



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização genética e biológica de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de animais e humano na região Nordeste do Brasil

RENATA PIMENTEL BANDEIRA DE MELO

RECIFE

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização genética e biológica de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de animais e humano na região Nordeste do Brasil

RENATA PIMENTEL BANDEIRA DE MELO

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

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M528c Melo, Renata Pimentel Bandeira
 Caracterização genética e biológica de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de animais e humano na região Nordeste do Brasil / Renata Pimentel Bandeira Melo. - 2019.
 75 f. : il.
- Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
 Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, 2019.
1. Apicomplexa. 2. Genotipagem. 3. Isolamento. 4. Toxoplasmose congênita. 5. Virulência. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Título

CDD 636.089

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor 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

Aprovada em 16 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

Prof^ª. Dr^ª. Flaviana Santos Wanderley
Núcleo de Ciências Biológicas (NUCIB/UNCISAL)

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS/UFAL)

Prof^ª. Dr^ª. Érika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti
Departamento de Medicina Veterinária (DMV/UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Lúcia e Daniel, meus maiores incentivadores, que nunca mediram esforços para nos proporcionar oportunidades. Obrigada pela educação, pelo apoio e amor incondicionais. À minha irmã Clarissa, pela melhor amizade, cumplicidade e parceria. 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 Laka, nossa louca Labralata. Obrigada pelo carinho e companheirismo ao longo da escrita desta tese, 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, Prof^a. Érika Samico, Prof. José Wilton, Prof. Jonatas Campos, Prof^a Flaviana Wanderley, Prof. Müller Ribeiro, 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 depositadas 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 dos Animais Domésticos, pela amizade, ajuda, convivência e aprendizado diários, nossas realizações não seriam possíveis sem vocês. Aos amigos que ajudaram diretamente na execução destes projetos de pesquisa, pela disponibilidade nas coletas, necropsias, bioensaios e afins. Em especial, agradeço a Fernando Magalhães e Eduardo Guelfer, pelo auxílio na coleta e envio de amostras biológicas da Ilha de Fernando de Noronha; a Prof^a. Flaviana Wanderley e Prof. Wagner Porto, pela parceria na realização do estudo de toxoplasmose congênita. A Pedro Paulo Feitosa e Mariana Lumack pela realização da necropsia dos saguis. Aos meus primeiros e eternos Pibics Jéssica Crasto e Renato Amorim, pela dedicação e troca de conhecimentos.

À Sandra e Cleide, pela organização do nosso departamento.

Às amigas Marcela Amorim e Pomy Kim, obrigada pela amizade, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, em especial ao coordenador Prof. José Wilton Pinheiro Junior e à secretária Taciana Albuquerque pela dedicação.

A toda a equipe do grupo de pesquisa *Protozoology* do *Moredun Research Institute*, em especial ao Dr. Frank Katzer e Dra. Clare Hamilton, pelo acolhimento e orientações científicas durante o doutorado sanduíche.

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.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

Agradeço à mãe do recém-nascido pela colaboração no projeto, por meio do termo de consentimento livre e esclarecido, e pela significativa contribuição científica.

Aos animais necessários ao desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Obrigada a todos que contribuíram para esta realização.

FONTES FINANCIADORAS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE): financiamento do projeto de pesquisa (APQ-0531-5.05/14) e concessão de bolsa de doutorado (IBPG-1358-5.05./15).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Concessão de bolsa de doutorado sanduíche no exterior (SWE - 206740/2017-4) para desenvolvimento de parte do projeto de pesquisa em *Moredun Research Institute* (MRI), Escócia.

SUMÁRIO

I LISTA DE FIGURAS	8
II LISTA DE TABELAS.....	9
III LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLO	10
IV RESUMO	11
V ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Subfilo Apicomplexa.....	15
2.2 Histórico.....	15
2.3 Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.4 Formas de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2.5 Toxoplasmose em diferentes hospedeiros	20
2.6 Diagnóstico da Toxoplasmose	23
2.7 Epidemiologia molecular de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
2.8 Atuação das proteínas róprias na virulência de <i>T. gondii</i>	28
2.9 Toxoplasmose na Saúde Pública.....	30
2.10 Arquipélago de Fernando de Noronha.....	32
3 REFERÊNCIAS	34
4 OBJETIVOS.....	51
5 CAPÍTULO 1.....	52
6 CAPÍTULO 2.....	57
7 CAPÍTULO 3.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* **17**

Figura 2 - Formas infectantes de *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítos. (B) Cisto tecidual contendo bradizoítos. (C) Oocisto esporulado **18**

Capítulo 1

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates TgShBrFN1 and TgPgBrFN1 characterized by RFLP-PCR, with the following strains used as references: RH, ME49, CTG, BrI, BrII, BrIII, BrIV, MAS, Cougar, TgCatBr5, TgCatBr64, TgCkBr220, TgPigBrPE01, TgCeFBR1, TgGtBr10, TgCatBrFN1 **56**

Capítulo 2

Figure 1 NeighborNet phylogenetic network of *Toxoplasma gondii* isolate TgCTBrAL1 characterized by RFLP-PCR, with the following strains used as references: RH, ME49, CTG, BrI, BrII, BrIII, BrIV, MAS, Cougar, TgCatBr5, TgCatBr64, TgCTBr04, TgCTBr07, TgCTBr12, TgCTBr15, TgCTBr18, TgCTBrv, TgCTBraI, TgCTBrac, TgCkBr222, TgPgBrPE01, TgCeFBr1, CT180, At704 **63**

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Estudos de caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* em animais domésticos e selvagens da Ilha de Fernando de Noronha, Brasil 27

Tabela 2 - Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais domésticos e selvagens da Ilha de Fernando de Noronha, Brasil 34

Capítulo 1

Table 1 *In vivo* virulence analysis of *Toxoplasma gondii* isolates TgShBrFN1 and TgPgBrFN1 obtained from a sheep and a pig on Fernando de Noronha Island, Brazil 56

Capítulo 2

Table 1. Results of *in vivo* virulence of *Toxoplasma gondii* isolate TgCTBrAL1 obtained from newborn with congenital toxoplasmosis in Alagoas state, northeastern of Brazil 65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLO

°C	Grau Celsius
APA - FN	Área de Proteção Ambiental de Fernando de Noronha
d.p.i.	Dias pós inoculação
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IFN- γ	Interferon gama
IRGs	GTPases relacionadas à imunidade
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
MAT	Teste de Aglutinação Modificado
Parnamar-FN	Parque Nacional Marinho de Fernando de Noronha
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ROP	Proteína rópria
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura
VP	Vacúolo parasitóforo

RESUMO

Toxoplasma gondii é um coccídio intracelular obrigatório, formador de cistos teciduais, causador da toxoplasmose, doença zoonótica de grande impacto à Saúde Pública. Foram realizados três estudos, divididos em capítulos que abordam a infecção por *T. gondii* em humano, animais de produção e silvestre. O primeiro estudo teve como objetivo isolar e caracterizar cepas de *T. gondii* obtidas de tecidos de animais de produção abatidos para consumo humano no Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco. Foram obtidos dois isolados de *T. gondii*, sendo um de ovino e um de suíno e ambos foram caracterizados como genótipo ToxoDB #146, descrevendo-se o primeiro relato deste genótipo nestas espécies no mundo. Os isolados apresentaram perfil diferente para virulência fenotípica e molecular. O segundo estudo teve como objetivo relatar um caso de toxoplasmose congênita severa envolvendo o genótipo atípico ToxoDB #162, isolado a partir de sangue do cordão umbilical de recém-nascido em Alagoas. O resultado da genotipagem dos genes ROP5 e ROP18 foi compatível com o perfil de elevada virulência do isolado em camundongo. O terceiro estudo teve como objetivo identificar protozoários do subfilo Apicomplexa em tecido cardíaco de 39 saguis (*Callithrix jacchus*) de Pernambuco por meio do sequenciamento de fragmento do gene 18S rDNA onde foi detectado o DNA de *T. gondii* em sete animais (7/39 - 17,9%). Os resultados obtidos neste estudo contribuem com importantes informações biológicas e genéticas sobre *T. gondii* em animais e humano nos estados de Alagoas e Pernambuco.

Palavras-chave: Apicomplexa; Genotipagem; Isolamento; Toxoplasmose congênita; Virulência.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular coccidian, tissue cyst forming, which causes toxoplasmosis, zoonotic disease of great impact in public health. Three studies were conducted and divided into chapters, which address *T. gondii* infection in human, farm and wild animals. The first study aimed to isolate and characterize *T. gondii* strains from tissues of farm animals slaughtered for human consumption on Fernando de Noronha Archipelago, Pernambuco. Two *T. gondii* isolates were obtained, one from sheep and one from pig, both isolates were characterized as genotype ToxoDB #146. This is the first report of this genotype in pig and sheep worldwide. The isolates showed different phenotypic and molecular profiles. The second study reported a case of severe congenital toxoplasmosis in newborn baby from Alagoas, that involved the atypical genotype ToxoDB #162, isolated from umbilical cord blood. Genotype result of ROP5 and ROP18 genes could predict the high virulence of the isolate in mice. The third study investigated the presence of apicomplexan protozoans in heart tissue from 39 common marmoset (*Callithrix jacchus*) from Pernambuco by sequencing a fragment of 18S rDNA gene, by which *T. gondii* DNA was detected in seven animals (7/39 - 17,9%). Results obtained in the present study contribute to biological and genetic information of *T. gondii* in animals and human from Alagoas and Pernambuco state.

Keywords: Apicomplexa; Genotyping; Isolation; Congenital toxoplasmosis; Virulence.

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário apicomplexa amplamente distribuído no mundo, capaz de infectar animais endotérmicos e causar a toxoplasmose. Esta zoonose caracteriza-se por distúrbios reprodutivos e problemas neurológicos e oftálmicos nos hospedeiros intermediários (DUBEY, 2004). Dentre estes destacam-se os animais de produção que constituem importante fonte de proteína, configurando-se como fontes de infecção para os carnívoros e onívoros, principalmente os humanos, o que os torna um problema para a saúde pública (DUBEY, 2010). 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).

Dessa forma, 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, os sinais clínicos da doença, aperfeiçoamento e implementação de medidas de diagnóstico, controle e tratamento da toxoplasmose (SU et al., 2006; SU et al., 2010).

Estudos genéticos observaram que *T. gondii* apresenta características genéticas distintas de acordo com a distribuição geográfica (SU et al., 2010; SHWAB et al., 2014). Isolados de *T. gondii* de humanos e animais da América do Norte e Europa apresentam baixa diversidade genética, com predominância de linhagens clonais (HOWE; SIBLEY, 1995; SU et al., 2010). Já os estudos realizados na América do Sul observaram uma alta diversidade genética de *T. gondii*, com predominância de genótipos não clonais (atípicos), em decorrência da recombinação sexual do parasito, favorecida pela grande biodiversidade de hospedeiros definitivos presente nesta região (AJZENBERG et al., 2004; SU et al., 2006; PENA et al., 2008).

Nesse contexto, o Arquipélago de Fernando de Noronha apresenta uma grande biodiversidade, no entanto são poucos os estudos sobre a presença de agentes infecciosos nessa região. Nos últimos anos, estudos investigaram a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em animais da Ilha e evidenciaram elevada prevalência em espécies domésticas (MAGALHÃES et al., 2016a; MAGALHÃES et al., 2016b, MAGALHÃES et al., 2017) e selvagens (COSTA et al., 2012). Na região Nordeste do Brasil, especialmente no estados de Alagoas e Pernambuco, existem poucos estudos sobre a caracterização genética de cepas de *T. gondii* e análise de virulência *in vivo*.

Portanto, objetivou-se caracterizar genética e biologicamente isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de animais e humano na região nordeste do Brasil, com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre a diversidade genética nesta região.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Subfilo Apicomplexa

O subfilo Apicomplexa é composto por mais de 5.000 espécies de protozoários intracelulares obrigatórios (LEVINE, 1988), que possuem o complexo apical, no qual se localiza um conjunto de organelas secretoras, como micronemas, róptrias e grânulos densos (LEBRUN; CARRUTHERS; CESBRON-DELAUW, 2014). A maioria dos apicomplexas apresenta um ciclo biológico complexo, com diferentes estágios infectantes que se multiplicam de forma sexuada ou assexuada, capazes de infectar diversos hospedeiros (BESTEIRO, 2014). Entre os membros deste subfilo, alguns merecem destaque pelo impacto à saúde pública e relevância econômica, visto que podem causar doença em humanos e/ou animais. Neste contexto, podem ser citados os microrganismos *Cryptosporidium* spp., *Hammondia* spp., *Neospora caninum*, *Plasmodium* spp., *Sarcocystis* spp. e *Toxoplasma gondii* (BATTLE et al., 2012; CHECKLEY et al., 2015)

2.2 Histórico

A descoberta de *Toxoplasma gondii* ocorreu em 1908 por Charles Nicolle e Louis Manceaux que relataram a presença 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).

