulado. **18**

### Artigo

**Figura 1** - Phylogenetic analysis of the *Toxoplasma gondii* isolate obtained (red circle), with the following strains used as references: RH, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, TgRsCr1, BrI, BrII, BrIII, BrIV. **53**

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> - Prevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos domésticos e ferais no mundo	<b>21</b>
<b>Quadro 2</b> - Estudos genotípicos de <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos domésticos e ferais no mundo	<b>26</b>
<b>Tabela I</b> - Anti- <i>T. gondii</i> IgG antibodies titers by Immunofluorescence Antibody Assay (IFA) in feral cats from Fernando de Noronha Island, Brazil, and result of mouse bioassay.	<b>52</b>
<b>Tabela II</b> - Molecular detection of <i>T. gondii</i> DNA (ITS1 region) in tissue sample of feral cats from Fernando de Noronha Island, Brazil.	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLO

°C	Grau Celsius
APA - FN	Área de Proteção Ambiental de Fernando de Noronha
DA	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
MAT	Teste de Aglutinação Direta Modificada
Panamar-FN	Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo de fragmento de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela PCR
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1	<b>Geral.....</b>	<b>14</b>
2.2	<b>Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
3.1	<b>Histórico .....</b>	<b>15</b>
3.2	<b>Agente Etiológico.....</b>	<b>15</b>
3.3	<b>Aspectos biológicos de <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>16</b>
3.4	<b>Formas de transmissão e sinais clínicos .....</b>	<b>18</b>
3.5	<b><i>Toxoplasma gondii</i> em gatos .....</b>	<b>20</b>
3.6	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>22</b>
3.7	<b>Controle da toxoplasmose .....</b>	<b>23</b>
3.8	<b>Caracterização genética de <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>24</b>
3.9	<b>Arquipélago de Fernando de Noronha .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>40</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é um parasito de distribuição mundial capaz de infectar animais homeotérmicos e causar a toxoplasmose. Esta zoonose caracteriza-se por infecção congênita, distúrbios reprodutivos e problemas oculares nos hospedeiros intermediários (DUBEY, 2004). Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos e apresentam um importante papel na epidemiologia da doença pela capacidade de eliminar oocistos nas fezes contaminando o ambiente (DUBEY & BEATTIE, 1988).

O estudo da diversidade genética de *T. gondii* é importante para o conhecimento dos aspectos biológicos, genéticos e epidemiológicos, possibilitando a associação das características fenotípicas e genéticas, distribuição epidemiológica nos hospedeiros, associação com as manifestações clínicas da doença, aperfeiçoamento e implementação de medidas de diagnóstico, além do controle e tratamento da toxoplasmose (SU et al., 2006; SU et al., 2010).

Estudos observaram que isolados de *T. gondii* de humanos e animais na América do Norte e Europa apresentavam baixa diversidade genética e estrutura populacional predominantemente clonal (DUBEY & BEATTIE, 1988; HOWE & SIBLEY, 1995). Porém, estudos desenvolvidos na América do Sul, principalmente no Brasil, observaram uma alta diversidade genética, com predominância de genótipos atípicos, em decorrência da recombinação sexual do parasito, favorecida pela grande biodiversidade presente na região (AJZENBERG et al., 2004; SU et al., 2006).

Localizado no Oceano Atlântico, no território do Estado de Pernambuco, o Arquipélago de Fernando de Noronha compreende a ilha principal e outras 21 ilhas secundárias, abrangendo um território total de 26 km<sup>2</sup> (SCHULZ-NETO, 2004). O Arquipélago de Fernando de Noronha apresenta uma grande biodiversidade, que inclui animais silvestres, sinantrópicos, animais de produção e de companhia, sendo declarado Patrimônio Natural da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura - UNESCO (UNESCO, 2001).

São poucos os estudos sobre a presença de agentes infecciosos no Arquipélago, especialmente o *T. gondii*, mas estudos prévios evidenciaram a ampla distribuição de anticorpos contra este coccídeo em espécies domésticas e selvagens desta ilha (DUBEY et al., 2010; COSTA et al., 2012). Na região Nordeste do Brasil, especialmente em Pernambuco e

Fernando de Noronha são escassos os estudos sobre a caracterização genética de isolados de *T. gondii*.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a epidemiologia molecular de *T. gondii* em gatos ferais do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Investigar a epidemiologia molecular de *Toxoplasma gondii* em gatos ferais do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil.

### 2.2 Específicos

Detectar a presença de anticorpos (IgG) anti-*T.gondii* em gatos ferais por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);

Isolar *T. gondii* em amostras de tecidos de gatos ferais soropositivos para *T. gondii* por meio da técnica de bioensaio em camundongos;

Detectar o DNA de *T. gondii* em tecidos de gatos ferais por meio da PCR *nested*;

Caracterizar genotipicamente os isolados de *T. gondii* por meio da análise de Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP *multilocus*), utilizando 10 marcadores genéticos específicos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico);

Realizar a análise filogenética dos genótipos obtidos e correlacionar com as características de genótipos de *T. gondii* descritos na literatura.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Histórico

A descoberta de *Toxoplasma gondii* ocorreu em 1908 por Charles Nicolle e Louis Manceaux que relataram a descoberta de um parasito intracelular em roedores da espécie *Ctenodactylus gundi*, no Instituto Pasteur da Tunísia. O novo parasito foi detectado em grande quantidade no baço, fígado e linfonodos mesentéricos dos roedores, além de ser observado em menor quantidade nos pulmões e rins e, ocasionalmente, no coração e medula óssea (NICOLLE & MANCEAUX, 2009). Na mesma época, Splendore reportou a descoberta de um parasito semelhante a *Leishmania* em coelhos de laboratório em São Paulo (SPLENDORE, 2009). Inicialmente, os pesquisadores acreditaram que se tratava de uma forma particular de *Leishmania*, sendo então denominado de *Leishmania gondii*. Posteriormente, em 1909, Nicolle e Manceaux renomearam o protozoário, atribuindo-lhe o nome de *Toxoplasma gondii* (do grego toxon = arco; plasma = forma) devido à forma alongada, encurvada em arco na sua fase de multiplicação no interior de macrófagos (REY, 1991).

#### 3.2 Agente Etiológico

*Toxoplasma gondii* é um coccídeo intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Sub-ordem Eimeriina, Família Sarcocystidae e Subfamília Toxoplasmatinae, sendo a única espécie identificada do gênero (LEVINE, 1985). Este protozoário formador de cistos teciduais é capaz de infectar a maioria dos animais homeotérmicos, incluindo humanos, animais domésticos e silvestres. No entanto, os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos (DUBEY & BEATTIE, 1988).

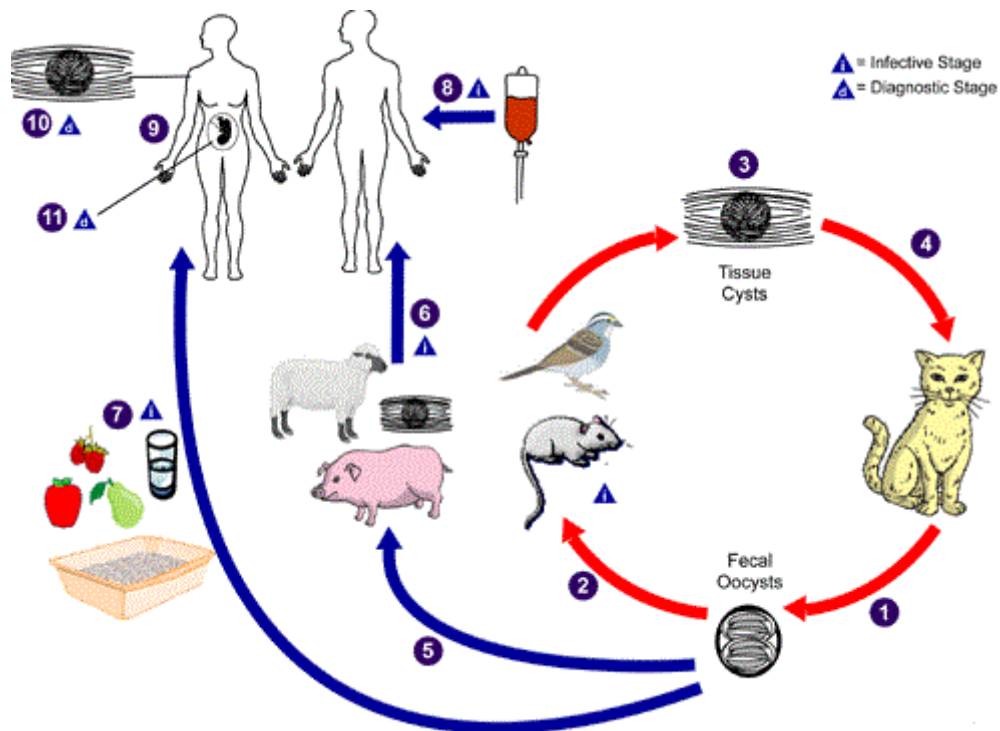
Devido à significativa importância médica e veterinária, *T. gondii* é um dos parasitos mais estudados em todo o mundo (DUBEY, 2010). É responsável pela toxoplasmose, uma importante zoonose de distribuição mundial, sendo uma das enfermidades parasitárias mais comuns no homem e em outros animais homeotérmicos (TENTER et al., 2000). Estima-se que um terço da população humana já foi exposta a este protozoário (JACKSON & HUTCHISON, 1989; DUBEY, 1998).



### 3.3 Aspectos biológicos de *Toxoplasma gondii*

O ciclo biológico de *T. gondii* é heteroxeno facultativo, pois pode se desenvolver em mais de um hospedeiro. Possui duas fases distintas: a fase assexuada, que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários por multiplicação rápida (taquizoítos) e multiplicação lenta (bradizoítos) e a fase sexuada que ocorre no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, os únicos com potencial de eliminar oocistos no ambiente (Figura 1) (DUBEY et al., 1998).

Três estágios infectantes são observados: taquizoítos, bradizoítos (no interior de cistos teciduais) e esporozoítos (no interior de oocistos) (DUBEY et al., 1998).