2.3 Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um coccídio intracelular obrigatório, pertencente ao filo Alveolata, subfilo Apicomplexa, classe Conoidasida, sub-classe Coccidia, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae, sub-família Toxoplasmatinae, sendo a única espécie identificada do gênero (ADL, 2012).

Este protozoário formador de cistos teciduais tem a capacidade de infectar a maioria dos animais endotérmicos, incluindo humanos, animais domésticos e silvestres. No entanto, membros da família Felidae são os únicos hospedeiros definitivos do parasito desempenhando um papel fundamental na transmissão e manutenção da toxoplasmose devido à sua capacidade de eliminar oocistos (TENTER et al., 2000).

Devido à importância médica e veterinária, *T. gondii* é um dos parasitos mais estudados em todo o mundo (DUBEY, 2010). É o agente etiológico da zoonose cosmopolita toxoplasmose, descrita como uma das enfermidades parasitárias mais frequentes no homem e em outros animais endotérmicos (TENTER et al., 2000).

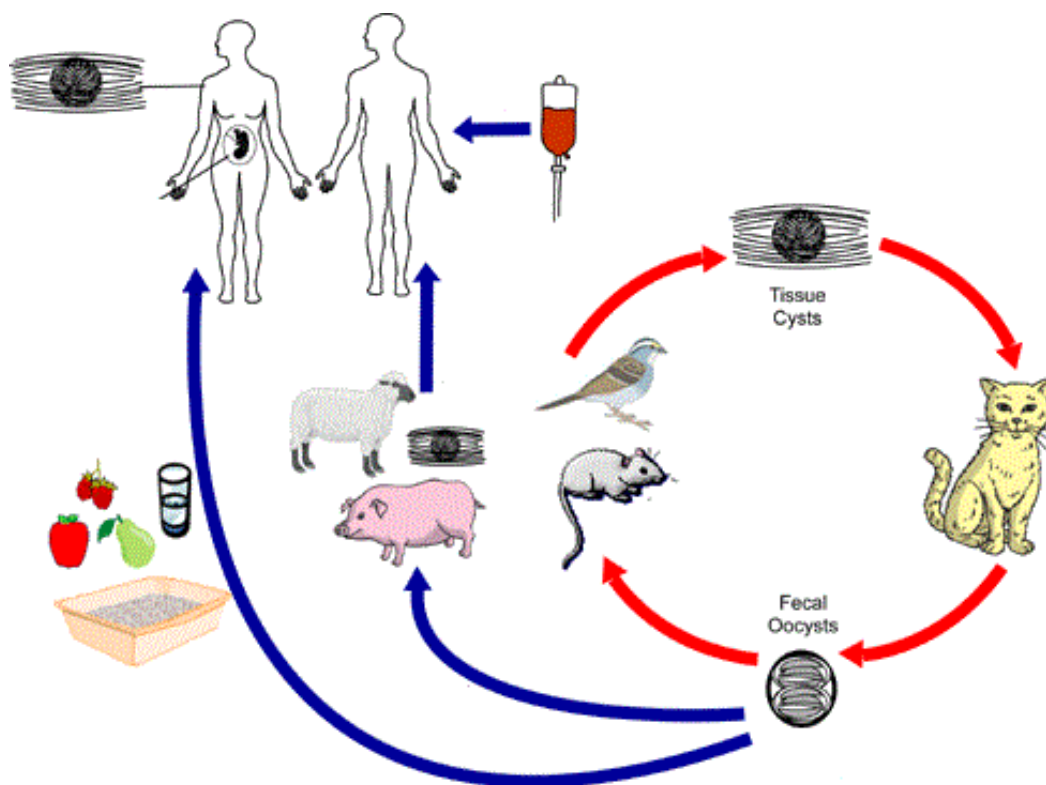
O ciclo biológico de *T. gondii* é heteroxeno facultativo e possui duas fases distintas: a fase assexuada, que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários por multiplicação rápida (taquizoítos) e multiplicação lenta (bradizoítos) e a fase sexuada que ocorre no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos (Figura 1). Três estágios infectantes são relatados: taquizoítos, bradizoítos (no interior de cistos teciduais) e esporozoítos (no interior de oocistos) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Os taquizoítos (Figura 2A) se caracterizam pela rápida replicação em qualquer célula do hospedeiro. Apresentam forma de meia-lua, medindo em torno de 2 x 6µm com uma extremidade anterior pontiaguda e outra posterior arredondada. Ultraestruturalmente apresentam várias organelas e corpos de inclusão e o núcleo situa-se na área central da célula. As rôptrias são estruturas secretoras de proteínas em forma de clava, localizadas na região anterior dos taquizoítos e associadas à penetração na célula hospedeira (NICHOLS; CHIAPPINO; O'CONNOR, 1983). Os taquizoítos invadem as células hospedeiras por penetração ativa ou por fagocitose, tornando-se ovoides e envolvidos pelo vacúolo parasitóforo, que promove a proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (BONHOMME et al., 1992).

Após penetração, multiplicam-se assexuadamente, por um processo denominado endodigenia, resultando, posteriormente, na ruptura da célula invadida (DANTAS-LEITE,

2005). Características de invasão e crescimento dessa forma infectante dependem da cepa de *T. gondii* e tipo da célula parasitada. Cepas virulentas para camundongos geralmente crescem mais rápido em cultura celular do que as cepas menos virulentas, embora não tenham sido observadas diferenças estruturais entre as linhagens clonais (DUBEY, 2010).

Figura 1 - Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*



Fonte: CDC, 2015

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 $7\mu\text{m} \times 1,5\mu\text{m}$ (DUBEY, 2004). A parede dos cistos caracteriza-se por ser elástica, fina e composta pela célula hospedeira e material do parasito. 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 (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

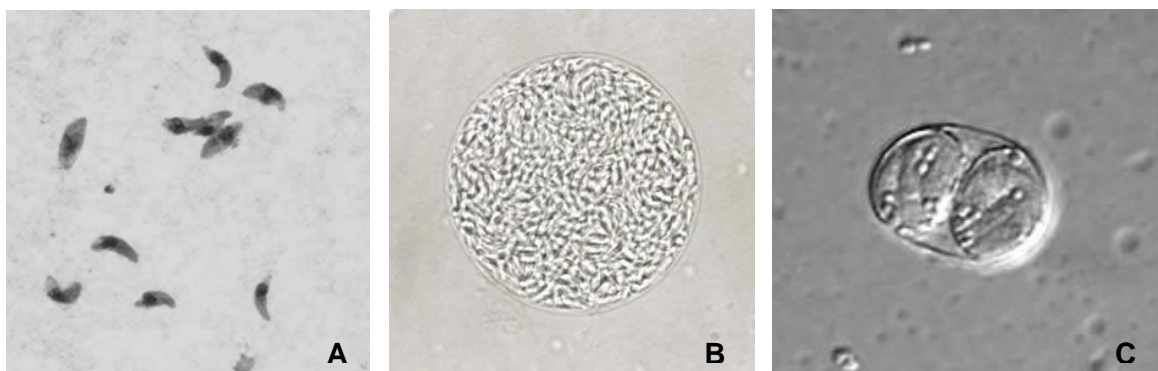
Os cistos são encontrados principalmente no encéfalo, olhos, musculatura esquelética e cardíaca. Também podem ser observados em órgãos como pulmão, fígado e rins (DUBEY, 2010). A localização e o número de cistos teciduais formados variam de acordo com o hospedeiro e a cepa de *T. gondii*. Em ratos e camundongos, por exemplo, foi encontrada

maior quantidade de cistos no encéfalo quando comparado aos órgãos viscerais, independente da cepa infectante testada. Em bovinos, ovinos, caprinos e gatos foi observado maior número de cistos no tecido muscular em relação ao encéfalo (DUBEY, 1997a). Os cistos podem permanecer por toda a vida do hospedeiro, na forma latente, sem causar resposta inflamatória (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

A formação dos cistos teciduais ocorre em diferentes tempos após infecção a depender da forma infectante do parasito e da via de transmissão. Estudo em modelo murino observou a formação de cistos entre 2 e 3 dias após inoculação intraperitoneal de taquizoítos (DUBEY; FRENKEL, 1976), enquanto que este período se estende para 5 a 6 dias quando a infecção é por via oral com bradizoítos (DUBEY, 1997b) e 6 a 7 dias quando ocorre ingestão de oocistos (DUBEY et al., 1997).

Os oocistos (Figura 2C) são formados exclusivamente nos hospedeiros definitivos, os felídeos domésticos e selvagens, os quais podem eliminar oocistos após ingestão de qualquer uma das três formas infectantes do agente (DUBEY, 2010). Entretanto, o período pré-patente e a frequência de eliminação variam de acordo com a forma infectante ingerida, sendo observado que a ingestão de cistos teciduais representa a principal causa de eliminação dos oocistos pelos felídeos (DUBEY, 2001).

Figura 2 - Formas infectantes de *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítos. (B) Cisto tecidual contendo bradizoítos. (C) Oocisto esporulado



Fonte: CDC, 2017.

Uma vez ingerido pelo hospedeiro definitivo, os cistos teciduais têm sua parede digerida por enzimas proteolíticas presentes no estômago e intestino, ocorrendo a liberação dos bradizoítos. Esses podem penetrar no intestino e se multiplicar como taquizoítos, disseminando-se para os tecidos 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 completamente formados, 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 subesférica a esférica e medem de 10µm a 12µm de diâmetro. A esporulação pode ocorrer de 1 a 5 dias após a eliminação de acordo com as condições ambientais, oxigenação, umidade e temperatura. Após esporulação, os oocistos apresentam forma subesférica a elipsoidal, aumentam cerca de 1µm e contêm dois esporocistos elipsoidais, cada um apresentando quatro esporozoítos em seu interior (FERGUNSON et al., 1979).

Os oocistos podem contaminar o ambiente e servir como forma infectante para os hospedeiros. Uma vez esporulados podem sobreviver por longos períodos de tempo em determinadas condições ambientais, sendo observada sua viabilidade em solo úmido por meses a anos (DUBEY; BEATTIE, 1988). Podem contaminar frutas e vegetais e apresentar viabilidade de pelo menos oito semanas sob condições de refrigeração (KNIEL et al., 2002). Quando presentes no solo podem se disseminar mecanicamente por diversas espécies de anélídeos, assim como por moscas e baratas (DUBEY, 2009a).

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 de *T. gondii* como importante fonte de infecção: são amplamente distribuídos e produzem grande quantidade de oocistos, número este que pode chegar a milhões (DUBEY, 2001). Desta forma, em estudos epidemiológicos, os gatos soropositivos são indicadores de contaminação ambiental, uma vez que provavelmente já eliminaram oocistos nas fezes (DUBEY, 2004).

2.4 Formas de transmissão de *Toxoplasma gondii*

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 contendo cistos com 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 malcozidas 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 vias de transmissão. Nos Estados Unidos, dados de estudos soroepidemiológicos sugeriram que a ingestão de carne malcozida contendo cistos de *T. gondii* é a principal via de transmissão para humanos (DUBEY; JONES, 2008). Para os felídeos, a ingestão de carnes ou vísceras cruas contaminadas e a ingestão de presas infectadas são as principais vias de transmissão (DUBEY; FRENKEL, 1998). Desta forma, os animais de produção, entre eles os ovinos e suínos, representam uma importante via de transmissão para o homem e carnívoros (DUBEY, 2009a).

Para os animais de produção destacam-se como principais vias de transmissão o ambiente, água e alimentos contaminados com oocistos eliminados pelos hospedeiros definitivos, além da transmissão vertical como importante meio de manutenção do agente no plantel (BUXTON et al., 2007). Outra forma de infecção para a espécie suína é a ingestão de roedores, carnes ou restos de alimentos contaminados com cistos teciduais do agente (DUBEY et al., 1995).

Embora pouco frequentes, outras formas de transmissão relatadas foram a transfusão sanguínea (FIGUEROA-DAMIAN, 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).

2.5 Toxoplasmose em diferentes hospedeiros

Uma variedade de fatores como espécie, idade, resposta imunológica, via de transmissão/forma infectante e genótipo do isolado podem determinar o surgimento de sinais clínicos (DUBEY; JONES, 2008). O perfil genotípico da cepa já foi relacionado às características clínicas da toxoplasmose. A linhagem tipo I de *T. gondii* está frequentemente envolvida em casos severos de retinocoroidite em humanos (GRIGG et al., 2001), enquanto que genótipos atípicos estão associados a casos de toxoplasmose aguda em imunocompetentes

(BOSSI; BRICAIRE, 2004). Outra variável é a forma infectante adquirida, visto que a ingestão de oocistos esporulados causa um quadro mais patogênico quando comparado à infecção por bradizoítos e taquizoítos, independente da dose (DUBEY, 2009a).

A toxoplasmose congênita é caracterizada pela ocorrência da transmissão vertical, sendo frequente o desenvolvimento de sinais clínicos em humanos 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 neurológicos 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, a toxoplasmose apresenta-se frequentemente de forma aguda, podendo ocasionar encefalite fatal ou neurotoxoplasmose (DUBEY, 1996a; MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Nos adultos imunocompetentes, a toxoplasmose geralmente é assintomática (DUBEY, 2004).

Nos pequenos ruminantes, a toxoplasmose é caracterizada principalmente por problemas reprodutivos como morte ou absorção embrionária, repetição do cio, mumificação fetal, abortamento, 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 (DUBEY, 2009b). Na espécie ovina, quando a infecção ocorre no terço inicial da gestação é comum a ocorrência de morte fetal seguida de absorção embrionária ou abortamento. Em infecções adquiridas no terço médio, os abortamentos são mais frequentes, enquanto que no terço final, quando a imunidade fetal está mais desenvolvida, é comum o nascimento de crias debilitadas ou assintomáticas e cronicamente infectadas (BUXTON et al., 2007).

A infecção por *T. gondii* é uma das principais causas de abortamento em ovinos na Nova Zelândia, Austrália, Reino Unido, Noruega e Estados Unidos (DUBEY; BEATTIE, 1988). No entanto, casos de abortamento na espécie ovina relacionados a este protozoário já foram reportados em diversas outras regiões do mundo como Espanha (PEREIRA-BUENO et al., 2004), Itália (MASALA et al., 2003; MASALA et al., 2007), Dinamarca (THAMSBORG et al., 1994), Índia (VERMA, BHARDWAJ e GAUTAM, 1989), Argentina (GUAL et al., 2018) e Brasil (MORAES et al., 2011).

Em suínos, a infecção ocorre geralmente de forma subclínica, sendo a forma clínica considerada rara nessa espécie (DUBEY, 2009c), embora anorexia, febre, dispneia, fraqueza

muscular, sinais neurológicos e morte já tenham sido relatados em casos de toxoplasmose aguda em suínos na Áustria (WEISSENBOCK; DUBEY, 1993) e na Coreia do Sul (KIM et al., 2009). A toxoplasmose congênita em leitões também já foi descrita, observando-se a presença de natimortos e nascimento de crias com distúrbios locomotores seguido de óbito. Os achados de necropsia se caracterizam por encefalite, pneumonia e necrose de linfonodos (DUBEY, 2009c). Embora considerados raros nessa espécie animal, casos de aborto por toxoplasmose em suínos também foram relatados (CHANG et al., 1990; KIM et al., 2009).

A tendência atual de criação orgânica de suínos preconiza o manejo sem confinamento, com acesso a áreas externas, o que possibilita o contato com água e solo contaminado com oocistos, além de roedores e animais silvestres (JONES; DUBEY, 2012). A prevalência de *T. gondii* nos animais está relacionada ao sistema de manejo e criação. Gamble, Brady e Miller (1999) relataram prevalência acima de 68% em criação de suínos na qual o manejo é precário e os animais não são confinados. A presença de animais domésticos, selvagens e sinantrópicos próximos às instalações que abrigam suínos constitui um fator de risco para a infecção por *T. gondii* (DUBEY, 2009c).

Estudos epidemiológicos em suínos de fazendas orgânicas na Holanda observaram que o número de gatos nas propriedades, a alimentação com soro de leite de cabra (MEERBURG et al., 2006) e a presença de roedores estavam associados à soroprevalência por *T. gondii* (KIJLSTRA et al., 2008). Ao analisar os fatores de risco em criações de suínos de subsistência, Samico-Fernandes et al. (2017) verificaram que animais de reprodução com idade avançada e apresentaram maiores chances de infecção quando comparado a animais de terminação (mais jovens).

Estudos detectaram a presença do parasito em carnes, vísceras e embutidos de suínos (DIAS et al., 2005; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006; TSUTSUI et al., 2007). Surtos de toxoplasmose aguda pelo consumo de vísceras (baço e fígado) cruas de javali e de fígado cru de suíno doméstico foram relatados na Coreia (CHOI et al., 1997). De acordo com Dubey (1988), os cistos podem permanecer viáveis na musculatura de suínos por até 875 dias. Diante disso, estudos genotípicos buscam comparar os isolados dessas duas espécies animais com o objetivo de rastrear a fonte de infecção (DUBEY, 2009c).

Já na espécie bovina, diferentemente de outros hospedeiros, a infecção por *T. gondii* não apresenta importância significativa, isto porque estes animais possuem uma resistência imunológica inata, que ainda não se encontra completamente elucidada (DUBEY; JONES, 2008). Estudo de infecção experimental observou que apesar do parasito ser capaz de infectar

e se multiplicar em bovinos, eles são eliminados ou reduzidos em níveis indetectáveis dentro de algumas semanas após a infecção (DUBEY, 1983).

Os primatas do Novo Mundo (*New World monkeys*), a exemplo de sagui-de-mão-amarela (*Saguinus midas midas*), macaco-de-cheiro-comum (*Saimiri sciureus*), sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) e bugio-ruivo (*Alouatta fusca*) são altamente suscetíveis à infecção por *T. gondii*, ocorrendo relatos de surtos, morte súbita ou desenvolvimento de sinais inespecíficos, como anorexia e depressão (EPIPHANIO et al., 2003; CEDILLO-PELÁEZ et al., 2011; NISHIMURA et al., 2019).

Com relação aos hospedeiros definitivos, a toxoplasmose geralmente ocorre de forma assintomática, mas eventualmente os felinos podem apresentar febre, anorexia, letargia, dispneia, diarreia, icterícia, vômito, desconforto abdominal, sinais neurológicos, além de sinais oculares como uveíte e retinocoroidite (DUBEY, 1994; VOLAIRE; RADECKI; LAPPIN, 2005).

2.6 Diagnóstico da Toxoplasmose

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 as mais utilizadas estão o Teste de Aglutinação Modificado (MAT), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), os quais podem detectar anticorpos IgG e/ou IgM. É importante destacar que a titulação de anticorpos não apresenta associação com a severidade dos sinais e sintomas da toxoplasmose. Os exames sorológicos são uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da doença e frequentemente são aplicados a estudos epidemiológicos; no entanto o exame sorológico positivo 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 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 baixa concentração (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 do material biológico e acondicionamento, extração e purificação do DNA (DUBEY, 2010). A escolha dos reagentes, termociclador e a correta análise dos produtos amplificados também são fundamentais (DUBEY; SCHARES, 2006).

Para *T. gondii*, três genes são amplamente utilizados para detecção do DNA em amostras biológicas: gene B1, 529 bp e ITS-1 (SU et al., 2010). A detecção molecular do gene B1 foi desenvolvida inicialmente por Burg et al. (1989), sendo posteriormente adaptada para uma PCR nested, a fim de alcançar maior sensibilidade (BASTIEN et al., 2007). Para detecção do gene ITS-1 de *T. gondii* foi desenvolvida uma PCR nested em um tubo, que minimiza a possibilidade de contaminação em relação a uma PCR nested executada em duas etapas, além de otimizar o tempo e a utilização de reagentes (HURTADO et al., 2001). Já o gene 529 bp apresenta maior sensibilidade quando comparado aos demais genes por possuir maior número de cópias no genoma (HOMAN et al., 2000). Outro gene que vem sendo estudado é o 18S DNA ribossomal para detecção de protozoários apicomplexas por meio de PCR nested, apresentando maior sensibilidade que o gene B1. Sua utilidade está relacionada à triagem de agentes infecciosos em tecidos animais em virtude da capacidade de distinguir parasitos do subfilo Apicomplexa similares a *T. gondii*, a exemplo de *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*, *Sarcocystis* spp. e *Eimeria* spp. (SU et al., 2010).

O DNA de *T. gondii* já foi detectado por meio da PCR em tecidos de fetos abortados e placenta de ovinos (HURTADO et al., 2001; MASALA et al., 2003; MASALA et al., 2007), coração de suínos (SAMICO-FERNANDES et al., 2017), assim como em órgãos reprodutivos de ovinos e suínos (BEZERRA et al., 2013a; BEZERRA et al., 2014a), sêmen ovino e suíno (MOURA et al., 2007; MORAES et al., 2010; BEZERRA et al., 2014b), leite de cabras e ovelhas (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 na detecção e diferenciação dos coccídios e seus oocistos, entre eles *T. gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni* e *H. hammondi* que apresentam similaridade morfológica e taxonômica (SCHARES et al., 2005).

Para o isolamento de *T. gondii*, as técnicas utilizadas são o bioensaio e a inoculação do material suspeito em cultura celular. O bioensaio é considerado padrão ouro para detectar a

viabilidade do parasito, podendo 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 (DUBEY, 2010). Além disso, o modelo murino é amplamente utilizado para avaliação da virulência de cepas de *T. gondii*, com o objetivo de prever e correlacionar com surgimento de sinais clínicos em casos de toxoplasmose em humanos (XIAO; YOLKEN, 2015; SARAF et al., 2017)

2.7 Epidemiologia molecular 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 ocorrência de sinais clínicos (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; LEHMANN et al., 2006).

Com o objetivo de desenvolver marcadores genéticos, os isolados de *T. gondii* foram agrupados de acordo com características de virulência em camundongos e estudos foram realizados para 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 de baixa virulência ou 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 de *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 variabilidade 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).

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., 2002).

Estudo realizado por Pena et al. (2008) analisou um banco de dados composto por 125 isolados de diferentes hospedeiros e localidades do Brasil e identificaram 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. Posteriormente, evidenciou-se a ausência de genótipos predominantes no Brasil (SARAF et al., 2017).

No que concerne à região nordeste do Brasil, estudos genotípicos de *T. gondii* foram relatados em galinhas (DUBEY et al., 2008; DUBEY et al., 2010; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013), gatos (MELO et al., 2016), roedores (SILVA et al., 2017; LIMA et al., 2019), suínos (BEZERRA et al., 2012; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013; FEITOSA et al., 2014; SAMICO-FERNANDES et al., 2015; RÊGO et al., 2017), caprinos (CAVALCANTE et al., 2007; RAGOZO et al., 2010; CLEMENTINO-ANDRADE et al., 2013; RÊGO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018), ovinos (MACIEL et al., 2014) e animais selvagens (PENA et al., 2011; VITALIANO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2017; SILVA et al., 2018), com predominância de genótipos recombinantes.

Estudos genotípicos com isolados provenientes do Arquipélago de Fernando de Noronha são limitados, sendo caracterizados até o momento isolados de aves, roedores e gatos (Tabela 1). Em um estudo genético com galinhas, foram 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 genótipos atípicos (#142, #146, #153, #163), 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 e identificou o genótipo #146 (VITALIANO et al., 2014). Em rato preto (*Rattus rattus*) foram identificados os genótipos #13 (SILVA et al., 2017) e #146, #163, #260, #291; em rato marrom (*Rattus norvegicus*)

foram detectados #13, #146 e tipo II variante (SILVA et al., 2017); e em gatos, os genótipos #146 (MELO et al., 2016) e tipo II variante (SILVA et al., 2017). Todos esses estudos genéticos detectaram o genótipo #146, considerado atípico e não virulento.

É importante ressaltar que, até o momento, nenhum estudo relacionado ao isolamento e caracterização genética de *T. gondii* foi realizado em animais de produção na Ilha de Fernando de Noronha.

Tabela 1 - Estudos de caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* em animais domésticos e selvagens da Ilha de Fernando de Noronha, Brasil

Hospedeiro	Número de isolados	Genótipo	Referência
Galinha (<i>Gallus domesticus</i>)	23	#142, #146, #153, #163, Tipo II, Tipo III	Dubey et al. (2010)
Garça-vaqueira (<i>Bubulcus ibis</i>)	2	#146	Vitaliano et al. (2014)
Gato Feral (<i>Felis catus</i>)	2	#146	Melo et al. (2016)
	1	Tipo II variante	Silva et al. (2017)
Rato preto (<i>Rattus rattus</i>)	1	#13	Silva et al. (2017)
	9	#146, #163, #260, #291	Lima et al. (2019)
Rato marrom (<i>Rattus norvegicus</i>)	1	Tipo II variante	Silva et al. (2017)
	1	#146	

A facilidade em obter amostras biológicas de animais proporciona um maior número de estudos de *T. gondii* em diferentes espécies. No entanto, o mesmo não se aplica aos humanos; a dificuldade em obter isolados de *T. gondii* provenientes de humanos é um fator limitante para avanços na compreensão da epidemiologia, transmissão e mecanismos da doença (CARNEIRO et al., 2013). Nas regiões sul e sudeste do Brasil, estudos genotípicos foram realizados em pacientes acometidos por toxoplasmose ocular (KHAN et al., 2006; MATTOS et al., 2018), distúrbios neurológicos (FERREIRA et al., 2008), toxoplasmose aguda (FERREIRA et al., 2011) e toxoplasmose congênita (CARNEIRO et al., 2013).