**Figura 1** - Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* (CDC, 2015).

Os taquizoítos (Figura 2A) caracterizam-se por multiplicação rápida, que ocorre em qualquer célula do hospedeiro intermediário e em células epiteliais não intestinais dos hospedeiros definitivos. Apresentam forma de meia-lua, medindo em torno de 2 x 6 µm com uma extremidade anterior pontiaguda e outra posterior arredondada. Ultraestruturalmente, constituem-se por várias organelas e corpos de inclusão e o núcleo situando-se na área central da célula (DUBEY et al., 1998). Invadem as células hospedeiras por penetração ativa ou por fagocitose, tornando-se ovoides, sendo envolvidos por um vacúolo que promove a proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (BONHOMME et al, 1992). Após penetração,

multiplicam-se assexuadamente causando a ruptura da célula hospedeira (DUBEY, 2004). Características de invasão e crescimento dessa forma infectante dependem da cepa de *T. gondii* e tipo da célula hospedeira. Cepas virulentas para camundongos geralmente crescem mais rápido em cultura celular do que as cepas menos virulentas (DUBEY, 2010). Apesar da classificação genotípica em três diferentes linhagens (I, II e III), não há diferenças estruturais entre elas (DUBEY et al., 1998).

Posteriormente, após inúmeras divisões, os taquizoítos dão origem aos cistos teciduais, que crescem e permanecem localizados intracelularmente, abrigando os bradizoítos (Figura 2B), os quais medem aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  x 1,5  $\mu\text{m}$  (DUBEY, 2004). A parede dos cistos caracteriza-se por ser elástica, fina, composta pela célula hospedeira e material do parasita. O tamanho e formato dos cistos podem variar de acordo com sua idade e localização. Cistos jovens são menores e contêm apenas dois bradizoítos, enquanto que os cistos mais velhos podem conter centenas deles. Os cistos localizados no cérebro geralmente apresentam forma esférica e medem até 70  $\mu\text{m}$  de diâmetro, enquanto que os cistos intramusculares são alongados e medem em torno de 100  $\mu\text{m}$  (DUBEY et al., 1998). São encontrados principalmente no tecido muscular e nervoso, incluindo encéfalo, olhos, musculatura esquelética e cardíaca. Também podem ser observados em órgãos como pulmão, fígado e rins (DUBEY, 2010). Os cistos podem permanecer por toda a vida do hospedeiro, de forma latente, sem causar resposta inflamatória (DUBEY et al., 1998).

Pequenas diferenças ultraestruturais são descritas entre as duas formas infectantes dos hospedeiros intermediários. Os bradizoítos apresentam núcleo localizado na extremidade posterior, são mais delgados e menos suscetíveis a enzimas proteolíticas que os taquizoítos, características estas que os diferenciam (DUBEY et al., 1998).

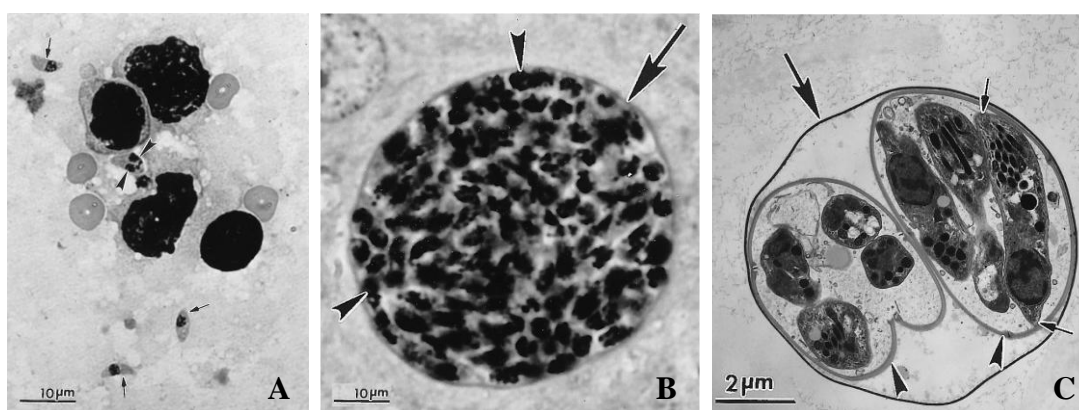
Os oocistos (Figura 2C) são formados exclusivamente pelos hospedeiros definitivos, os felídeos domésticos e selvagens, os quais podem eliminar oocistos após ingestão de qualquer das três formas infecciosas do agente (FRENKEL et al., 1970). Entretanto, o período pré-patente (período entre a infecção inicial e a eliminação de oocistos) e a frequência de eliminação variam de acordo com a forma infectante ingerida, sendo observada que a ingestão de cistos teciduais representa a principal causa de eliminação dos oocistos pelos felídeos (DUBEY, 2001).

Uma vez ingerido pelo hospedeiro definitivo, os cistos teciduais têm sua parede digerida por enzimas proteolíticas presentes no estômago e intestino, ocorrendo liberação dos bradizoítos. Esses podem penetrar no intestino e se multiplicar como taquizoítos,

disseminando-se para os teciduais extra intestinais, sangue e linfa, ou penetrar nas células epiteliais do intestino e desenvolver formas sexuadas do agente, com posterior formação dos oocistos (DUBEY, 2009a). Quando os oocistos se apresentam maduros, ocorre a ruptura das células epiteliais que os abrigam, sendo então liberados no lúmen intestinal, onde são eliminados juntamente com as fezes desses animais (DUBEY, 2004).

Os oocistos não esporulados apresentam forma subsférica a esférica e medem de 10  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A esporulação pode ocorrer de 1 a 5 dias após a eliminação de acordo com as condições ambientais, do ar e temperatura. Após esporulação, os oocistos apresentam forma subsférica a elipsoidal, aumentam cerca de 1  $\mu\text{m}$  e contêm dois esporocistos elipsoidais, cada um apresentando quatro esporozoítos em seu interior (DUBEY et al., 1998).

Os oocistos podem contaminar o ambiente e servir como fonte de infecção para os hospedeiros intermediários. Uma vez esporulados podem sobreviver por longos períodos de tempo sob determinadas condições ambientais, sendo observada sua viabilidade em solo úmido por meses a anos (DUBEY & BEATTIE, 1988). Também podem sobreviver em frutas e vegetais, onde se observou viabilidade por pelo menos oito semanas sob condições de refrigeração (KNIEL et al., 2002). Quando presentes no solo podem se disseminar mecanicamente por diversas espécies de anelídeos, entre as quais moscas, baratas e minhocas (DUBEY, 2009a).



**Figura 2** - Formas infectantes de *T. gondii*. (A) Taquizoíto em divisão (entre setas) e taquizoítos individuais (seta). (B) Cisto tecidual contendo bradizoítos em cérebro de camundongo. (C) Oocisto esporulado (DUBEY et al., 1998).

### 3.4 Formas de transmissão e sinais clínicos

A transmissão de *T. gondii* ocorre por duas vias: horizontal e vertical. A primeira acontece pela ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos esporulados ou pela ingestão de tecidos com cistos contendo bradizoítos. A segunda se dá pela transmissão transplacentária, na qual os taquizoítos são transferidos da mãe para o feto, acarretando a infecção (DUBEY, 2004).

A ingestão de carnes cruas ou mal cozidas representa um fator de risco importante para a infecção por *T. gondii*, uma vez que os bradizoítos são resistentes a elevadas temperaturas e a enzimas proteolíticas, podendo sobreviver por longos períodos de tempo no hospedeiro (DUBEY, 2009a). Para os humanos, a ingestão de alimentos contaminados e o contato com felídeos domésticos que podem eliminar o agente em seus excrementos são as principais formas de infecção. Para os felídeos, a ingestão de carnes ou vísceras cruas contaminadas e a ingestão de presas infectadas são as principais fontes de infecção (DUBEY & FRENKEL, 1998).

Embora pouco frequentes, outras formas de transmissão relatadas são a transfusão sanguínea (FIGUEROA-DAMINA, 1998), transplantes de órgãos (RENOULT et al., 1997; MUNIR et al. 2000) e a ingestão de leite não pasteurizado (CHIARI & NEVES, 1984; BONAMETTI et al., 1997). Surtos de toxoplasmose relacionados à ingestão de leite de cabras *in natura* foram relatados nos Estados Unidos (SACKS et al., 1982) e no Brasil (CHIARI & NEVES, 1984).

A veiculação hídrica de *T. gondii* já foi relacionada como a causa de diversos surtos em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, onde o consumo de água contaminada com oocistos foi associada a um surto de toxoplasmose no Paraná (MOURA et al., 2006). A ingestão de oocistos esporulados causa um quadro mais patogênico quando comparado aos bradizoítos e taquizoítos, independente da dose (DUBEY, 2009a).

Variedade de fatores como espécie, idade, resposta imunológica, forma de transmissão e tipo de cepa, podem determinar a manifestação da infecção e sinais clínicos (DUBEY & JONES, 2008).

A toxoplasmose congênita é caracterizada pela ocorrência da transmissão vertical, sendo frequente o desenvolvimento de sinais clínicos nos bebês quando a infecção materna ocorre durante a gestação. No entanto, quando adquirida antes da gestação, representa menos riscos para o feto (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

Em crianças congenitamente infectadas, a toxoplasmose pode causar problemas mentais e oculares, desde diminuição da visão em casos mais leves até completa perda visual,

retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral nos casos mais severos (DUBEY, 2004). Em pacientes imunocomprometidos como os portadores do vírus da AIDS, a toxoplasmose apresenta-se frequentemente de forma aguda, podendo ocasionar encefalite fatal ou neurotoxoplasmose (DUBEY, 1996a; MONTOYA & LIESENFELD, 2004). Nos adultos imunocompetentes, a toxoplasmose geralmente é assintomática (DUBEY, 2004).

Nos pequenos ruminantes, a toxoplasmose se manifesta principalmente por problemas reprodutivos como morte ou reabsorção embrionária, repetição do cio, mumificação fetal, aborto, morte neonatal e nascimento de crias debilitadas (DUBEY, 2004). A severidade dos sinais clínicos está associada ao estágio da gestação no momento da infecção, sendo mais grave nas infecções adquiridas no início da gestação (DUBEY, 2009b). Nas espécies caprina e ovina, quando a infecção ocorre no terço inicial da gestação é comum a ocorrência de morte fetal seguida de reabsorção embrionária ou abortamento. Em infecções adquiridas no terço médio, os abortos são mais frequentes, enquanto que no terço final é mais provável o nascimento de crias debilitadas ou cronicamente infectadas (DUBEY, 2010).

Nos hospedeiros definitivos geralmente manifesta-se de forma assintomática ou podem apresentar febre, anorexia, letargia, dispneia, diarreia, icterícia, vômito, desconforto abdominal, sinais neurológicos, além de sinais oculares como uveíte e retinocoroidite (DUBEY, 1994; VOLAIRE et al., 2005).