Particularmente, estudo desenvolvido em Minas Gerais obteve 27 isolados a partir de sangue periférico de recém-nascidos (31 a 86 dias de idade) acometidos por toxoplasmose congênita. Desses, 25 isolados foram possíveis de caracterização genotípica, sendo obtidos 14 diferentes genótipos: ToxoDB #8, #11, #36, #41, #67, #108, #162, #206, #207, #208, #209,

#210, #211, #212 (CARNEIRO et al., 2013). Até o momento, nenhum estudo envolvendo isolados de *T. gondii* de humanos da região nordeste do Brasil foi desenvolvido.

2.8 Atuação das proteínas róptrias na virulência de *T. gondii*

Com o objetivo de estudar os fatores genéticos relacionados à virulência de *T. gondii*, foram realizados estudos com mapeamento genético para identificação de genes que determinam diferenças na expressão da virulência. Muitos desses estudos concluíram que alguns genes codificadores das proteínas secretadas pelas organelas róptrias apresentam polimorfismos alélicos e desempenham um papel importante na determinação da virulência de *T. gondii* (KHAN et al., 2005; TAYLOR et al., 2006).

As organelas róptrias, localizadas no complexo apical, são responsáveis pela liberação das proteínas róptrias (ROP) no citoplasma da célula hospedeira e na formação do vacúolo parasitóforo (VP) durante a invasão do parasito na célula, favorecendo o crescimento e sobrevivência da mesma (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Já foram descritos mais de 40 tipos de proteínas ROP (CAMEJO et al., 2014), entre elas as ROP18, ROP5, ROP16 e ROP17 estão comprovadamente associadas ao processo de interação e invasão da célula hospedeira, assim como à resposta imune do hospedeiro e à patogênese da infecção em camundongos (MELO et al., 2011).

Ao analisar o genoma completo de progênie obtidas após o cruzamento entre a cepa virulenta tipo I GT-1 e a não virulenta do tipo III CTG foram detectados 21 genes que podem controlar características fenotípicas atribuídas à virulência. Dentre esses genes, apenas o ROP18 apresentou abundância de polimorfismos e significativa diferença na sua expressão gênica, o que sugeriu seu envolvimento na determinação da virulência de *T. gondii* (SU et al., 2002; TAYLOR et al., 2006). O sequenciamento completo do gene ROP18 das três linhagens clonais revelou diferenças significativas entre elas, que podem estar relacionadas às diferenças na expressão da virulência (SAEIJ et al., 2006). Estudo posterior observou que uma maior expressão de ROP18 levou a um estímulo na multiplicação intracelular do parasito, sendo uma forte evidência de que esta proteína desempenha um papel no controle da proliferação intracelular de *T. gondii* (HAJJ et al., 2007).

ROP18 é uma quinase ativa pertencente à família ROP2 (HAJJ et al., 2006), que possui vários alvos na célula hospedeira, incluindo as GTPases relacionadas à imunidade (IRGs - immunity related GTPases), as quais têm influência sobre a imunidade inata e adaptativa (FENTRESS; SIBLEY, 2011; YAMAMOTO et al., 2011). As IRGs são

fortemente induzidas pelo interferon gama (IFN- γ) e têm papel importante na restrição de patógenos intracelulares, como *T. gondii* (TAYLOR; FENG; SHER, 2007). O recrutamento de IRGs à membrana do vacúolo parasitóforo (VP) é responsável pela destruição do mesmo e morte do parasito (KHAMINETS et al., 2010). ROP18 atua na inativação das IRGs pela fosforilação do sítio de ligação dos nucleotídeos, o que leva ao bloqueio da morte dependente das IRGs, protegendo a membrana do VP da destruição, com consequente preservação do parasito (FENTRESS et al., 2010; STEINFELDT et al., 2010). É importante destacar que ROP18 é considerada o maior fator de virulência de *T. gondii* (SARAF et al., 2017).

Da mesma forma, ROP17 também atua na inativação das IRGs, prevenindo a destruição dos VP e apresentando ação sinérgica com ROP18 (ETHERIDGE et al., 2014).

Estudos evidenciaram que ROP5 atua na regulação de outras proteínas quinases, estando inclusive associada à ROP18 e ROP17, pois pode permitir o acesso destas ao local de fosforilação de IRGs (NIEDELMAN et al., 2012). A associação de ROP18 e ROP5 como determinantes na predição da virulência de *T. gondii* em camundongos foi evidenciada por Shwab et al. (2016) ao realizarem a caracterização genotípica desses marcadores em 240 isolados e relacionando-os aos perfis de virulência *in vivo*. Por exemplo, a combinação alélica 3/5 para ROP18/ROP5 foi atribuída a isolados que se apresentam avirulentos em camundongos, enquanto que o perfil alélico 4/4 foi relacionado a cepas altamente virulentas. Os mesmos autores sugeriram que a associação dos alelos de ROP18/ROP17 também indicaram boa correlação com a virulência em camundongos.

ROP16 é uma proteína quinase importante na modulação da resposta imune do hospedeiro frente à invasão do parasito em camundongos, visto que é responsável por alterações na transcrição dos hospedeiros (SAEIJ et al., 2007). A ação de ROP16 sobre a expressão gênica é mediada pela ativação de dois fatores de transcrição, STAT3 e STAT6, os quais regulam a resposta inflamatória Th1. Além disso, foi observado que ROP16 também é capaz de ativar diretamente STAT3 e STAT6, causando supressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, a qual é essencial para o desenvolvimento da resposta imune Th1 (YAMAMOTO et al., 2009; ONG, REESE, BOOTHROYD, 2010). Apesar disso, Shwab et al. (2016) não observaram uma associação significativa deste gene com a virulência em camundongos.

2.9 Toxoplasmose na Saúde Pública

A prevalência da infecção por *T. gondii* na população humana é variável, dependendo da região geográfica, características climáticas e ambientais, aspectos socioeconômicos e culturais (PAPPAS et al., 2009). Estudos realizados na América Latina evidenciaram elevadas taxas de anticorpos contra este parasito. No Brasil, foram detectadas soroprevalências acima de 60% em mulheres gestantes em Recife (PORTO et al., 2008), Minas Gerais (CARELLOS et al., 2008), Mato Grosso (LEAO et al., 2004) e Rio Grande do Sul (SPALDING et al., 2005; REIS et al., 2006; LAGO et al., 2009). Dados semelhantes foram observados na Colômbia (CASTRO et al., 2008; ROSSO et al., 2008), Costa Rica (ZAPATA et al., 2005) e Cuba (SANCHEZ-GUTIERREZ et al., 2003). No continente europeu, as taxas variaram entre 20-30% (NASH et al., 2005; KANKOVA; FLEGR, 2007; BARTOLOME-ALVAREZ et al., 2008; KANSOUZIDOU et al., 2008; MASINI et al., 2008; STUDENICOVA et al., 2008).

Estudos sobre a toxoplasmose em mulheres gestantes são particularmente importantes em virtude da possibilidade de transmissão do parasito para o feto, o que pode ocasionar significativas consequências. Em geral, a infecção congênita ocorre quando a mulher adquire a primoinfecção durante a gestação, no entanto, já foram descritos casos de reativação da infecção em mulheres gestantes e de nova infecção por uma cepa geneticamente distinta em indivíduos cronicamente infectados (LINDSAY; DUBEY, 2011). A severidade dos sinais clínicos na toxoplasmose congênita depende do genótipo do parasito, dose infectante e idade gestacional em que a infecção ocorreu. A infecção materna durante o primeiro e segundo trimestres pode resultar em manifestações clínicas graves, envolvendo morte fetal, aborto espontâneo, hidrocefalia e distúrbios mentais (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2013), enquanto que no terço final pode ocasionar infecção subclínica no recém-nascido, com posterior desenvolvimento de coriorretinite (MONTROYA; LIENSEFELD, 2004).

Diversos estudos analisaram fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em humanos em diferentes partes do mundo, dentre os quais foram identificados: brincar em caixas de areias e *playground* de escolas (SANTOS et al., 2010); contato com solo e práticas de jardinagem sem luvas (COOK et al., 2000); limpeza inadequada de frutas e verduras (KAPPERUD et al., 1996); consumo de carne crua ou malcozida, principalmente de porco (KAPPERUD et al., 1996) e carneiro (KAPPERUD et al., 1996; BARIL et al., 1999; COOK et al., 2000). O consumo de outras fontes protéicas, como carne de cavalo, cervídeo e aves

silvestres também foi associado a um aumento no risco de soropositividade (COOK et al., 2000).

Estudos de caso-controle desenvolvidos na Europa demonstraram que a ingestão de carne crua ou malcozida foi o fator de risco mais importante para a infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes (KAPPERUD et al., 1996; BARIL et al., 1999; COOK et al., 2000). Surtos de toxoplasmose em humanos já foram associados ao consumo de carne de porco malcozida na Coreia (CHOI et al., 1997), carne de cervídeo crua ou malcozida nos Estados Unidos (ROSS et al., 2001), carne de caça malcozida na Guiana Francesa (CARME et al., 2002) e carne de cordeiro crua na Austrália e Inglaterra (SMITH, 1993). Nos Estados Unidos, o consumo de ostras, mariscos ou mexilhões crus também foi descrito como um fator de risco para a infecção por *T. gondii* (JONES et al., 2009). Além disso, 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).

Com o objetivo de reduzir o risco de infecção em humanos pelo consumo de carnes contendo cistos teciduais de *T. gondii*, é essencial a implementação de medidas de controle nas criações de animais, além da manipulação adequada das carnes e alimentos (SCHLÜTERET al., 2014).

A veiculação hídrica de *T. gondii* 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). Recentemente, relatou-se a ocorrência de um surto de toxoplasmose em humanos no município de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul, associado ao consumo de água e hortaliças contaminadas com oocistos. Este surto, confirmado em 2018, foi considerado o maior surto de toxoplasmose em número de casos do mundo (SILVA et al., 2018).

Nesse sentido, uma triagem sorológica em mulheres no início e durante a gestação é fundamental para prevenção da toxoplasmose congênita, possibilitando a detecção precoce da infecção e o imediato início do tratamento (MONCADA; MONTOYA, 2012). Em países onde a triagem sorológica e o exame prenatal são ofertados adequadamente às gestantes, a maioria dos casos de infecção congênita é caracterizada pela ausência de sinais clínicos evidentes durante a gestação ou no período neonatal, a exemplo do que se observa na França (VILLENNA et al., 2010). Países ausentes que não têm um programa de controle prenatal para toxoplasmose congênita, a exemplo dos Estados Unidos, apresentam elevada frequência de formas graves da doença (OLARIU et al., 2011).

No entanto, no Brasil, apesar de existir um manual técnico acerca da atenção qualificada durante o prenatal e puerpério, o qual recomenda a pesquisa de anticorpos IgM em gestantes na primeira consulta do exame prenatal (BRASIL, 2006), verifica-se elevada taxa de infecção congênita por *T. gondii* (AVELINO et al., 2014; MURATA et al., 2017). Deste modo, a implementação de centros de referência para diagnóstico, acompanhamento e tratamento de toxoplasmose em gestantes, assim como o aperfeiçoamento na comunicação entre as unidades básicas de saúde pública são alternativas para redução da frequência de toxoplasmose congênita no país.

2.10 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, a única habitada por humanos, e outras 21 ilhas secundárias, abrangendo um território total de 26 km² (SCHULZ-NETO, 2004). 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 km². 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 a jurisdição do Governo do Estado de Pernambuco.

De acordo com o último censo realizado em 2010 foi contabilizada uma população de 2.630 habitantes e 848 animais domésticos, sendo 378 cães e 470 gatos (IBGE, 2010). Esses dados são superiores ao recomendado 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 errante seja ainda superior à de domésticos.

Na década de 60, a Ilha de Fernando de Noronha era utilizada como quarentenário para animais vindos de outros continentes, principalmente Europa e Ásia (PERNAMBUCO, 2015). O turismo na Ilha teve 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).

Apesar da sua importância para o turismo, são escassos os estudos epidemiológicos sobre a presença de agentes infecciosos e enfermidades na população animal e humana na Ilha de Fernando de Noronha. Estudos recentes evidenciaram a elevada prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em diversas espécies animais da região (Tabela 2), o que despertou para a realização de estudos epidemiológicos e moleculares.