### **3.5 *Toxoplasma gondii* em gatos**

Os hospedeiros definitivos, principalmente os gatos domésticos, devido a sua integração ao núcleo familiar e o contato com rebanhos desempenham um papel fundamental na transmissão e manutenção da toxoplasmose devido a sua capacidade de eliminar oocistos. Estudos soro-epidemiológicos realizados em ilhas isoladas do Pacífico (WALLACE, 1969), Austrália (MUNDAY, 1972) e Estados Unidos (DUBEY et al., 1997) evidenciaram a ausência de *T. gondii* nas regiões que não apresentaram gatos, confirmando o envolvimento desses animais na transmissão natural.

Os gatos são mais propensos a eliminar oocistos após ingestão de cistos teciduais, comparado à ingestão de taquizoítos e oocistos (DUBEY, 2009a). Em geral, a eliminação de oocistos ocorre apenas por um período de 1 a 2 semanas após a infecção primária, tornando-se, posteriormente, imunes à eliminação (DUBEY, 1996a). No entanto foi observado após infecção experimental que a imunossupressão em filhotes resultou em nova eliminação de

oocistos após três semanas (MALMASI et al., 2009). Dois fatores são relevantes no envolvimento dos gatos no ciclo da toxoplasmose como importante fonte de contaminação: são amplamente distribuídos e produzem grande quantidade de oocistos, número este que pode chegar a milhões (DUBEY, 2001).

A infecção em gatos está diretamente relacionada à população de aves e ratos infectados por *T. gondii*, já que estes servem de alimento aos felinos (DUBEY, 2004). Na Costa Rica, onde foi diagnosticada uma alta infecção por *T. gondii* em roedores e aves locais, também foi encontrada uma elevada eliminação de oocistos pelos gatos da região (RUIZ & FRENKEL, 1980). Desta forma, em estudos epidemiológicos, os gatos soropositivos são indicadores de contaminação ambiental, uma vez que provavelmente já eliminaram oocistos nas fezes (DUBEY, 2004).

Estudos de soroprevalência de *T. gondii* em gatos domésticos e ferais em diferentes regiões do mundo estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1** - Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em gatos domésticos e ferais no mundo

Local	Hospedeiro	Soroprevalência		Referência
		Prevalência	Técnica ( <i>cut-off</i> )	
São Paulo, Brasil	Gato doméstico	26,3% (132/502)	MAT (1:20)	Silva et al. (2002)
Ohio, EUA	Gato doméstico	48% (133/275)	MAT (1:25)	Dubey et al. (2002b)
Paraná, Brasil	Gato doméstico	84,4% (49/58)	MAT (1:10)	Dubey et al. (2004)
Espanha	Gato doméstico	32,3% (189/585)	RIFI (1:40)	Miró et al. (2004)
Carolina do Norte, EUA	Gato doméstico	34% (26/76)	MAT (1:25)	Nutter et al. (2004)
	Gato feral	63% (63/100)		
São Paulo, Brasil	Gato doméstico	35,4% (84/237)	MAT (1:25)	Pena et al. (2006)
Colômbia	Gato doméstico	45,2% (77/170)	MAT (1:5)	Dubey et al. (2006)
China	Gato doméstico	79,4% (27/34)	MAT (1:10)	Dubey et al. (2007a)
Ilha de Mona, Porto Rico	Gato feral	84,2% (16/19)	MAT (1:10)	Dubey et al. (2007b)
Ilha St. Kitts, Caribe	Gato doméstico	84,9% (90/106)	MAT (1:20)	Moura et al. (2007)
Portugal	Gato doméstico	36,7% (76/207)	MAT (1:20)	Lopes et al. (2008)
Ilha Grenada, Caribe	Gato doméstico	30,6% (23/75)	MAT (1:25)	Dubey et al. (2009c)
	Gato feral	27,7% (28/101)		
Ilha Maiorca, Espanha	Gato feral	84,7% (50/59)	MAT (1:25)	Millán et al. (2009)
Escócia	Gato doméstico	19,2% (10/52)	ELISA (1:64)	Bennet et al. (2011)
Romênia	Gato doméstico	47% (111/236)	ELISA (1:10)	Gyorke et al. (2011)

Ilha de Fernando de Noronha, Brasil	Gato doméstico	72,0% (18/25)	RIFI (1:16)	Costa et al. (2012)
	Gato feral	66,6% (32/48)	MAT (1:25)	
Lisboa, Portugal	Gato doméstico	44,2% (187/423)	DA (1:20)	Waap et al. (2012)
Tailândia	Gato doméstico	10,1% (35/348)	MAT (1:25)	Sukhumavasi et al. (2012)
Pequim, China	Gato doméstico	57,8% (37/64)	MAT (1:20)	Qiang et al. (2012)
Holanda	Gato doméstico	20,2% (91/450)	ELISA	Opsteegh et al. (2012)
São Paulo, Brasil	Gato doméstico	16,3% (63/386)	RIFI (1:64)	Cardia et al. (2013)
Lisboa, Portugal	Gato doméstico	20,5% (44/215)	MAT (1:40)	Esteves et al. (2014)
Chequião, China	Gato doméstico	20,7% (24/116)	ELISA	Liu et al. (2014)
Colima, México	Gato doméstico	29,2% (14/48)	ELISA	Rico-Torres et al. (2015)
China	Gato doméstico	50% (21/42)	MAT (1:25)	Yang et al. (2015)

### 3.6 Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose consiste na associação dos sinais clínicos e dados epidemiológicos com exames sorológicos, histopatológicos, moleculares e isolamento do protozoário (DUBEY, 1993). Os sinais clínicos podem ser inespecíficos e comuns a outras enfermidades, por isso as técnicas laboratoriais devem ser utilizadas para se obter um diagnóstico definitivo (DUBEY, 2010).

Existem várias técnicas estabelecidas para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* e entre as mais utilizadas estão o Teste de Aglutinação Direta Modificada (MAT), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), os quais podem detectar anticorpos IgG e IgM. É importante destacar que a titulação de anticorpos não apresenta correlação com a severidade dos sinais e sintomas da toxoplasmose. Os exames sorológicos são uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de toxoplasmose e frequentemente são aplicados a estudos epidemiológicos; no entanto a sorologia positiva indica que o hospedeiro foi infectado em algum momento da sua vida, devendo, portanto, ser analisado conjuntamente com outras técnicas e achados da doença (DUBEY, 2010).

As técnicas de moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são de grande utilidade para a identificação de agentes infecciosos em tecidos e secreções, sendo utilizadas pela sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez (SINGH, 1997). Uma vantagem da técnica é a capacidade de detectar o parasito, mesmo quando presente em pequenas quantidades (HURTADO et al., 2001).

É importante ressaltar que a sensibilidade e especificidade da PCR dependem da seleção de iniciadores específicos para o DNA alvo, assim como da escolha dos protocolos adequados para coleta, acondicionamento, extração e purificação do DNA (DUBEY, 2010). A escolha dos reagentes, do termociclador e a correta análise dos produtos amplificados também são fundamentais (DUBEY & SCHARES, 2006).

O DNA de *T. gondii* já foi detectado por meio da PCR em tecidos de fetos abortados, placenta e órgãos reprodutivos de ovinos (HURTADO et al., 2001; MASALA et al., 2003; BEZERRA et al., 2013a; BEZERRA et al., 2014a), sêmen (MORAES et al., 2010; BEZERRA et al., 2014b), leite (CAMOSSO et al., 2011; BEZERRA et al., 2013b), sangue, humor aquoso (SANTOS et al., 2015) e fezes (SALANT et al., 2010).

A PCR também pode ser aplicada para detecção e diferenciação dos coccídeos e seus oocistos, entre eles *T. gondii*, *N. caninum*, *Hammondia heydorni* e *H. hammondi* que apresentam similaridade morfológica e taxonômica (SCHARES et al., 2005).

As principais técnicas utilizadas para o isolamento de *T. gondii* são o bioensaio e a inoculação do material suspeito em cultura celular. O bioensaio é considerado padrão ouro para detectar a viabilidade do parasito e pode ser realizado em camundongos pela inoculação do material por via intraperitoneal, subcutânea ou oral e em gatos, pela administração oral e observação das fezes quanto à presença de oocistos. O bioensaio em camundongos é a técnica mais utilizada para obtenção de isolados devido ao menor custo quando comparado aos outros procedimentos de isolamento e por ser modelo para avaliação da virulência de cepas (DUBEY, 2010).

### **3.7 Controle da toxoplasmose**

Para o desenvolvimento de medidas de controle é importante determinar as fontes de infecção e os fatores de risco associados. A principal medida para o controle da disseminação de *T. gondii* deve ser a prevenção da eliminação de oocistos pelos gatos (DUBEY, 1996b). Dessa forma, é preferível que os gatos sejam mantidos dentro de casa, a fim de evitar a caça de animais e ingestão de roedores e aves infectados; não devem ser alimentados com carnes e vísceras cruas ou mal passadas, dando preferência a alimentos comerciais; e é importante a limpeza diária das caixas de areia (VOLLAIRE et al., 2005; ELBEZ-RUBESTEIN, 2009).

Medidas higiênicas também podem ser tomadas a fim de prevenir a infecção por ingestão de alimentos contaminados com oocistos. A lavagem das mãos com água e sabão



antes de manipular alimentos e dos utensílios em contato com os produtos cárneos, afim de evitar a contaminação cruzada (DUBEY & BETTIE, 1988). As formas de *T. gondii* podem ser inviabilizadas após exposição a extremas temperaturas, seja pelo aquecimento a 67°C ou pelo congelamento a -13°C por 24 horas. Além disso, a ingestão de água não filtrada deve ser evitada (DUBEY et al., 1990; KOTULA et al., 1991).

As vacinas são indicadas com o objetivo de reduzir perdas fetais e a formação de cistos teciduais nos pequenos ruminantes e prevenir a formação e eliminação de oocistos em gatos (ARAÚJO, 1994). Até o momento não existe uma vacina única com boa eficiência para imunização contra *T. gondii*. Entretanto, estudos continuam sendo realizados a fim de desenvolver uma vacina ideal contra *T. gondii* (ELMORE et al., 2010).

### **3.8 Caracterização genética de *Toxoplasma gondii***

Estudos sobre a estrutura populacional de *T. gondii* têm sido realizados a fim de elucidar a contribuição da variedade genética sobre características epidemiológicas, como transmissão do agente e manifestação de sinais clínicos e sintomas (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; LEHMANN et al., 2006).

Com o objetivo de desenvolver marcadores genéticos, isolados de *T. gondii* foram agrupados de acordo com características de virulência em camundongos e estudos foram realizados a fim de reconhecer diferenças genéticas entre isolados provenientes de humanos e animais (HOWE & SIBLEY, 1995; SU et al., 2006; SU et al., 2010; DUBEY, 2010). Com base na técnica de polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela PCR (PCR-RFLP), *T. gondii* foi classificado em três linhagens genéticas clonais (I, II, III), relacionando-as ao comportamento de virulência em camundongos, sendo o tipo I considerado letal para camundongos, independente da dose, enquanto os tipos II e III são geralmente não virulentos (HOWE & SIBLEY, 1995).

Apesar da ampla distribuição mundial e da variedade de hospedeiros, *T. gondii* era descrito por possuir baixa diversidade genética, apresentando estrutura populacional predominantemente clonal (DUBEY & BEATTIE, 1988). Entretanto, com o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novos marcadores genéticos e técnicas como microssatélite e PCR-RFLP *multilocus* foi observada grande diversidade genética do *T. gondii* na América Latina, especialmente no Brasil (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; KHAN et al., 2006; LEHMANN et al., 2006; SU et al., 2006). Essa ampla diversidade genética pode ser

explicada pela alta recombinação sexual do agente, favorecida pela grande biodiversidade presente na região, desempenhando um importante papel na formação da estrutura populacional (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004).

Isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas de diferentes regiões geográficas do mundo foram analisados e observou-se variações de patogenicidade em camundongos conforme a localização geográfica do isolado. Fenotipicamente os isolados obtidos de galinhas assintomáticas do Brasil apresentaram-se virulentos em camundongos, demonstrando que a diversidade genética de *T. gondii* havia sido subestimada, visto que até então não haviam sido estudados isolados de diferentes localidades (LEHAMNN et al. 2006)

O primeiro estudo genotípico desenvolvido no Brasil caracterizou 25 isolados de galinhas cronicamente infectadas em São Paulo, dentre os quais 19 foram virulentos para os camundongos inoculados. Após análise por PCR-RFLP do gene SAG2, 16 isolados foram caracterizados como tipo I e nove foram tipo III (DUBEY et al., 2002a). Estudos genotípicos de isolados de *T. gondii* obtidos na região nordeste do Brasil tem sido relatados em suínos (BEZERRA et al., 2012; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013; SAMICO-FERNANDES et al., 2015), galinhas (DUBEY et al., 2008; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013), caprinos (CAVALCANTE et al., 2007; RAGOZO et al., 2010; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013), ovinos (MACIEL et al., 2014) e animais selvagens (PENA et al., 2011; VITALIANO et al., 2014) com predominância de genótipos atípicos.

O primeiro estudo de caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* a partir de gatos domésticos no Brasil foi realizado na cidade de Santa Isabel do Ivaí, Paraná, onde foi relatado um surto de toxoplasmose aguda em humanos associado à contaminação da água. Neste estudo foram encontrados anticorpos anti-*T. gondii* em 84,4% (49/58) dos gatos domésticos investigados e obtidos isolados de 36 gatos soropositivos e um isolado de um gato soronegativo, este último provavelmente devido a uma infecção recente. A fim de analisar a distribuição do parasito em gatos foram realizados bioensaios em camundongos individualmente para cada tipo de tecido, sendo obtidos mais isolados a partir de músculo esquelético dos felinos, sugerindo que a densidade de *T. gondii* no músculo é maior que no encéfalo. A genotipagem do gene SAG2 revelou 15 isolados do tipo I e 23 isolados do tipo III (DUBEY et al., 2004)

Outro estudo determinou as características genéticas, pela técnica de PCR-RFLP *multilocus*, de 46 isolados de *T. gondii* provenientes de gatos do Estado de São Paulo, sendo revelada alta diversidade genética e detectados 20 genótipos recombinantes, entretanto

nenhum isolado foi caracterizado como linhagem clonal (PENA et al., 2008). No estudo citado, também foi analisado um banco de dados composto por 125 isolados de diferentes hospedeiros e localidades do Brasil, sendo identificados 48 genótipos, dentre os quais 26 oriundos de isolados únicos e quatro genótipos apresentaram múltiplos isolados. Os quatro genótipos encontrados com maior frequência foram considerados linhagens clonais no Brasil e denominados tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. Análise da virulência em camundongos indicou que o tipo BrI é altamente virulento, BrII não é virulento, enquanto que BrIII e BrIV possuem virulência intermediária.

Estudos genotípicos de *T. gondii* em gatos domésticos e ferais em diferentes regiões do mundo estão descritos no Quadro 2.

**Quadro 2** - Estudos de caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* em gatos domésticos e ferais no mundo.

Local	Hospedeiro	Genotipagem		Referência
		Técnica	Classificação	
Paraná, Brasil	Gato doméstico	PCR-RFLP (SAG2)	Tipo I; Tipo III	Dubey et al. (2004)
São Paulo, Brasil	Gato doméstico	PCR-RFLP (SAG2)	Tipo I; Tipo III; Recombinação I/III	Pena et al. (2006)
Colômbia	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i> (5 marcadores)	Tipo I; Tipo II; 3 genótipos recombinantes	Dubey et al. (2006)
China	Gato	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	2 genótipos recombinantes	Dubey et al. (2007a)
Ilha de Mona, Porto Rico	Gato feral	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	Tipo I; 6 genótipos recombinantes	Dubey et al. (2007b)
Ilha St. Kitts, Caribe	Gato feral	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	Tipo II; Tipo III; 2 genótipos recombinantes	Dubey et al. (2009d)
China	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	Genótipo recombinante (#3)	Zhou et al. (2009)
China	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i> (8 marcadores)	2 genótipos recombinante	Chen et al. (2011)
Pequim, China	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	1 genótipo recombinante (#9)	Qiang et al. (2012)
Colômbia	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	10 genótipos recombinantes (#10, #14, #18, #28, #38, #40, #61, #62, #101, #128)	Rajendran et al. (2012)
Etiópia	Gato feral	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	Tipo II; Tipo III; 2 genótipos recombinantes (#3, #20)	Dubey et al. (2013)
EUA - Área rural	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	Tipo II	Dubey et al. (2014)

Colima, México	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	Genótipo recombinante (#28)	Rico-Torres et al. (2015)
Portugal	Gato doméstico	Microsatélite	Tipo I; Tipo II; 1 genótipo recombinante	Vilares et al. (2014)
China	Gato doméstico	PCR-RFLP <i>multilocus</i>	#1, #2, #9, #17	Yang et al. (2015)

Estudos genotípicos com isolados provenientes do Arquipélago de Fernando de Noronha são escassos, sendo caracterizados até o momento apenas isolados de aves. Em um estudo genético com galinhas foi observada prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 84% (42/50) dos animais analisados e realizados bioensaios em camundongos a partir dos tecidos de 40 galinhas soropositivas, sendo obtidos 24 isolados não patogênicos para camundongos. Após análise pela PCR-RFLP *multilocus* foram caracterizados quatro novos genótipos recombinantes, além das linhagens clonais II e III (DUBEY et al., 2010). Outro estudo realizou a análise genotípica de dois isolados obtidos de garças-vaqueiras (*Bubulcus ibis*) da Ilha (VITALIANO et al., 2014). Ambos os estudos detectaram o genótipo #146, considerado atípico e não virulento.

É importante ressaltar que, até o presente momento, nenhum estudo relacionado a isolamento e caracterização genética de *T. gondii* foi realizado em felinos no Estado de Pernambuco.

### 3.9 Arquipélago de Fernando de Noronha

O Arquipélago de Fernando de Noronha, situado a 354 km da costa brasileira (03°45'-57'S, 032°19-41'W), é composto por uma ilha principal e outras 21 ilhas secundárias, abrangendo um território total de 26 km<sup>2</sup> (SCHULZ-NETO, 2004). A ilha principal, de mesmo nome, é a única área habitada do Arquipélago. Essas ilhas e ilhotas possuem origem vulcânica, nunca foram conectadas por terra ao continente sul-americano e todos os animais do Arquipélago colonizaram a ilha por via aérea ou marítima (CARLTON & OLSON, 1999). Duas estações definidas caracterizam o clima da região: seca, de agosto a janeiro, e chuvosa, de fevereiro a julho, com temperatura média de 27°C (IBAMA 1990).

O Arquipélago apresenta uma grande biodiversidade, sendo declarado, em 2001, Patrimônio Natural da Humanidade pela UNESCO, em virtude de ser um ecossistema insular oceânico, com águas ricas em nutrientes, que fornecem alimentos e possibilitam a reprodução de animais marinhos e por possuir grande concentração de aves marinhas tropicais do Atlântico. (UNESCO, 2001).

Devido à alta biodiversidade e endemismo, ações de conservação são indispensáveis para manutenção da fauna e flora e para o equilíbrio sistêmico (SERAFINI et al., 2010). O reconhecimento dessa importância ocorreu em 1988, por meio da instituição do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha (Parnamar-FN), gerenciado pelo Governo Federal, compreendendo cerca de 50% da ilha principal, as ilhas secundárias e a maior parte das águas adjacentes, com uma área total de 112,7 km<sup>2</sup>. O objetivo da criação deste Parque está relacionado à preservação dos ecossistemas marinhos e terrestres, fauna, flora e recursos naturais (IBAMA, 1990). O Arquipélago possui outra unidade de conservação, a Área de Proteção Ambiental de Fernando de Noronha (APA-FN), sob jurisdição do Governo do Estado de Pernambuco.

De acordo com o último censo realizado em 2010 foi contabilizada uma população de 3.000 habitantes e 848 animais domésticos, sendo 378 cães e 470 gatos (IBGE, 2010). Esses dados são superiores ao preconizado pelo Ministério da Saúde que indica que o número de animais domésticos não deve superar 10% da população local. Além disso, estima-se que a população de gatos refugiados nas matas em estado feral seja ainda superior à de domésticos.

O turismo na Ilha teve seu início na década de 70, entretanto, dados precisos sobre a entrada de visitante foram obtidos apenas em 1992, sendo contabilizados 10.094 turistas. Em 2002 foram recebidos 62.551 turistas, observando-se um aumento de 520% em 10 anos. Desde então, o Arquipélago é um grande atrativo turístico internacional, destacando-se o ecoturismo, e recebe mais de 50 mil visitantes por ano (ZANIRATO & TOMAZZONI, 2014).