Um fator que merece destaque é o sistema semi-intensivo de subsistência em que a maioria dos animais de produção são criados em Fernando de Noronha. Segundo Jones e Dubey (2012), este tipo de sistema é um fator de risco para infecção por *T. gondii*, pois a ausência de um manejo adequado dos locais de confinamento possibilita a permanência de ambientes úmidos que favorecem a viabilidade de oocistos de *T. gondii* (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Ao analisar os fatores de risco para infecção por *T. gondii* em ovinos desta região, Magalhães et al. (2016b) observaram que ovinos criados em contato com felinos no pasto e confinados apresentaram maiores chances de infecção quando comparado a animais criados em contato com felinos apenas no pasto. Mais uma vez, o ambiente de confinamento altamente contaminado propicia a disseminação da infecção por *T. gondii*.

Tabela 2 - Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais domésticos e silvestres da Ilha de Fernando de Noronha, Brasil

Espécie	Soroprevalência		Referência
	Prevalência	Técnica (ponto de corte)	
Galinha	88,40% (380/430)	RIFI (1:16)	Magalhães et al. (2016a)
Ovina	85% (204/240)	RIFI (1:64)	Magalhães et al. (2016b)
Bovina	10,7% (15/140)	RIFI (1:64)	
Suína	51,85% (14/27)	RIFI (1:64)	
Equina	22,70% (23/101)	RIFI (1:64)	
Gato doméstico	71,26% (248/348)	RIFI (1:16)	Magalhães et al. (2017)
Gato feral	54,74% (150/247)	RIFI (1:16)	
Canina	48,75% (156/320)	RIFI (1:16)	
Rato preto (<i>Rattus rattus</i>)	38,20% (13/34)	MAT (1:25)	Costa et al. (2012)
Garça Vaqueira (<i>Bubulcus ibis</i>)	79,70% (157/197)	MAT (1:5)	

Estudos de prevalência e análise de fatores de risco da infecção por *T. gondii* são essenciais para o conhecimento da distribuição do agente e rastrear fontes de infecção. No entanto, a obtenção e caracterização de isolados fornecem informações epidemiológicas importantes, que permitem a associação genética e biológica com o surgimento de sinais clínicos (SU et al., 2010).

3 REFERÊNCIAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; LANE, C.E.; LUKES, J.; BASS, D.; BPWSER, S.S.; BROWN, M.W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, H.; GALL, L.. LYNN, D.H. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429-493, 2012.

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.

ALMEIDA, J.C.; MELO, R.P.B.; PEDROSA, C.M.; SANTOS, M.S.; BARROS, L.D.; GARCIA, J.L.; PORTO, W.J.N.; MOTA, R.A. First isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from crab-eating fox (*Cerdocyon thous* - Linnaeus, 1766). **Acta Tropica**, v. 169, p. 26-29, 2017.

AVELINO, .M.M.; AMARAL, W.N.; RODRIGUES, I.M.X.; RASSI, A.R.; GOMES, M.B.F.; COSTA, T.L.; CASTRO, A.M. Congenital toxoplasmosis and prenatal care state programs. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 33, p. 1-13, 2014.

BARIL, L.; ANCELLE, T.; GOULET, V.; THULLIEZ, P.; TIRARD-FLEURY, V.; CARME, B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a casecontrol study in France. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. 305–309, 1999.

BARTOLOME-ALVAREZ, J.; MARTINEZ-SERRANO, M.; MORENO-PARRADO, L.; LORENTE-ORTUNO, S.; CRESPO-SANCHEZ, M.D. Prevalence and incidence in Albacete, Spain, of *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age: differences between immigrant and non-immigrant (2001–2007). **Revista Española de Salud Pública**, v. 82, p. 333–342, 2008.

BASTIEN, P.; JUMAS-BILAK, E.; VARLET-MARIE, E; MARTY, P. Three years of multi-laboratory external quality control for the molecular detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid in France. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 430–433, 2007.

BATTLE, K.E.; GETHING, P.W.; ELYAZAR, I.R.; MOYES, C.L.; SINKA, M.E.; HOWES, R.E.; GUERRA, C.A.; PRICE, R.N.; BAIRD, K.J.; HAY, S.I. The global public health significance of *Plasmodium vivax*. **Advance in Parasitology**, v. 80, p.1–111, 2012.

BESTEIRO, S. Autophagy in Parasitic Protists. In: Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. **Role in General Diseases**, v.2, p. 185-195, 2014.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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 Emergence Disease**, 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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. **Reproduction in Domestic Animals**, 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. **Parasitologia**, v. 54, p. 31–43, 1992.

BOOTHROYD, J.C.; DUBREMETZ, J.F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 79 -88, 2008.

BOSSI, P.; BRICAIRE, F. Severe acute disseminated toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 364, p. 579, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada – manual técnico**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos. Caderno nº 5, 2005. 163 p.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P; BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1787–1792, 1989.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E.A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v 149, p. 25–28, 2007.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3-4, p. 256-261, 2011.

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.

CARELLOS, E.V.; ANDRADE, G.M.; AGUIAR, R.A. Evaluation of prenatal screening for toxoplasmosis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a cross-sectional study of postpartum women in two maternity hospitals. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 391–401, 2008.

CARNEIRO, A. C. A. V.; ANDRADE, G. M.; COSTA, J. G. L.; PINHEIRO, B. V.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. M.; SU, C.; JANUÁRIO, J. N.; VITOR, R. W. A. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901–907, 2013.

CASTRO, A.T.; CONGORA, A.; GONZALEZ, M.E. *Toxoplasma gondii* antibody seroprevalence in pregnant women from Villavicencio, Colombia. **Orinoquia**, v. 12, p. 91–100, 2008.

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.

CEDILLO-PELÁEZ, C.; RICO-TORRES, C.P.; SALAS-GARRIDO, C.G.; CORREA, D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 368–371, 2011.

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 jan. 2018.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Toxoplasmosis**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html> - Acesso em: 02 fev. 2019.

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.

CHANG, G.N.; TSAI, S.S.; KUO, M.; DUBEY, J.P. Serological survey of swine toxoplasmosis in Taiwan. **Journal of the Chinese Society of Animal Science**, v. 16, p. 104–111, 1990.

CHECKLEY, W.; WHITE, A.C.JR; JAGANATH, D., et al. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. **The Lancet Infectious Diseases**, v.; 15, n. 1, p. 85–94, 2015.

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.

CHOI, W.Y.; NAM, H.W.; KWAK, N.H.; HUH, W.; KIM, Y.R.; KANG, M. W.; CHO, S. Y.; DUBEY, J. P. Foodborn outbreaks of human toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 175, p. 1280-1282, 1997.

COOK, A.J.C.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P.A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A.E.; DUNN, D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: european multicentre case-control study. **British Medical Journal**, v. 321, p. 142–147, 2000.

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

DANTAS-LEITE, L.; URBINA, J.A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. Antiproliferative synergism of azasterols and antifolates against *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 130–135, 2005.

DIAS, R.A.F.; NAVARRO, I.T.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; DE CASTRO, M.V.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 185–189, 2005.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **The Journal of Protozoology**, v. 23, p. 537-546, 1976.

DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 199–211, 1983.

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

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

DUBEY, J.P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988.

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.; WEIGEL, R. M.; SEIGEL, A. M.; KITRON, U. D.; MANNELLI, A.; MITCHELL, M. A.; MATEUS-PINILLA, N. E.; THULLIEZ, P.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; TODD, K. S. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 81, n. 5, p. 736-741, 1995.

DUBEY, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **Journal of Parasitology**, 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. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115, p. 15-20, 1997a.

DUBEY, J.P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 592-602, 1997b.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; BLIXT, J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 870-882, 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. **Clinical Microbiology Reviews**, 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. **Journal of Parasitology**, 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, 2002.

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

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

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. Toxoplasmosis in pig - The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009c.

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. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709-712, 2010.

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

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

ETHERIDGE, R.D.; ALAGANAN, A.; TANG, K.; LOU, H.J.; TURK, B.E.; SIBLEY, L.D. The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 537–550, 2014.

FEITOSA, T.F.; VILELA, V.L.R.; MELO, L.R.B.; ALMEIDA-NETO, J.L.; SOUTO, D.V.O.; MORAIS, D.F.; ATHAYDE, A.C.R.; AZEVEDO, S.S.; PENA, H.F.J. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 305–309, 2014.

FENTRESS, S.J.; BEHNKE, M.S.; DUNAY, I.R.; MASHAYEKHI, M.; ROMMEREIM, L.M.; FOX, B.A.; BZIK, D.J.; TAYLOR, G.A.; TURK, B.E.; LICHTI, C.F.; TOWNSEND, R.R.; QIU, W.; HUI, R.; BEATTY, W.L.; SIBLEY, L.D. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell Host Microbe**, v. 8 p. 484-495, 2010.

FERGUSON, D. J. P.; BIRCH-ANDERSEN, A.; SIIM, J. C.; HUTCHISON, W. M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporocysts and structure of the sporocysts wall. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, section B, v. 87, p. 183–190, 1979.

FERREIRA, I.M.R.; VIDAL, J.E.; COSTA-SILVA, T.A.; MEIRA, C.S.; HIRAMOTO, R.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR–RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118 p. 221–227, 2008.

FERREIRA, I.M.R.; VIDAL, J.E.; MATTOS, C.C.B.; MATTOS, L.C.; QU, D.; SU, C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP–PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 190-195, 2011.

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

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F.G.R.; PELISSARI-SANT’ANA, V.; LOPES, C.W.G. *Toxoplasma gondii* em encéfalos de suínos comercializados no município de Campos do Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 33-36, 2006.

- GAMBLE, H. R.; BRADY, R. C.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 129–136, 1999.
- GOLDMAN, M.; CARVER, R.K.; SULZER, A.J. Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. **Journal of Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 161-171, 1958.
- GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 633–639, 2001.
- GUAL, I.; GIANNITTI, F.; HECKER, Y.P.; SHIVERS, J.; ENTROCASSI, A.C.; MORRELL, E.L.; PARDINI, L.; FIORENTINO, M.A.; RODRÍGUEZ-FERMEPIN, M.; UNZAGA, J.M.; CANTÓN, G.J.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P. First case report of *Toxoplasma gondii*-induced abortions and stillbirths in sheep in Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 12, p. 39–42, 2018.
- HAJJ, H.E.; DEMEY, E.; PONCET, J.; LEBRUN, M.; BOWU, GALÉOTTI, N.; FOURMAUX, M.N.; MERCEREAU-PUIHALON, O.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J.F. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling. **Proteomics**, v. 6, p. 5773–5784, 2006.
- HAJJ, H.E.; LEBRUN, M.; AROD, S.T.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J.F. ROP18 Is a Rhoptry Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, p. 200-211, 2007.
- HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 69–75, 2000.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlations of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Disease**, 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. **Veterinary Parasitology**, 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. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.
- JONES, J.L.; DARGELAS, V.; ROBERTS, J.; PRESS, C.; REMINGTON, J.S.; MONTOYA, J.G. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 878–884, 2009.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Foodborne toxoplasmosis. **Foodsafety**, v. 55, p. 845-851, 2012.

KANKOVA, S.; FLEGR, J. Longer pregnancy and slower fetal development in women with latent “asymptomatic” toxoplasmosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 2007.

KANSOUZIDOU, A.; KAFTANTZI, A.; VAMVAKA, E.; KOLTSIDA, M.; KARAMBAXOGLU, D. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in population in northern Greece. **18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Barcelona, Spain, 2008.

KAPPERUD, G.; JENUM, P.A.; STRAYPEDERSEN, B.; MELBY, K.K.; ESKILD, A.; ENG, J. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy – results of a prospective case-control study in Norway. **American Journal of Epidemiology**, v. 144, p. 405–412, 1996.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J.; DE CRAEYE, S.; VEREIJKEN, P.; JONGERT, E. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183–190, 2008.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1359–1370, 2008.

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.

KHAMINETS, A.; HUNN, J.P.; KO'NEN-WAISMANN, S.; ZHAO, Y.O.; PREUKSCHAT, D.; COERS, J.; BOYLE, J.P.; ONG, Y.C.; BOOTHROYD, J.C.; REICHMANN, G.; HOWARD, J.C. Coordinated loading of IRG resistance GTPases on to the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 939–961, 2010.

KIM, J.H.; KANG, K.I.; KANG, W.C.; SOHN, H.J.; JEAN, Y.H.; PARK, B.K.; KIM, Y.; KIM, D.Y. Porcine abortion outbreak associated with *Toxoplasma gondii* in Jeju Island, Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, p. 147–151, 2009.

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. **Journal of Parasitology**, v. 88, p. 790-793, 2002.

LAGO, E.G.; CONRADO, G.S.; PICCOLI, C.S.; CARVALHO, R.L.; BENDER, A.L. *Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-infected pregnant women and the risk of congenital toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 345–351, 2009.

LEAO, P.R.; MEIRELLES FILHO, J.; DE MEDEIROS, S.F. Toxoplasmosis: seroprevalence in postpartum women attended by SUS (Brazilian Public Health System). **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, p. 627–632, 2004.

LEBRUN, M.; CARRUTHERS, V.B.; DESBRON-DELAUW, M.F. *Toxoplasma* secretory proteins and their roles in cell invasion and intracellular survival. In ***Toxoplasma gondii. The model apicomplexan: perspectives and methods***. London: Academic Press, 2nd ed, p. 389-453, 2014.

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*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 103, p. 11423-11428, 2006.

LEVINE, N.D. ***The Protozoan Phylum Apicomplexa***. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1988.

LIMA, D.C.V.; MELO, R.P.B.; ALMEIDA, J.; MAGALHÃES, F.J.R.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; PEDROSA, C.M.; OLIVEIRA, C.A.V.; PORTO, W.J.N.; SU, C.; MOTA R.A. *Toxoplasma gondii* in invasive animals on the Island of Fernando de Noronha in Brazil: Molecular characterization and mouse virulence studies of new genotypes. ***Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases***, v. 67, p. 1-7, 2019.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. ***Parasitology***, v.138, p. 1829–1831, 2011.

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.

MAGALHÃES, F.J.R; SILVA, J.G.; ANDRADE, M. R.; JUNIOR, J.W.P.; MOTA, R.A. High prevalence of toxoplasmosis in free-range chicken of the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. ***Acta Tropica***, v. 159, p. 58–61, 2016a.

MAGALHÃES, F.J.R; ANDRADE, M. R.; ALCÂNTARA, A. M.; JÚNIOR, W. P.; SENA, M. J.; PORTO, W. J. N.; VIEIRA, R. F. C.; MOTA, R. A. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha Island, Brazil. ***Brazilian Journal of Veterinary Parasitology***, Jaboticabal, v.25, n. 4, p. 511-515, 2016b.

MAGALHÃES, F.J.R; ANDRADE, M. R.; SOUZA, F.M.; FILHO, C.D.F.L.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T.; MOTA, R.A. Seroprevalence and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* infection in cats, dogs, pigs and equines of the Fernando de Noronha Island, Brasil. ***Parasitology International***, v. 66, p. 43-46, 2017.

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.
- MASALA, G. R.; PORCU, C.; DAGA, C.; DENTI, S.; CANU, G.; PATTA, C.; TOLA, S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 96–98, 2007.
- MASINI, L.; CASARELLA, L.; GRILLO, R.L.; ZANNELLA, M.P.; OLIVA, G.C. Epidemiologic study on anti-*Toxoplasma gondii* antibodies prevalence in an obstetric population. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 20, p. 159–166, 2008.
- MATTOS, C.C.B.; SIQUEIRA, R.C.; FREDERICO, F.B.; FERREIRA, I.M.R.; FERREIRA, A.I.C.; PREVIATO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; MATTOS, L.C. Toxoplasmic retinochoroiditis caused by *Toxoplasma gondii* strain ToxoDB#65. **Acta Tropica**, v. 185, p. 419-421, 2018.
- MELO, M.B.; JENSEN, K.D.C.; SAEIJ, J.P.J. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, 487-495, 2011.
- MELO, R.P.B.; ALMEIDA, J.C.; LIMA, D.C.V.; PEDROSA, C.M.; MAGALHÃES, F.J.R.; ALCÂNTARA, A.M.; BARROS, L.D.; VIEIRA, R.F.C.; GARCIA, J.L.; MOTA, R.A. Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 92–95, 2016.
- MEERBURG, B. G.; VAN RIEL, J. W.; CORNELISSEN, J. B.; KIJLSTRA, A.; MUL, M. F. Cats and goat whey associated with *Toxoplasma gondii* infection in pigs. **Vector-Borne Zoonotic Disease**, v. 6, p. 266–274, 2006.
- MONCADA, P.A.; MONTOYA, J.G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 7, p.815–828, 2012.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, 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.
- MORAES, E.P.B.X.; COSTA, M.M.; DANTAS, A.F.M.; SILVA, J.C.R.; MOTA, R.A.; *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 5924, p. 5924, 2011.
- 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**, v. 12, n. 2, p. 326-329, 2006.

MOURA, A.B.; COSTA, A.J.; FILHO, S.J.; PAIM, B.B.; PINTO, F.R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 430-434, 2007.

MUNDAY, B.L. Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. **Research Veterinary Science**, 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.

MURATA, F.H.A.; FERREIRA, M.N.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; SPEGIORIN, L.C.J.F.; MEIRA-STREJEVITCH, C.S.; GAVA, R.; SILVEIRA-CARVALHO, A.P.; MATTOS, L.C.; MATTOS, C.C.B. Evaluation of serological and molecular tests used to identify *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women attended in a public health service in São Paulo state, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, p. 13-19, 2017.

NASH, J.Q.; CHISSEL, S.; JONES, J.; WARBURTON, F.; VERLANDER, N.Q. Risk factors for toxoplasmosis in pregnant women in Kent, United Kingdom. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 475-483, 2005.

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

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L.; O'CONNOR, G. R. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 83, p. 85-98, 1983.

NIEDELMAN, W.; GOLD, D.A.; ROSOWSKI, E.E.; SPROKHOLT, J.K.; LIM, D.; FARID ARENAS, A.; MELO, M.B.; SPOONER, E.; YAFFE, M.B.; SAEIJ, J.P. The rhoptry proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, , p. 1-16, 2012.

NISHIMURA, M.; GOYAMA, T.; TOMIKAWA, S.; FERREIG, R.M.; EL-ALFY, E.S.N.; NAGAMUNE, K.; KOBAYASHI, Y.; NISHIKAWA, Y. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. **Parasitology International**, v. 68, p.79-86, 2019.

OLARIU, T.R.; REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; ALAM, A.; MONTOYA, J.G. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.14, n. 12, p. 1056-1061, 2011

OLIVEIRA, J.M.B.; ALMEIDA, J.C.; MELO, R.P.B.; BARROS, L.D.; GARCIA, J.L.; RIBEIRO-ANDRADE, M.; PORTO, W.J.N.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L.M.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A. First description of clonal lineage type II (genotype #1) of *Toxoplasma gondii* in abortion outbreak in goats. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 21-25, 2018.

ONG, Y.C.; REESE, M.L.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 28731–28740, 2010.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M.E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 1385–1394, 2009.

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

PENA, H.F.J.; MARVULO, M.F.V.; HORTA, M.C.; SILVA, M.A.; SILVA, J.C.R.; SIQUEIRA, D.B.; LIMA, P.A.C.P.; VITALIANO, S.N.; GENNARI, S.M. Isolation and genetic 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.

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PEREZ-PEREZ, V.; ALVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 33–43, 2004.

PERNAMBUCO. Governo do Estado. **Fauna do Arquipélago de Fernando de Noronha**. 2015. Disponível em: <http://www.noronha.pe.gov.br/> - Acesso em 20 fev. 2019

PORTO, A.M.; AMORIM, M.M.; COELHO, I.C.; SANTOS, L.C. Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women attended at a teaching-hospital in Recife. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, p. 242–248, 2008.

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

RÊGO, W.M.F.; COSTA, J.G.L.; BARAVIERA, R.C.A.; PINTO, L.V.; BESSA, G.L.; LOPES, R.E.N.; VITOR, R.W.A. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 19–25, 2017.

REIS, M.M.; TESSARO, M.M.; D’AZEVEDO, P.A. Serologic profile of toxoplasmosis in pregnant women from a public hospital in Porto Alegre. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, p. 158–164, 2006.

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.

- ROSSO, F.; LES, J.T.; AGUDELO, A.; VILLALOBOS, C.; CHAVES, J.A.; TUNUBALA, G.A.; MESSA, A.; REMINGTON, J.S.; MONTOYA, J.G. Prevalence of infection with *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Cali, Colombia, South America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 504–508, 2008.
- 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.
- SAEIJ, P.J.; BOYLE, J.P.; COLLER, S.; TAYLOR, S.; SIBLEY, L.D.; BROOKE-POWELL, E.T.; AJIOKA, J.W.; BOOTHROYD, J.C. Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis. **Science**, v. 314, p. 1780-1783, 2006.
- SAEIJ, P.J.; COLLER, S.; BOYLE, J.P.; JEROME, M.E.; WHITE, M.W.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, p. 324–327, 2007.
- SALANT, H.; SPIRA, D.T.; HAMBURGER, J. A Comparative Analysis of Coprologic Diagnostic Methods for Detection of *Toxoplasma gondii* in Cats. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 865–870, 2010.
- 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. **Parasitology Research**, v. 114, p. 3927–3930, 2015.
- SAMICO-FERNANDES, E.F.T.; SAMICO-FERNANDES, M.F.T.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; ALMEIDA, J.C.; SANTOS, A.S.; MOTA, A.R.; SOUZA-NETO, O.L.; MOTA, R.A. *Toxoplasma gondii* in backyard pigs: seroepidemiology and mouse bioassay. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 2, p. 466–470, 2017.
- SANCHEZ-GUTIERREZ, A.; MARTIN-HERNANDEZ, I.; GARCIA-IZQUIERDO, S.M.; Estudio de reactividad a *Toxoplasma gondii* en embarazadas de las provincias Ciudad de la Habana y Pinar del Rio, Cuba. **Bioquimia**, v. 28, p. 3–8, 2003.
- SANTOS, T.R.; NUNES, C.M.; LUVIZOTTO, M.C.; DE MOURA, A.B.; LOPES, W.D.; DA COSTA, A.J.; BRESCIANI, K.D. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 53–57, 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. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.78, n.6, 2015.
- SARAF, P.; SHWAB, E.K.; DUBEY, J.P.; SU, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. **Experimental Parasitology**, v. 174, p. 25-30, 2017.
- 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.

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.

SHWAB, E.K., ZHU, X.Q., MAJUMDAR, D., PENA, H.F., GENNARI, S.M., DUBEY, J.P., SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, p. 453-461, 2014.

SHWAB, E.K.; JIANG, T.; PENA, H.F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 141-6, 2016.

SILVA, J.C.R.; FERREIRA, F.; DIAS, R.A.; AJZENBERG, D.; MARVULO, M.F.V.; MAGALHÃES, F.J.R.; LIMA FILHO, C.D.F.; OLIVEIRA, S.; SOARES, H.S.; FEITOSA, T.F.; AIZAWA, J.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II-variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1041 220, p. 1-6, 2017.

SILVA, M.A.; PENA, H.F.J.; SOARES, H.S.; AIZAWA, J.; OLIVEIRA, S.; ALVES, B.F.; SOUZA, D.S.; MELO, R.P.B.; GENNARI, S.M.; MOTA, R.A.; SILVA, J.C.R. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from free-ranging and captive birds and mammals in Pernambuco state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 481-487, 2018.

SILVA, C.R.; CRIMA, S.M.; PERCIO, J.; BORGES, J.M.; MOREIRA, R.V.R.; PACHECO, F.C.; DIFANTE, C.M.; STREB, A; FARINHA, L.B.; RIBEIRO, J.S.; SALVAGNI, E.; MENEGOLLA, I.A.; KIST, P.P.; ZINI, L.B.; HAAS, S.; SCHALLEMBERGER, V.; BREGANÓ, R.M.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; MONICA, T.C.; MARTINS, F.D.C.; PACHECO, L.; VOGEL, F.S.F.; MINEO, J.R.; CABRAL, C.M. Investigação de surto de toxoplasmose associado à contaminação ambiental em Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2018. Rede Brasileira de Pesquisa em Toxoplasmose. **IV Simpósio Brasileiro de Toxoplasmose – Brasília-DF, 2018**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/simpósio_toxoplasmose_resumos.pdf - Acesso em 03 Abr. 2019.

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

SMITH, J.L. Documented outbreaks of Toxoplasmosis: Transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 630-639, 1993.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.; KLEIN, C.H.; RIBEIRO, L.C. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 173–177, 2005.

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

STEINFELDT, T.; KONEN-WAISMANN, S.; TONG, L.; PAWLOWSKI, N.; LAMKEMEYER, T.; SIBLEY, L.D.; HUNN, J.P.; HOWARD, J.C. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. **PLoS Biology**, v. 8, n. 12, p. 1-14, 2010.

STUDENICOVA, C.; ONDRISKA, F.; HOLKOVA, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among pregnant women in Slovakia. **Epidemiology, Microbiology, Immunology**, v. 57, p. 8–13, 2008.

SU, C.; HOWE, D.K.; DUBEY, J.P.; AJIOKA, J.W.; SIBLEY, L.D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10753-10758, 2002.

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*. **Parasitology**, v. 137, p. 1-11, 2010.