#### **4 REFERÊNCIAS**

AJZENBERG, D.; BANULS, A.L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. v. 34, p. 1185-1196, 2004.

ARAÚJO, F.G. Immunization against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*. v. 10, p. 358-360, 1994.

BENNET, A.D.; GUNN-MOORE, D.A.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasmas and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 13, p. 553-557, 2011.

BEZERRA, R.A.; CARVALHO, F.S.; GUIMARÃES, L.A.; ROCHA, D.S.; MACIEL, B.M.; VENCESLAU, A.A.; LOPES, C.W.G.; ALBUQUERQUE, G.R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology*. v. 189, p. 153– 161, 2012.

BEZERRA, M.J.G.; CRUZ, J.A.L.; KUNG, E.S.; MELO, R.P.B.; GOMES, A.L.V.; MORAES, E.P.B.X.; PINHEIRO-JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 33, n. 8, p. 989-991, 2013a.

BEZERRA, M.J.G.; KIM, P.C.; MORAES, E.P.B.X.; SÁ, S.G.; ALBUQUERQUE, P.P.; SILVA, J.G.; ALVES, B.H.; MOTA, R.A. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transbound Emerg Dis.* v. 62, n. 4, p. 421-424, 2013b.

BEZERRA, M.J.G.; CRUZ, J.A.L.; KUNG, E.S.; SILVA, J.G.; SANTOS, A.S.; MORAES, E.P.B.X.; PINHEIRO-JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Occurrence of *Toxoplasma gondii* DNA in sheep naturally infected and slaughtered in abattoirs in Pernambuco, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. v.34, n.4, p. 329-331, 2014a.

BEZERRA, M.J.; CRUZ, J.A.; KUNG, E.S.; ALBUQUERQUE, P.P.; KIM, P.C.; MORAES, E.P.; PINHEIRO-JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in fresh and frozen semen from rams in Brazil. *Reprod Domest Anim.* v. 49, n. 5, p. 753-755. 2014b.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K.; MACEDO, Z.S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *Journal of Tropical Pediatrics.* v.43, p. 116, 1997.

BONHOMME, A.; PINGRET, L.; PINON, J. M. Review: *Toxoplasma gondii* cellular invasion. *Parassitologia.* v. 54, p. 31–43, 1992.

CAMOSSI, L.G.; GRECA-JUNIOR, H.; CORRÊA, A.P.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; SILVA, R.C.; DA SILVA, A.V.; LANHONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Vet Parasitol.* v. 177, n. 3-4, p. 256-261, 2011.

CARDIA, D.F.; CAMOSSI, L.G.; SILVEIRA NETO, L.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K.D.S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in cats from Brazil. *Veterinary Parasitology.* v. 197, p. 634– 637, 2013.

CARLTON, M.D.; OLSON, S.L. Amerigo Vespucci and the rat of Fernando de Noronha: a new genus and species of Rodentia (*Muridae: Sigmodontinae*) from a volcanic island off Brazil's continental shelf. *American Museum Novitates*. v. 3256, p. 1-59, 1999.

CAVALCANTE, A.C.R.; FERREIRA, A.M.; MELO, M.N.; FUX, B.; BRANDÃO, G.P.; VITOR, R.W.A. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Ruminant Research*. v.69, p. 79-82, 2007.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Toxoplasma gondii* life cycle. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>> - Acesso em: 06 de janeiro de 2016.

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

CHEN, Z.W.; GAO, J.M.; HUO, X.X.; WANG, L.; YU, L.; HALM-LAI, F.; XU, Y.H.; SONG, W.J.; HIDE, G.; SHEN, J.L.; LUN, Z.R. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China. *Veterinary Parasitology*. v. 183, p. 166-170, 2011.

CHIARI, C.A.; NEVES, D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 79, p. 337-340, 1984.

COSTA, D.G.C.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.S.A.; SANTANA, S.C.; MAGALHÃES, F.J.R.; LIMA FILHO, C.D.F.; RIBEIRO, V.O.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; DUBEY, J.P.; SILVA, J.C.R.. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *J. Parasitol.* v. 98, n. 3, p. 679-680, 2012.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, 220 pp, 1988.

DUBEY, J.P.; KOTULA, A.W.; SHARAR, A.; ANDREWS, C.D.; LINDSAY, D.S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. Parasitol.* v. 76, p. 201-204, 1990.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, J.P. *Parasitic Protozoa*. San Diego: Academic Press. v. 6, p. 1-158, 1993.

DUBEY, J.P. *Toxoplasmosis and Other Coccidial Infections*. In: SHERDING, R.G. *The Cat Diseases and Clinical Management*. New York: Churchill Livingstone, p. 565-605, 1994.

DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J. Parasitol.* v. 82, p. 957-960, 1996a.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Veterinary Parasitology*, v. 64, p. 65-70, 1996b.

DUBEY, J.P.; ROLLOR, E.A.; SMITH, L.; KWOWK. O.C.H.; THULLIEZ, P. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *J. Parasitol.* v. 83, p. 839-841, 1997.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis, Sarcocystosis, Isosporosis, and Cyclosporiasis. In: Palmer SR, Soulsby EJJ, Simpson DJH, editors. *Zoonoses*. Oxford: Oxford University Press. p. 579-597, 1998.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. *Veterinary Parasitology*. v. 77, p. 1-32, 1998.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 11, p. 267–299, 1998.

DUBEY, J.P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J. Parasitol.* v. 87, p. 215–219, 2001.

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

DUBEY, J.P.; SAVILLE, W.J.A.; STANEK, J.F.; REED, S.M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Domestic Cats From Rural Ohio. *J. Parasitol.* v. 88, n. 4, p. 802–803, 2002b.

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

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.H; VIANNA, M.C.B.; KWOW, O.C.H; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.;



LEHMANN. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution and biologic and genetic characterization of isolates. *Journal of Parasitology*. v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*. v. 140, p. 1–34, 2006.

DUBEY, J.P.; SU, C.; CORTES, J.A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J.E.; POLO, L.J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L.E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet. Parasitol.* v. 141, p. 42–47, 2006.

DUBEY, J.P.; ZHU, X.Q.; SUNDAR, N.; ZHANG, H.; KWOK, O.C.; SU, C. Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Vet. Parasitol.* v. 145, p. 352–356, 2007a.

DUBEY, J.P.; LÓPEZ-TORRES, H.Y.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.; AJZENBERG, D.; KWOK, O.C.; HILL, R.; DARDÉ, M.L.; SU, C. Mouse-virulent *Toxoplasma gondii* isolated from feral cats on Mona Island, Puerto Rico. *J.Parasitol.* v. 93, n. 6, p. 1365–1369, 2007b.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*. v. 38, p. 1257-1278, 2008.

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

DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. v. 39, p. 877–882, 2009a.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in sheep - The last 20 years. *Veterinary Parasitology*. v. 163, p. 1–14, 2009b.

DUBEY, J.P.; LAPPIN, M. R.; KWOK, O. C. H.; MOFYA, S.; CHIKWETO, A.; BAFFA, A.; DOHERTY, D; SHAKERI, J.; MACPHERSON, C. N. L; SHARMA, R. N. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and Concurrent *Bartonella* Spp., Feline Immunodeficiency Virus, and Feline Leukemia Virus Infections in Cats from Grenada, West Indies. *J. Parasitol.* v. 95, n.5, p. 1129–1133, 2009c.

DUBEY, J. P.; MOURA, L.; MAJUMDAR, D.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.;

KWOK, O. C. H.; KELLY, P. ; KRECEK, R.C.; SU. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. *Parasitology*. v. 136, p. 589–594, 2009d.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. CRC Press, Boca Raton. 2nd ed, 2010.

DUBEY, J.P., RAJENDRAN, C., COSTA, D.G.C., FERREIRA, L.R., KWOK, O.C.H., QU, D., SU, C., MARVULO, M.F.V., ALVES, L.C., MOTA, R.A., SILVA, J.C.R.. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected findings. *J. Parasitol.* v. 96, n. 4, p. 709-712, 2010.

DUBEY, J.P.; CHOUDHARY, S.; TILAHUN, G.; TIAO, N.; GEBREYES, W.A.; ZOU, X.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from Ethiopian feral cats. *Veterinary Parasitology*. v. 196, p. 206– 208, 2013.

DUBEY, J.P.; NESS, S.L.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S.; MITTEL, L.D.; DIVERS, T.J. Seropositivity of *Toxoplasma gondii* in domestic donkeys (*Equus asinus*) and isolation of *T. gondii* from farm cats. *Veterinary Parasitology*. v. 199, p. 18– 23, 2014.

ELBEZ-RUBENSTEIN, A. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J. Infect. Dis.* v. 199, p. 280–285, 2009.

ELMORE, S.A.; JONES, J.L.; CONRAD, P.A.; PATTON, S.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*. v. 26, n. 4, p.190-196, 2010.

ESTEVEZ, F.; AGUIAR, D.; ROSADO, J.; COSTA, M.L.; SOUSA, B.; ANTUNES, F.; MATOS, O. *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Veterinary Parasitology*. v. 200, p. 8– 12, 2014.

FIGUEROA DAMIAN, R. Risk of transmission of infectious diseases by transfusion. *Ginecología y Obstetricia de México*. v. 66, p. 277-283, 1998.

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

GYORKE, A.; OPSTEEGH, M.; MIRCEAN, V.; IOVU, A.; COZMA, V. *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*. v. 102, p. 321– 328, 2011.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlations of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCÍA-PÉREZ, A.L., Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.* v. 102, p. 17-27, 2001.

IBAMA. Plano de Manejo do Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha. Brasília: IBAMA/FUNATURA, 253 p., 1990.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico, 2010.

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

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

KNIEL, K.E.; LINDSAY, D.S.; SUMMER, S.S.; HACKNEY, C.R.; PIERSON, M.D.; DUBEY, J.P. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocyst on raspberries and blueberries. *J. Parasitol.* v. 88, p. 790-793, 2002.

KOTULA, A.W.; DUBEY, J.P.; SHARAR, A.K.; ANDREW, C.D.; SHEN, S.K.; LINDSAY, D.S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J. Food Protect.* v. 54, p. 687-690, 1991.

LEHMANN, T.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infectious, Genetics and Evolution.* v. 4, p. 107-114, 2004.

LEHMANN, T., MARCET, P.L., GRAHAM, D.H., DAHL, E.R., DUBEY, J.P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 103, p. 11423-11428, 2006.

LEVINE, N.D. *Veterinary Protozoology*. Ames, Iowa State University Press, EUA, 1985.

LIU, Q.X.; WANG, S.; WANG, L.Q.; XING, J.; GAO, W.J.; LIU, G.F.; ZHAO, B.; ZHANG, H.B.; GAO, L.H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dogs and cats in Zhenjiang City, Eastern China. *Asian Pac J Trop Biomed.* v. 4, n. 9, p. 725-728, 2014.

LOPES, A.P.; CARDOSO, L.; RODRIGUES, M. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats from northeastern Portugal. *Veterinary Parasitology*. v. 155, p. 184–189, 2008.

MACIEL, B.M.; MOURA, R.L.S.; CARVALHO, F.S.; COSTA, E.A.; ALBUQUERQUE, G.R. Identification and genetic characterization of a new Brazilian genotype of *Toxoplasma gondii* from sheep intended for human consumption. *Parasitology International*. v. 63, p. 567–570, 2014.

MALMASI, A.; MOSALLANEJAD, B.; MOHEBALI, M.; SHARIFIAN-FARD, M., TAHERI, M. Prevention of shedding and re-shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts in experimentally infected cats treated with oral clindamycin: a preliminary study. *Zoonoses and Public Health*. v. 56, p. 102–104, 2009.

MASALA, G.; PORCU, R.; MADAU, L.; TANDA, A.; IBBA, B.; SATTA, G.; TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology*. v. 117, p. 15–21, 2003.

MILLÁN, J.; CABEZO, O.; PABÓN, M.; DUBEY, J.P.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Veterinary Parasitology*. v. 165, p. 323–326, 2009.

MIRÓ, G.; MONTOYA, A.; JIMÉNEZ, S.; FRISUELOS, C.; MATEO, M.; FUENTES, I. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and intestinal parasites in stray, farm and household cats in Spain. *Veterinary Parasitology*. v. 126, p. 249–255, 2004.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, London, v. 363, n. 9425, p.1965-1976, 2004.

MORAES E.P.B.X.; FARIA E.B.; BATISTA A.M.; FREITAS A.C.; SILVA J.C.R.; ALBUQUERQUE P.P.F.; MOTA R.A. *Toxoplasma gondii* detection in the semen of naturally infected sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010.

MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WADA, M.Y.; JONES, J.L.; TUBOI, S.H.; CARMO, E.H.; RAMALHO, W.M.; CAMARGO, N.J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R.M.T.; SILVA, A.J.; MOURA, I.; DUBEY, J.P.; GARRET, D.O. Waterborne Toxoplasmosis, Brazil, from Field to Gene. *Emerging Infectious Diseases*. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid). v. 12, n. 2, February 2006.

MOURA, L.; KELLY, P.; KRECEK, R. C.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Cats From St. Kitts, West Indies. *J. Parasitol.*, v. 93, n. 4, p. 952–953, 2007.

MUNDAY, B.L. Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. Res. Vet. Sci. v. 13, p. 100-102, 1972.

MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. Southern Medical Journal. v. 93, p. 614-617, 2000.

NICOLLE MC, MANCEAUX L. On a new protozoan in *gundis* (*Toxoplasma* N. Gen). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v. 104, p. 1-3, 2009.

NUTTER F.B.; DUBEY, J.P.; LEVINE, J.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; FORD, R.B.; STOSKOPF, M.K. Seroprevalences of antibodies against *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* and fecal shedding of *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp, and *Toxocara cati* in feral and pet domestic cats. JAVMA. v. 229, n. 9, p. 1394–1398, 2004.

OPSTEEGH, M.; HAVEMANA, R.; SWART, A.N.; MENSINK-BEEREPOOT, M.E.; HOFHUIS, A.; LANGELAAR, M.F.M.; VAN DER GIESSEN, J.W.B. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. Preventive Veterinary Medicine. v. 104, p. 317– 326, 2012.

PENA, H.F.J., SOARES, R.M., AMAKU, M., DUBEY, J.P., GENNARI, S.M., *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res. Vet. Sci. v. 81, p. 58–67, 2006.

PENA, H.F.J., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., SU C. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol. v.38, p. 561-569, 2008.

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

QIANG, W.; WANG, H.; SU, C.; SHAN, D.; CUI, X.; YANG, N.; LV,C.; LIU, Q. Isolation and characterization of *Toxoplasma gondii* strains from stray cats revealed a single genotype in Beijing, China. Veterinary Parasitology. v. 187, 408– 413, 2012.

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

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

RENOULT, E.; GEORGES, E.; BIAVA, M.F.; HULIM, C.; FRIMAT, L.; KESSLER, K. Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: reports of six cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, v. 24, n. 4, p. 625-634, 1997.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem das Américas e da África. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 731p., 1991.

RICO-TORRES, C.P.; VIENTO-CAMACHO, A.D.; CABALLERO-ORTEGA, H.; BESNÉ-MÉRIDA, A.; LUNA-PASTÉN, H.; CORREA, D.; PALMA-GARCÍA, J.M. First isolation of *Toxoplasma gondii* from cats of Colima, Mexico: Tissue distribution and genetic characterization. *Veterinary Parasitology*. v. 209, p. 125–128, 2015.

RUIZ, A.; FRENKEL, J.K. Intermediate and transports host of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *American Journal of Tropical and Hygiene*. v. 29, p. 1161-1166, 1980.

SALANT, H.; SPIRA, D.T.; HAMBURGER, J. A Comparative Analysis of Coprologic Diagnostic Methods for Detection of *Toxoplasma gondii* in Cats. *Am J Trop Med Hyg*. v. 82, n. 5, p. 865–870, 2010.

SANTOS, F.F.; NASCIMENTO, H.; MUCCIOLI, C.; COSTA, D.F.; RIZZO, L.V.; COMMODARO, A.G.; BELFORT-JUNIOR, R. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in peripheral blood and aqueous humor of patients with Toxoplasmic active focal necrotizing retinochoroiditis using real-time PCR. *Arq. Bras. Oftalmol*. v.78, n.6, 2015.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F. J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p.1525-1537, 2005.

SACKS, J.J; ROBERTO, R.R.; BROOKS, N.F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *Journal American Medical Association*, v. 248, p. 1728-1732, 1982.

SAMICO-FERNANDES, E.F.T.; MELO, R.P.B.; KIM, P.C.P.; ALMEIDA, J.C.; BARROS, L.D.; GARCIA, J.L.; SILVA, J.C.R.; MOTA, R.A. First report of genotype #65 of *Toxoplasma gondii* in pigs. *Parasitol Res*. v. 114, p. 3927–3930, 2015.

SCHULZ-NETO, A.. Aves insulares do arquipélago de Fernando de Noronha. p. 147- 168 in Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação (Organizado por Joaquim Olinto Branco). Editora da UNIVALI, Itajaí, SC. 2004.

SERAFINI, T. Z.; FRANÇA, G. B.; ANDRIGUETTO-FILHO, J. M. Ilhas oceânicas brasileiras: biodiversidade conhecida e sua relação com o histórico de uso e ocupação humana. *Revista da Gestão Costeira Integrada*. v. 10, n. 3, p. 281-301, 2010.

SILVA, J.C.R.; GENNARI, S.M.; RAGOZO, A.M.A.; AMAJONES, V.R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L.E.O.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Sera of Domestic Cats From Guarulhos and São Paulo, Brazil. *J. Parasitol.*, v. 88, n. 2, 2002, p. 419–420, 2002.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*, v.27, p.1135-1145, 1997.

SPLENDORE, A. On a new protozoan parasite of rabbits. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p.1-2, 2009.

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

SU, C.; SHWAB, E.K.; ZHOU, P.; ZHU, X.Q.; DUBEY, J.P. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* v. 137, p. 1-11, 2010.

SUKHUMAVASI, W.; BELLOSA, M.L.; LUCIO-FORSTER, A.; LIOTTA, J.L.; LEE, A.C.Y.; PORNMINGMAS, P.; CHUNGPIVAT, S.; MOHAMMED, H.O.; LORENTZEN, L.; DUBEY, J.O.; BOWMAN, D.D. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, *Dirofilaria immitis*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) infections in pet cats in Bangkok and vicinities, Thailand. *Veterinary Parasitology*. v. 188, p. 25– 30, 2012.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to human. *Int. J. Parasitol.* v. 30, p. 1217-1258, 2000.

UNESCO, World Heritage Centre. Decision - 25COM X.A - Brazilian Atlantic Islands: Fernando de Noronha and Atol das Rocas Reserves (Brazil), 2001. Disponível em: <<http://whc.unesco.org/en/decisions/2319>>. Acesso em 02 de fevereiro de 2016.

VILARES, A.; GARGATÉA, M.J.; FERREIRA, I.; MARTINS, S.; JÚLIO, C.; WAAPC, H.; ÂNGELO, H.; GOMES, J.P. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from pigeons and stray cats in Lisbon, Portugal. *Veterinary Parasitology* 205, 506–511, 2014.

VITALIANO, S.N.; SOARES, H.S.; MINERVINO, A.H.H.; SANTOS, A.L.Q.; WERTHER, K.; MARVULO, M.F.V.; SIQUEIRA, D.B.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. v. 3, p. 276–283, 2014.

VOLLAIRE, M.R.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 66, 874–877, 2005.

WALLACE, G.D. Serologic and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific Atolls. *Am. J. Epidemiol.* v. 90, p. 103–111, 1969.

WAAP, H.; CARDOSO, R.; LEITÃO, A.; NUNES, T.; VILARES, A. GARGATÉ, M.J.; MEIRELES, J.; CORTES, H.; ÂNGELO, H. In vitro isolation and seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in stray cats and pigeons in Lisbon, Portugal. *Veterinary Parasitology*. v. 187, p. 542–547, 2012.

YANG, Y.; YING, Y.; VERMA, S.K.; CASSINELLI, A.B.M.; KWOK, O.C.H.; LIANG, H.; PRADHAN, A.K.; ZHU, X.Q.; SU, C.; DUBEY, J.P. Isolation and genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* from tissues and feces of cats from the central region of China. *Veterinary Parasitology*. v. 211, p. 283–288, 2015.

ZANIRATO, S.H.; TOMAZZONI, E.L. A sustentabilidade do turismo em Fernando de Noronha (PE-BRASIL). *Revista Turydes: Turismo y Desarrollo*, n. 17, 2014. Disponível em: <<http://www.eumed.net/rev/turydes/17/noronha.html>> - Acesso em: 20 de fevHKN Vereiro de 2016.