TAYLOR, S.; BARRAGAN, A.; SU, C.; FUX, B.; FENTRESS, S.J.; TANG, K.; BEATTY, W.L.; HAJJ, H.E.; JEROME, M.; BEHNKE, M.S.; WHITE, M.; WOOTTON, J.C.; SIBLEY, L.D. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 314, p. 1776-1780, 2006.

TAYLOR, G.A.; FENG, C.G.; SHER, A. Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). **Microbes Infection**, v. 9, p. 1644–1651, 2007.

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

THAMSBORG, S. M.; ILSOE, B.; HENRIKSEN, S.A.; LIND, P. *Toxoplasma*-abort hos far. **Dansk Veterinaertidsskrift**, v. 77, p. 925–930, 1994.

TSUTSUI, V.S.; FREIRE, R.L.; GARCIA, J.L.; GENNARI, S.M.; VIEIRA, D.P.; MARANA, E.R.M.; PRUDÊNCIO, L.B.; NAVARRO, I.T. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 30-34, 2007.

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 fev. 2017.

VERMA, S. P.; BHARDWAJ, R.M.; GAUTAM, O.P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the foetal brain of aborted ewes. **Indian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, p. 40–41, 1989.

VILLENA, I.; ANCELLE, T.; DELMAS, C.; GARCIA, P.; BREZIN, A.P.; THULLIEZ, P.; WALLON, M.; KING, L.; GOULET, V. Congenital toxoplasmosis in France in 2007: first results from a national surveillance system. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 25, 2010.

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. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 874–877, 2005.

XIAO, J.; YOLKEN, R.H. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica**, v. 213, p. 828-845, 2015.

WALLACE, G.D. Serologic and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific Atolls. **American Journal of Epidemiology**, v. 90, p. 103-111, 1969.

WEISSENBOCK, H.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis epizootic in a fattening swine herd. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 100, p. 370-374, 1993.

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 fev. 2016.

ZAPATA, M.; REYES, L.; HOLST, I. Decreased prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in adults from the Central Valley in Costa Rica. **Parasitología Latinoamericana**, v. 60, p. 32–37, 2005.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar genética e biologicamente isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de animais e humano na região nordeste do Brasil.

4.2 Específicos

- Isolar *T. gondii* em amostras de tecidos de ovinos e suínos abatidos para consumo humano na Ilha de Fernando de Noronha;
- Isolar *T. gondii* em amostra biológica de recém-nascido acometido por toxoplasmose congênita no estado de Alagoas;
- Caracterizar genotipicamente os isolados de *T. gondii* de ovino, suíno e humano, utilizando 10 marcadores genéticos específicos;
- Determinar a virulência dos isolados de *T. gondii* de ovino, suíno e humano em modelo murino;
- Caracterizar os genes de virulência ROP5, ROP18, ROP16 e ROP17 e determinar suas associações com a virulência em camundongos;
- Realizar a análise filogenética dos genótipos obtidos de ovino, suíno e humano, e comparar suas características genotípicas e biológicas com os identificados em outras regiões do mundo;
- Identificar protozoários do subfilo Apicomplexa em tecido cardíaco de saguis (*Callithrix jacchus*) coletados no continente, no estado de Pernambuco.

5 CAPÍTULO 1

Artigo publicado no Periódico Parasitology Research

Fator de Impacto: 2.067

DOI: 10.1007/s00436-019-06522-4



Atypical *Toxoplasma gondii* genotype from a sheep and a pig on Fernando de Noronha Island, Brazil, showed different mouse virulence profiles

Renata Pimentel B. Melo¹ · Jonatas C. Almeida¹ · Débora C. V. de Lima¹ · Jéssica C. S. Carvalho¹ · Wagner J. N. Porto² · Fernando J. R. Magalhães³ · Clare M. Hamilton⁴ · Frank Katzer⁴ · Rinaldo A. Mota¹

Received: 13 June 2019 / Accepted: 23 October 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Toxoplasma gondii is a zoonotic parasite which can infect almost all warm-blooded animals. *Toxoplasma gondii* isolates from Brazil have greater genetic diversity with a predominance of virulent and atypical genotypes, compared with the Northern Hemisphere. Considering that previous studies have demonstrated a high seroprevalence of *T. gondii* antibodies in animals from Fernando de Noronha Island, the aim of this study was to isolate, genetically characterize, and determine mouse virulence of isolates of *T. gondii* from livestock from this Brazilian island. Two *T. gondii* isolates were obtained by mouse bioassay from brain from one sheep and one pig. 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 genotype of *T. gondii* (ToxoDB #146) was identified for both isolates. Genotyping of four ROP loci indicated different alleles for ROP16 and mouse virulence analysis revealed different profiles (intermediate and low virulence). This is the first report of this genotype being described in a pig and a sheep.

Keywords Mouse bioassay · Isolation · Genotyping · Virulence genes

Introduction

Toxoplasma gondii is an apicomplexan parasite capable of infecting a wide range of hosts, including mammals, birds, and humans (Tenter et al. 2000). Considering the number of host species and the widespread prevalence, it is considered to

be one of the most successful eukaryotic pathogens and represents an important public health burden worldwide (Cenci-Goga et al. 2011). Definitive hosts are members of the family Felidae and are important in the disease epidemiology since they may shed oocysts into the environment (Dubey 2010). Infection can occur by ingestion of food and water containing oocysts, by ingestion of raw or undercooked meat of intermediate hosts (containing tissue cysts) and vertically by transplacental transmission of tachyzoites (Tenter et al. 2000).

Genetic research has shown that phenotypic and genotypic profiles of *T. gondii* differ in Brazil from other countries. In Brazil, virulent isolates and atypical (non-clonal) genotypes predominate (Pena et al. 2008), while in Europe and North America, there is a clonal population structure comprising the dominant lineages (types I, II, III), as well as type 12 in North America (Lehmann et al. 2006).

It is known that polymorphic roptry proteins (ROP), which are released by the parasite upon host cell invasion, are involved in the host immune response and pathogenesis in mice (Taylor et al. 2006; Reese et al. 2011). Among these proteins, ROP18 and ROP5 have been highlighted as key determinants of virulence in the murine infection model (Shwab et al. 2016).

Section Editor: Larissa Howe

✉ Renata Pimentel B. Melo
renatapbm@gmail.com

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

² Biological and Health Science Institute, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, Tabuleiro do Martins, Maceió, Alagoas 57072-900, Brazil

³ Health Superintendence, Administração do Distrito Estadual de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brazil

⁴ Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Midlothian, Scotland EH26 0PZ, UK

Previous studies on Fernando de Noronha Island have demonstrated a high seroprevalence of *T. gondii* antibodies in domestic and wild animals (Magalhães et al. 2016a, 2016b, 2017) and genetic studies have been reported (Dubey et al. 2010; Vitaliano et al. 2014; Melo et al. 2016; Silva et al. 2017). The aim of this study was to genetically characterize and determine phenotypic virulence of *T. gondii* isolates from livestock on Fernando de Noronha Island.

Materials and methods

Study design and sampling

The research was approved by the Ethics Committee in Animal Use at Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (license number 139/2016) and was conducted according to the ethical principles of animal experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

This study was carried out on Fernando de Noronha Island (03° 45–57' S, 032° 19–41' W), Pernambuco State, northeastern Brazil, located in the Atlantic Ocean 354 km offshore from the Brazilian coast (Schulz-Neto 2004).

Blood and tissue samples were collected by convenience sampling from two pigs and two sheep slaughtered for consumption of the families. Blood samples were collected in sterile tubes without anti-coagulant and kept at room temperature (25 °C) until clots were visible, centrifuged at 1500×g for 10 min and the serum obtained was separated and kept at –20 °C until further processing. Fragments of brain and heart were collected, stored individually in plastic bags, identified, and forwarded under refrigeration within 24 h to the Laboratory of Infectious-Contagious Diseases of Domestic Animals, Recife, for analysis.

Serological analysis and mouse bioassay

Serum samples were evaluated by indirect fluorescent antibody assay (IFA) for the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies, as previously described (Camargo 1964), using a fluorescein isothiocyanate species-specific anti-IgG conjugate (SIGMA®, St. Louis, MO, USA) and samples were considered positive when the tachyzoites showed total peripheral fluorescence at a 1:64 dilution (Garcia et al. 1999). Titers were determined to the highest dilution for which fluorescence was observed around the parasite (endpoint titers). Positive and negative control sera were included on all slides.

Tissue samples from animals with an antibody titer \geq 1:64 were submitted individually for mouse bioassay as follows. Heart samples were processed with the pepsin digestion method prior to inoculation into mice (Dubey 1998). Bioassays of brain samples were conducted according to a protocol

described by Almeida et al. (2017), where the brain was macerated, homogenized with 100 mL of saline solution, filtered, and centrifuged at 1200×g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended with 50 mL of saline solution and centrifuged at 1200×g for 10 min. The supernatant was again discarded and the pellet was resuspended in 3 mL of saline solution containing 1000 IU of penicillin and 100 µg of streptomycin per milliliter. Two Swiss Webster (SW) mice were inoculated subcutaneously with 1 mL of the final product for each sample.

Mice were observed daily for clinical signs of toxoplasmosis and after 45 days were euthanized, and blood and brain samples were collected. The blood was collected by submandibular bleeding, centrifuged at 500×g for 10 min and the serum was evaluated by IFA (cut-off \geq 1:16) for the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies, as previously described (Camargo 1964). Imprints of the brain were microscopically examined for *T. gondii* tissue cysts and positive samples were inoculated into in vitro cultures of MARC-145 cells. Mice with severe clinical signs were euthanized and a peritoneal lavage was performed to recover tachyzoites and inoculated into MARC-145 cells to establish an isolate for the virulence study.

Genetic characterization of *T. gondii* by multilocus PCR-RFLP

DNA was extracted from tachyzoites in cell culture using the commercial kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to manufacturer's recommendations. Genotyping was performed by multiplex nested PCR-RFLP targeting 10 genetic markers (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, and Apico) as previously described (Su et al. 2010; Hamilton et al. 2015). The genotype was determined using RFLP banding profiles and compared with reference strains RH (type I), M4 (type II variant; used for all markers except Apico where type II strain ME49 was used instead), and NED (type III) (Burrells et al. 2013). The results were determined, 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 SplitsTree4 software was used for phylogenetic analysis (Huson and Bryant 2006) of the genotype obtained in the present study and others previously isolated in Brazil and in other regions of the world.

Rhoptry proteins (ROP5, ROP16, ROP17, and ROP18) were genotyped using PCR-RFLP methods as described by Shwab et al. (2016).

Mouse virulence analysis

In vivo virulence analysis was performed following the protocol described by Saraf et al. (2017). Tachyzoites were obtained from cell culture, counted using Trypan blue, and diluted to 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , and 2×10^1 tachyzoites/mL using sterile PBS. Each dilution was inoculated intraperitoneally (IP) into five Swiss Webster mice (25–30 g body weight) that were monitored twice daily for 30 days and evaluated for clinical signs of toxoplasmosis.

To confirm the infection, blood samples were collected by the submandibular bleeding method to obtain serum for the detection of IgG antibodies by IFA (cut-off $\geq 1:16$) (Camargo 1964). Mice with signs of severe clinical toxoplasmosis were euthanized. Cumulative mortality was determined for each isolate using the top three inoculation doses. Virulence was determined according to Pena et al. (2008) and classified as virulent (100% mortality), intermediate virulence (mortality between ≥ 30 and $< 100\%$), and avirulent ($< 30\%$).

Results and discussion

Anti-*T. gondii* IgG antibodies were found in two pigs and two sheep slaughtered for human consumption on Fernando de Noronha Island. For each animal, two mouse bioassays were performed, one for the brain and one for the heart. Two *T. gondii* isolates were obtained from the brain samples, one from a pig with an antibody titer of 1:64 and one from a sheep with a titer of 1:128 (isolation rate of 50%). No isolates were obtained using heart tissues in the mouse bioassays. This is the first report of *T. gondii* isolates from a sheep and a pig raised and slaughtered on Fernando de Noronha Island. In this region, pig and sheep production is practiced by small producers, composed of local families, to obtain milk and meat for subsistence (Pemambuco 2015). There is no slaughterhouse on the island and the animals are slaughtered in the property under island governance authorization.

The two mice inoculated with brain tissue from sheep 1 remained asymptomatic during the monitoring period, and tissue cysts were observed in the brain and an anti-*T. gondii* IgG antibody titers of 1:512 were detected in both animals. Mice brains were cultured in MARC-145 cells and in only one sample (from mouse 1) tachyzoites were observed in cell culture and were maintained for posterior analysis. One mouse inoculated with brain samples from pig 2 showed clinical signs compatible with acute toxoplasmosis at day 9 post inoculation (p.i.), such as bristly hair, abdominal pain, photophobia, conjunctivitis, and diarrhea. This mouse was euthanized at day 10 p.i. and tachyzoites in peritoneal lavage fluid were cultured in MARC-145 cells for maintenance of the isolate. The other mouse inoculated with the same brain sample did not present any clinical signs and tissue cysts were observed in

the brain, which was cultured in MARC-145 cells. An anti-*T. gondii* IgG antibody titer of 1:16 was detected in both mice.