ZHOU, P.; ZHANG, H.; LIN, R.Q.; ZHANG, D.L.; SONG, H.Q.; SU, C.; ZHU, X.Q. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitol. Int.* v. 58, p. 193–195, 2009.



## **5 ARTIGO**

### ***Atypical Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil**

(Artigo aceito para publicação como *Short Communication* no Periódico *Veterinary  
Parasitology*)

**Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil.**

R.P.B. Melo<sup>a</sup>, J.C. Almeida<sup>a</sup>, D.C.V. Lima<sup>a</sup>, C.M. Pedrosa<sup>a</sup>, F.J.R. Magalhães<sup>a</sup>, A.M. Alcântara<sup>a</sup>, L.D. Barros<sup>b</sup>, R.F.C. Vieira<sup>c</sup>, J.L. Garcia<sup>b</sup>; R.A. Mota<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>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.

<sup>b</sup>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.

<sup>c</sup>Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Zoonosis and Molecular Epidemiology, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, 80035-050, Curitiba, PR, Brazil.

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

**Abstract**

*Toxoplasma gondii* isolates from Brazil have a different phenotypic and genotypic pattern, with predominance of virulent isolates and recombinant genotypes, compared to the North Hemisphere. Considering that a new *T. gondii* genotype, non-pathogenic to mice, was previously identified from free-range chickens from the Fernando de Noronha Island, Brazil, this study aimed to identify genotypes of this parasite in tissue samples of feral cats (*Felis catus*) from this Brazilian Island. Anti-*T. gondii* IgG antibodies were detected in 18/31 (58%)

feral cats. Two non-virulent *T. gondii* isolates were obtained by mouse bioassay. Genotyping was performed by PCR-RFLP using 10 genetic markers (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1, L358 and Apico) and an atypical strain of *T. gondii* (ToxoDB #146) was identified. This is the first report of this genotype in feral cats.

**Keywords:** Brazil, *Felis catus*; Genotyping, Mouse bioassay; Toxoplasmosis

## 1. Introduction

Toxoplasmosis is a zoonotic disease, caused by the obligate intracellular coccidian parasite, tissue cyst forming, *Toxoplasma gondii* and represents an important public health burden worldwide. Felids are important in the disease epidemiology since they may shed oocysts in the environment (Dubey, 2010). It has been established that the phenotypic and genotypic profile of *T. gondii* isolates from Brazil differ from other countries; while in the North Hemisphere the clonal lineages (Type I, II, III) are more prevalent, atypical strains predominate in Brazil (Lehmann et al., 2006; Pena et al., 2008). However, *T. gondii* isolates from chickens from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil, consist of unique genotypes as well as clonal genotypes that are dominant in Europe and North America (Dubey et al., 2010).

Considering that, domestic and wild animals from the Fernando de Noronha Island have showed highly prevalent to anti-*T. gondii* antibodies (Dubey et al., 2010; Costa et al., 2012), and that *T. gondii* isolates from the local definitive host have never been obtained, this study aimed to identify *T. gondii* genotypes in tissues samples of feral cats (*Felis catus*) from this Brazilian Island.

## 2. Materials and methods

The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and Animal Welfare at Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (protocol number 104/2015) and was conducted according to the ethical principles of animal experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

## **2.1 Area**

Fernando de Noronha Archipelago (03°45'-57'S, 032°19-41'W) is a special municipality of Pernambuco State, northeastern Brazil, located in the Atlantic Ocean 354 km offshore from the Brazilian coast. The area is composed of a main island and 21 islets of volcanic origin, covering a total area of 26 km<sup>2</sup> (Schulz-Neto, 2004).

The region presents a tropical climate with two well-defined seasons of rainfall, with an average temperature of 28 °C (INMET, 2015). Due to the wide biodiversity and protection programs for endangered species, UNESCO has declared the Archipelago as a World Heritage Site.

## **2.2 Study design and sampling**

A cross-sectional study was performed during a one-year period. The Center of Animal Surveillance of the Island captured weak feral cats from different locations of the island. Blood samples were taken from 31 feral cats under specific chemical restraint (ketamine hydrochloride 10% and xylazine hydrochloride 1%). All samples were collected in tubes without anti-coagulant and kept at room temperature (25 °C) until visible clot retraction, centrifuged at 500 g for 10 min, and the serum was separated and kept at -20 °C until processing.

During the necropsy fragments of brain, heart, lung, diaphragm, and liver were collected, stored at +4 °C, and subsequently forwarded to analysis within 24 h. Eleven

samples could not be sent within 24 h, become inappropriate to be submitted to mouse bioassay. Thus, these samples were frozen at -20 °C and subsequently subjected to PCR.

### **2.3 Indirect immunofluorescent assay (IFA) and mouse bioassay**

Feral cat serum samples (n = 31) were evaluated by indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies, as previously described (Camargo, 1974). Tissue samples from animals with an antibody titer  $\geq 16$  were submitted to the pepsin digestion method (Dubey, 1998). Two Swiss Webster (SW) mice (25-30 g) were inoculated subcutaneously with 1 mL of the final product. Mice were observed daily for 45 days and euthanized.

Mouse blood and tissue samples (brain, heart, lungs and liver) were collected. The blood was centrifuged at 500 g for 10 min, and the serum was separated and kept at -20 °C until processing. Mouse serum samples were evaluated by IFA (cut-off 1:16) for the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies, as previously described (Camargo, 1974). Imprints of the brain and lungs were examined for *T. gondii* cysts and tachyzoites, respectively.

### **2.4 DNA extraction and PCR**

The pooled tissues (heart, lungs and liver) and the brain of the mice were subjected to DNA extraction using a commercial kit (Wizard SV Genomic DNA Purification System, Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's protocol. Different fragments of tissue samples from 11 feral cats that could not be shipped in time for bioassay were individually submitted to DNA extraction, after the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies by IFA.

For detection of *T. gondii* DNA single tube nested PCR was performed using two pairs of previously described primers and PCR protocols able to amplify a region of 227 bp of the

ITS1 region of the parasite (Hurtado et al., 2001). A suspension of *T. gondii* tachyzoites (ME49 strain,  $10^4$  tachyzoites/mL) and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively. The amplified PCR products were subjected to gel electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with BlueGreen (LGC<sup>®</sup> Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil), and visualized under UV light.

## **2.5 Multilocus PCR-RFLP and phylogenetic analysis**

Genotyping was performed by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using 10 molecular markers (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 and Apico) as previously described by Su et al. (2010). All products were visualized by agarose gel electrophoresis at 2.5%, stained with Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, USA) and visualized using Safe Imager TM (Invitrogen®, USA). The results were identified, compared, and classified according to genotypes present in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>).

For phylogenetic analysis, the electrophoresis banding patterns (genotypic data of restriction polymorphism) obtained by PCR-RFLP were transformed into binary data and tabulated. The SplitsTree software (Huson & Bryant, 2006) was used for phylogenetic reconstruction between the genotype obtained in the present study and others previously isolated in Brazil and in the world.

## **3. Results**

Anti-*T. gondii* antibodies were found in 18/31 (58%) feral cats. Antibody titers ranged from 16 to 256, with frequency of 33.3% (6/18) for 16, 11.1% (2/18) for 64, 22.2% (4/18) for 128, 33.3% (6/18) for 256.

From 18 seropositive cats, seven mouse bioassays were performed and two *T. gondii* isolates were obtained (isolation rate of 28.5%). The parasite was isolated from two cats with anti-*T. gondii* antibody titer of 256 (Table 1). All mice inoculated with feral cats tissues remained asymptomatic. Positive mice in isolation had titer of 1:256 and the brain and pooled tissues were positive for *T. gondii* by PCR. The two isolates obtained by mouse bioassay were designated as TgCatBrPE01 and TgCatBrPE02.

Tissue samples from 11 cats that could not be sent < 24h were submitted only to PCR. Tissue samples from two feral cats were positive by PCR (Table 2) and nine were negative.

Strain typing with multilocus PCR-RFLP markers revealed the genotype ToxoDB #146, an atypical strain that was different from all genotypes so far reported in cats worldwide.

#### **4. Discussion**

In the present study, *T. gondii* genotype ToxoDB #146 was isolated from feral cats tissues. This genotype was already isolated from free-range chickens and cattle egret (*Bubulcus ibis*) from the Fernando de Noronha Island (Dubey et al., 2010b; Vitaliano et al., 2014). Until the present moment, this atypical genotype was solely found on this Brazilian Island. Genotype #146 have been considered non-pathogenic for mice. Previous studies have found that most isolates from Brazilian mainland are virulent for mouse (Dubey et al., 2007; Pena et al., 2008; Dubey et al., 2012). Further studies should be conducted in order to establish whether this strain may be pathogenic for other animal species.

The phylogenetic networks displayed in Figure 1 show that the genotype isolated in the present study is close to genotype BrII, which have been isolated from cats and dogs in other Brazilian regions, however, the genotype #146 is not close to clonal genotypes, which corroborates with previously studies that show a high genetic diversity of *T. gondii* in Brazil.

In a study on domestic cats in Brazil, Pena et al. (2006) observed that the successful isolation is directly related to the titer of antibodies found in animals; an increase of the isolation rate was observed in cats with high titers. In the present study, the two isolates were obtained from cats with an antibody titer of 256.

Seroepidemiological studies conducted on isolated islands in the Pacific Ocean (Wallace, 1969), Australia (Munday, 1972) and United States (Dubey et al., 1997) showed absence of *T. gondii* in regions without cats, highlighting the importance of these animals in the natural transmission of this parasite (Dubey, 2009). In the Caribbean islands, serological studies have shown high prevalence of antibodies anti-*T. gondii* in small ruminants (Chikweto et al., 2011; Hamilton et al., 2014) and in domestic and feral cats, indicating environmental contamination with oocysts eliminated with the feces of the definitive hosts (Moura et al., 2007).

The last census conducted in Fernando de Noronha Island described a population of 848 domestic animals, of which 470 were domestic cats. This population of domestic cats is much higher than expected for a population about three thousand inhabitants (IBGE, 2010), and is estimated that feral cat population is even higher than domestic cats.

Previous serological study revealed the presence of antibodies anti-*T. gondii* in several species of Fernando de Noronha, with high prevalence and wide distribution of the disease, showing an endemic profile on the Island (Costa et al., 2012). Infection in cats is directly related to the population of avian and rodents, which serve as food and infection source for the cats (Dubey, 2004). In these species were described high prevalences of antibodies anti-*T. gondii*: 38.2% (13/34 - Modified Agglutination Test - MAT) in black rat (*Rattus norvegicus*) and 80% (80/100 - MAT) in chickens. Regarding to other animal species, the prevalence reported was 38.7% (12/31 - IFA) in dogs and 60.8% (59/97 - IFA) in sheep. Analyzing sera from feral and domestic cats by MAT and IFA techniques was observed prevalence of 59.3%



(70/118), and when considered only the feral cats, 66.6% (32/48) were seropositive and the most of them had high titer (500 - MAT) (Costa et al., 2012).

During our study were reported abortion cases in women from this Island, but without conclusive diagnosis about the cause. However, a possible infection by *T. gondii* should be investigated, considering the high prevalence of the parasite on the Island and the findings of this research.

In conclusion, this is the first report of genotype ToxoDB #146 in feral cats. Studies on genetic characterization of *T. gondii* in other animal species and humans must be considered to better understand the epidemiology of toxoplasmosis in this Island and the impact on animal, environmental and public health.

#### **Conflict of interest statement**

The authors declare no conflicts of interest.

#### **Acknowledgement**

This study was supported by *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE - APQ-0531-5.05/14). We thank Dr. Luis Miguel Ortega Mora, coordinator of Rede Protozoovac (CYTED) for his valuable support on molecular methods.

#### **References**

Camargo, M.E., 1964. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6, pp. 117-118.

Chikweto, A., Kumthekar, S., Tiwari, K., Nyack, B., Deokar, M.S., Stratton, G., Macpherson, C.N., Sharma, R.N., Dubey, J.P., 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs, sheep, goats and cattle from Grenada and Carriacou, West Indies. *J. Parasitol.* 97, 950-951.

Costa, D.G.C., Marvulo, M.F.V., Silva, J.S.A., Santana, S.C., Magalhães, F.J.R., Lima Filho, C.D.F., Ribeiro, V.O., Alves, L.C., Mota, R.A., Dubey, J.P., Silva, J.C.R., 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *J. Parasitol.* 98 (3), 679-680.

Dubey, J.P., Rollor, E.A., Smith, L. Kwok. O.C.H., Thulliez, P., 1997. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *J. Parasitol.* 83, 839-841.

Dubey, J.P., 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet. Parasitol.* 74, 75-77.

Dubey, J.P., 2004. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126 (1-2), 57-72.

Dubey, J.P., Applewhite, L., Sundar, N., Vermurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C.H., Hill, R., Su, C., 2007. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chicken from Guyana, South America identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitol.* 134, 1-7.

Dubey, J.P., 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology.* 39, 877-882.

Dubey, J. P., 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-313.

Dubey, J.P., Rajendran, C., Costa, D.G.C., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Qu, D., Su, C., Marvulo, M.F.V., Alves, L.C., Mota, R.A., Silva, J.C.R., 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected findings. *J. Parasitol.* 96 (4), 709-712.

- Dubey, J.P., Lago, E.G., Gennari, S.M., Su, C., Jones, L., 2012. Toxoplasmosis in human and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitol.* 139, 1375-1424.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico, 2010.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. [cited May 2015]. Available from: [http://www.inmet.gov.br/html/prev\\_tempo.php](http://www.inmet.gov.br/html/prev_tempo.php)
- Hamilton, C.M.; Katzer, F.; Innes, E.A.; Kelly, P.J., 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in small ruminants from four Caribbean islands. *Parasites & Vectors.* 7, 449.
- 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.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology Evolution.* 23, 254-267.
- Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P., 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11423–11428.
- Moura, L., Kelly, P., Krecek, R.C., Dubey, J.P., 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from St. Kitts, West Indies. *J. Parasitol.* 93 (4), 952-953.
- Munday, B.L., 1972. Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. *Res. Vet. Sci.* 13, 100-102.
- Pena, H.F.J., Soares, R.M., Amaku, M., Dubey, J.P., Gennari, S.M., 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res. Vet. Sci.* 81, 56-67.
- 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.

Schulz-Neto, A., 2004. Aves insulares do arquipélago de Fernando de Noronha. p. 147-168 *in* Aves marinhas e insulares brasileiras: bioecologia e conservação (Organizado por Joaquim Olinto Branco). Editora da UNIVALI, Itajaí, SC.

Su, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. 137, 1-11.

Vitaliano, S.N., Soares, H.S., Minervino, A.H.H., Santos, A.L.Q., Werther, K., Marvulo, M.F.V., Siqueira, D.B., Pena, H.F.J., Soares, R.M., Su, C., Gennari, S.M., 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 3, 276–283.

Wallace, G.D., 1969. Serologic and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific Atolls. Am. J. Epidemiol. 90, 103-111.

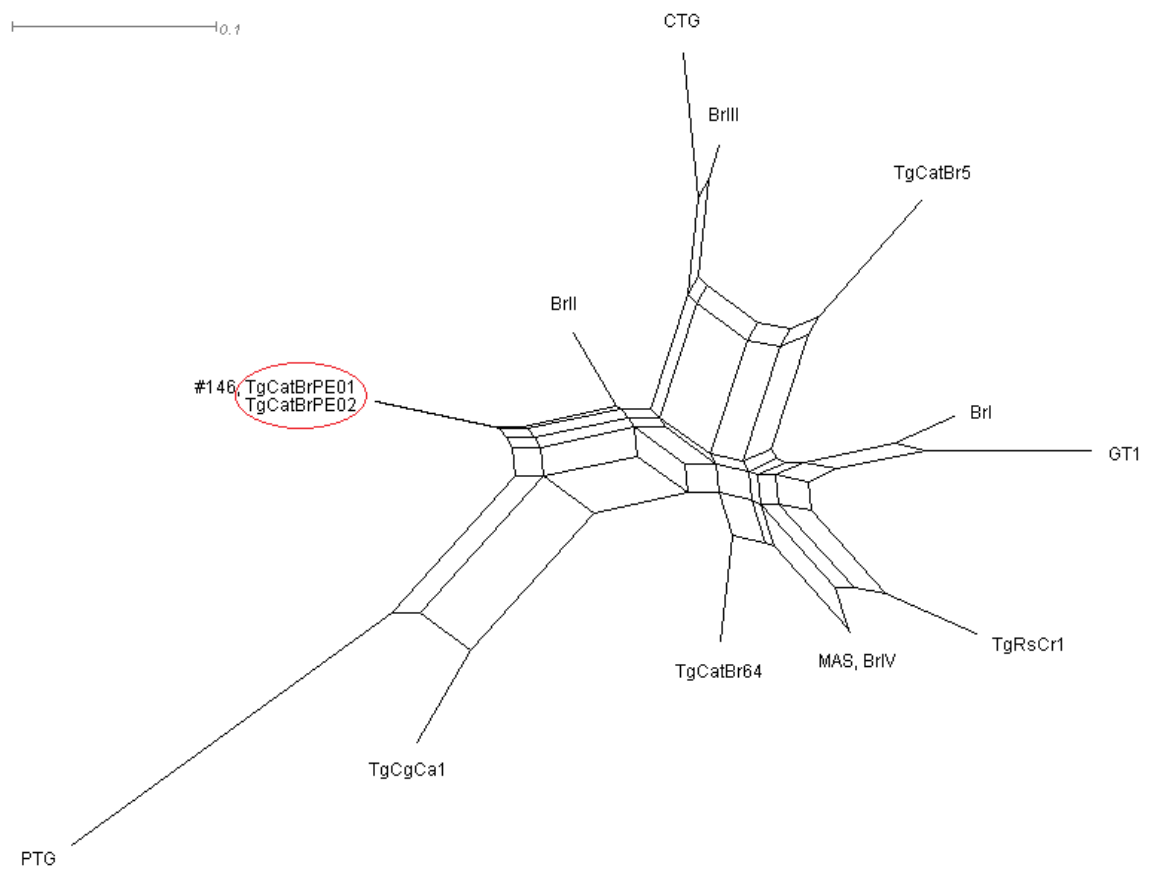
**Table I. Anti-*T. gondii* IgG antibodies titers by Immunofluorescence Antibody Assay (IFA) in feral cats from Fernando de Noronha Island, Brazil, and result of mouse bioassay.**

<b>Sample</b>	<b>IgG antibodies titers</b>	<b>Mouse bioassay</b>
Feline 11	16	Negative
Feline 21	16	Negative
Feline 32	256	Negative
Feline 42	64	Negative
Feline 52	256	Negative
Feline 62	256	Positive
Feline 92	256	Positive

**Table II. Molecular detection of *T. gondii* DNA (ITS1 region) in tissue sample of feral cats from Fernando de Noronha Island, Brazil.**

<b>Sample</b>	<b>Tissue</b>	<b>PCR Result</b>	<b>Genotyping</b>
G01	Brain	Negative	-
	Heart	Positive	Not performed*
	Diaphragm	Positive	#146
F252	Brain	Positive	Not performed*
	Heart	Positive	Not performed*
	Diaphragm	Positive	Not performed*

\*DNA quantity lower than necessary



**Figure 1. Phylogenetic analysis of the *Toxoplasma gondii* isolates obtained (red circle), with the following strains used as references: RH, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, TgRsCr1, BrI, BrII, BrIII, BrIV**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no estudo indicam que a infecção por *Toxoplasma gondii* está presente em gatos ferais do Arquipélago de Fernando de Noronha ao comprovar a presença de anticorpos e a viabilidade do protozoário no tecido desses felinos. Devido à importância dos felídeos na cadeia epidemiológica da toxoplasmose, este fato deve alertar para a contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, o que representa uma fonte de infecção para a população local e um risco para a saúde pública e animal. Desta forma, medidas de controle baseadas na educação sanitária devem ser reforçadas para prevenir a infecção dos felinos e reduzir as fontes de infecção para outros hospedeiros intermediários, sobretudo para a população humana desta Ilha.

Estudos de caracterização fenotípica e genética de isolados de *T. gondii* em outras espécies animais e humanos devem ser considerados para melhor entendimento da epidemiologia da toxoplasmose na Ilha de Fernando de Noronha e o impacto na saúde animal, ambiental e pública.

Em virtude da ocorrência de casos de aborto em mulheres residentes da Ilha e pela destacada importância desta zoonose para a saúde pública, sugere-se a realização de estudos para a associação de isolados de animais e humanos da região. Além disso, estudar as características biológicas dos isolados obtidos neste trabalho devem ser realizados a fim de adquirir mais informações sobre o perfil fenotípico de *T. gondii* em Pernambuco.