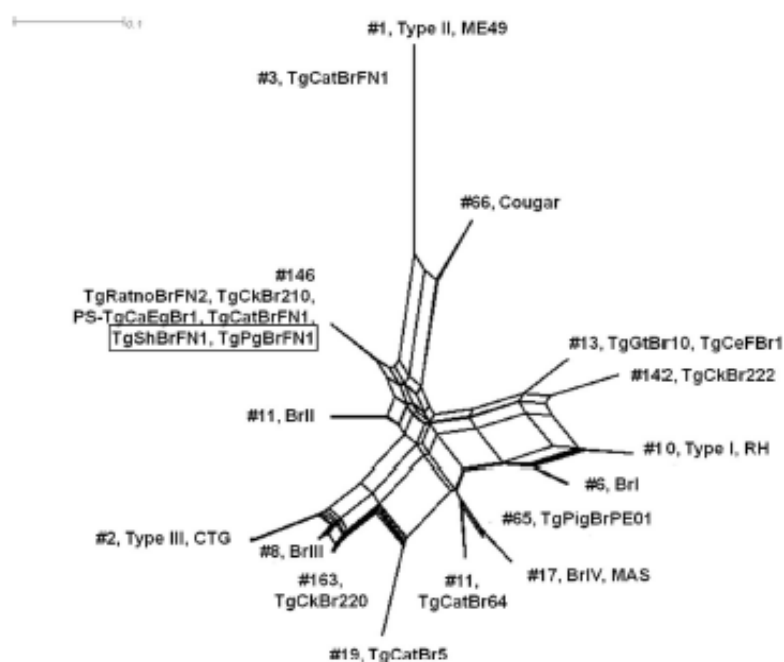
The two isolates obtained by mouse bioassay were designated as TgShBrFN1 and TgPgBrFN1, respectively the sheep and pig isolates. Genotype characterization with multilocus PCR-RFLP markers revealed the genotype ToxoDB #146, an atypical strain, which has been reported in a few host species from Fernando de Noronha Island. This genotype was previously identified in free-ranging chickens (Dubey et al. 2010), a cattle-egret (*Bubulcus ibis*) (Vitaliano et al. 2014), a feral cat (Melo et al. 2016), brown rats (*Rattus norvegicus*), and black rats (*Rattus rattus*) (Silva et al. 2017; Lima et al. 2019) from the same island. Identification of genotype #146 in different species suggests that this genotype is dominant on Fernando de Noronha Island. Recently, the same genotype was reported in goats in Piauí state (located 1.161 km away from the island), northeastern Brazil, being the first description in animals raised on the mainland (Rêgo et al. 2017). To the best of our knowledge, this is the first description of this genotype in pigs or sheep worldwide.

The phylogenetic networks displayed in Fig. 1 show that genotype #146 is closely related to genotype ToxoDB #11 (Br1) and more distant from the clonal lineages and other atypical genotypes reported from the island so far. The genotypic profile of *T. gondii* from Fernando de Noronha Island is described as genetically limited and endemic (Silva et al. 2017). Up until the present moment, clonal lineages types II and III and atypical genotypes #13, #142, #146, #153, and #163 (Dubey et al. 2010; Melo et al. 2016; Silva et al. 2017), and #78, #260, and #291 (Lima et al. 2019) have been reported on this Island. Noteworthy, clonal lineage type II was described on Fernando de Noronha Island, despite being quite rare in Brazil. Microsatellite analysis showed that genotype #146 is related to clonal type III (Silva et al. 2017); however, phylogenetic analysis using RFLP molecular markers indicates that it is not closely related to the type III strain, suggesting a specific evolution for this genotype.

The dosages 2×10^4 , 2×10^3 , and 2×10^2 tachyzoites/mL were used for calculating cumulative mortality and it was based on the number of mice died divided by the number of mice infected. In vivo virulence analysis of isolate TgShBrFN1 indicated an intermediate virulence with a mortality rate of 33% $[(2 + 2 + 1)/(5 + 5 + 5) = 5/15 = 33\%]$. Five inoculated mice showed severe clinical signs of acute toxoplasmosis and were euthanized between 13 and 15 days p.i. Regarding isolate TgPgBrFN1, the in vivo virulence analysis revealed an avirulent strain with a mortality rate of 13% $[(1 + 0 + 1)/(5 + 5 + 5) = 2/15 = 13\%]$. In vivo virulence analysis is shown in Table 1.

Despite being characterized as the same genotype, mouse virulence analysis of the isolates obtained in this study indicated differences in phenotypic virulence. Isolate TgShBrFN1 showed intermediate virulence, while isolate TgPgBrFN1 was

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates TgShBrFN1 and TgPgBrFN1 characterized by RFLP-PCR, with the following strains used as references: RH, ME49, CTG, BrI, BrII, BrIII, BrIV, MAS, Cougar, TgCatBr5, TgCatBr64, TgCkBr220, TgPigBrPE01, TgCeFBR1, TgGtBr10, TgCatBrFN1



classified as avirulent. In a previous study, mouse virulence analysis of six *T. gondii* isolates obtained from goats and characterized as genotype #146 indicated an avirulent profile. The dosages used were 10^0 , 10^1 , 10^2 , and 10^3 , which are different from our study (Rêgo et al. 2017). Another study performed with isolates from black rats (*Rattus rattus*) from Fernando de Noronha Island also observed intermediate virulence for isolates characterized as genotype #146 (Lima et al. 2019). Difference in mouse virulence of isolates with the same genotype has been described previously (Rêgo et al. 2017). Thus, genetic characterization of *T. gondii* isolates based solely on 10 genotypic markers recommended by Su et al. (2010) seems to be insufficient to evaluate the phenotypic virulence profile of an isolate in animals.

In order to correlate genetic and in vivo virulence characteristics, studies have been conducted to elucidate the role of polymorphic rhoptry gene sequences in the pathogenesis of infection (Etheridge et al. 2014). ROP5 and ROP18 are described as key determinants of virulence in murine hosts (Taylor et al. 2006; Reese et al. 2011). ROP16 and ROP17 were associated with modulation of the host immune response to parasite invasion in mice (Yamamoto et al. 2009; Li et al. 2019). Genotyping of the rhoptry protein genes has shown that both isolates had the same profile for ROP5, ROP18, and ROP17, being identified as alleles 3, 3, and 1, respectively. For ROP16, the *T. gondii* isolate from sheep 1 exhibited allele 3 and the isolate from pig 2 was characterized as allele 1. The ROP18/ROP5 allelic profile of 3/3 was described to be

Table 1 In vivo virulence analysis of *Toxoplasma gondii* isolates TgShBrFN1 and TgPgBrFN1 obtained from a sheep and a pig on Fernando de Noronha Island, Brazil

Isolates	Dosages	No. of mice					Day of death p.i.	Level of virulence
		Survived	Seronegative	Seropositive	Died	Infected		
TgShBrFN1	2×10^4	3	0	5	2	5	13;14	33% intermediate virulence
	2×10^3	3	0	5	2	5	15	
	2×10^2	4	0	5	1	5	15	
	2×10^1	5	0	5	0	5	-	
TgPgBrFN1	2×10^4	4	0	5	1	5	13	13% avirulent
	2×10^3	5	0	5	0	5	-	
	2×10^2	4	0	5	1	5	18	
	2×10^1	4	0	5	1	5	18	

p.i. post inoculation

6 CAPÍTULO 2

Artigo submetido ao Periódico *Zoonoses and Public Health*

Fator de impacto: 2.164

Description of an atypical *Toxoplasma gondii* isolate causing human congenital toxoplasmosis in Northeastern Brazil

Renata Pimentel Bandeira de Melo^a, Flaviana Santos Wanderley^b, Wagner José Nascimento Porto^c, Camila de Moraes Pedrosa^d, Clare M. Hamilton^e, Maria Heloísa Gomes Silva de Oliveira^d, Müller Ribeiro-Andrade^a, Renata Camila da Silva Rêgo^b, Frank Katzer^c, Rinaldo A. Mota^a

^aDepartment of Veterinary Medicine, Laboratory of Infectious-Contagious Diseases of Domestic Animals, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, 52171-900, Brazil.

^bLaboratory of Parasitic Infectious Diseases, Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Rua Jorge de Lima, 113, Trapiche da Barra, Maceió, Alagoas, 57010382, Brazil.

^cBiological and Health Science Institute, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, Tabuleiro do Martins, Maceió, Alagoas, 57072-900, Brazil.

^dViçosa Educacional Unit, Universidade Federal de Alagoas, Av. Firmino Maia, Fazenda São Luiz, Viçosa, Alagoas, 57309-005, Brazil.

^eMoredun Research Institute, Pentlands Science Park, Midlothian EH26 0PZ, Scotland, United Kingdom.

Acknowledgments

We thank Obstetrics Department of Professor Alberto Antunes University Hospital, Laboratory of Clinical Analysis of Universidade Federal de Alagoas, especially to Dr. Arliete Ramos Sales Mendes de Barros for the support in collecting the samples.

We would like to thank *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), Brazil, for the scholarship (SWE - Grant number 206740/2017-4) and *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for the PhD scholarship (IBPG-1358-5.05./15).

Abstract

Toxoplasma gondii, a widespread zoonotic protozoan parasite, can cause congenital infection with variable clinical consequences for the fetus. Disease severity can depend on parasite isolate, infective dose and gestational age of infection. We report a case of severe congenital toxoplasmosis that involved an atypical *T. gondii* genotype in a newborn baby from Alagoas state in Northeastern Brazil. A pregnant woman presented IgM and IgG anti-*T. gondii* antibodies, as detected by the chemiluminescence immunoassay on the second-trimester of pregnancy. A mouse bioassay was performed using umbilical cord blood and one isolate was generated. The isolate was designated TgCTBrAL1 and genetic characterization revealed genotype ToxoDB #162. Genotype results of the rhostry genes, ROP5 and ROP18 could predict the high virulence of the isolate in mice, which was confirmed by an *in vivo* virulence assay. This is the first report of generating a *T. gondii* isolate from a newborn baby with congenital toxoplasmosis in Northeastern Brazil.

Keywords: Genotyping; mouse bioassay; newborn; virulence

Impacts

The present study addresses the association of disease manifestations, parasite genetic characteristics and virulence in mice.

We report a case of severe congenital toxoplasmosis that involved the atypical *T. gondii* genotype ToxoDB #162 in a newborn baby from Alagoas state in Northeastern Brazil. This is the first report of successful *T. gondii* isolation from a newborn baby with congenital toxoplasmosis in this geographic region.

Genotype results of the rhostry genes (ROP5 and ROP18) could predict the high virulence of the isolate in mice, which was confirmed by an *in vivo* virulence assay.

Introduction

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite with a wide distribution that infects warm-blooded animals, including humans (Dubey, 2010). In general, it causes an asymptomatic infection in immunocompetent individuals; however, primary infection in a pregnant woman can lead to congenital toxoplasmosis (CT) and development of variable clinical signs (McAuley, 2014). Maternal infection during the first and second trimester may result in severe clinical disease, such as fetal death and abortion (Elbez-Rubinstein et al., 2013). The classic triad of congenital toxoplasmosis is characterized by chorioretinitis, intracranial calcifications, and hydrocephalus (McAuley, 2014).

During recent years, genetic characterization studies have advanced the understanding of the role of parasite genotype in determining disease severity (McAuley, 2014). The population structure of *T. gondii* is characterized by high genetic diversity, including a predominance of clonal lineages (Type I, II and III) in Europe and North America, as well as atypical (non-clonal) genotypes, which are most common in Latin America (Rajendran et al., 2012). Atypical genotypes are often involved in more severe cases of congenital toxoplasmosis in comparison to CT caused by the classical genotypes (Delhaes et al., 2010).

Polymorphic rhoptry proteins (ROP) are involved in cellular invasion by the parasite, are targeted by the host's immune responses and are linked to differential pathogenesis in mice (Taylor et al., 2006; Reese et al., 2011). ROP18 and ROP5 have been highlighted as the key determinant for virulence in the murine model (Shwab et al., 2016). ROP17 interacts with ROP5 and contributes to the evasion of parasite clearance by host cells (Etheridge et al., 2014), and ROP 16 plays a role in modulating the host response to parasite invasion in mice (Yamamoto et al., 2009).

The aim of this study was to isolate and characterize (biologically and genetically) the *T. gondii* isolate causing acute congenital toxoplasmosis in a human baby in Northeastern Brazil.

Materials and Methods

Ethics aspects

The registration of research involving human subjects was conducted according to the resolution 466 of National Health Council (Brasil, 2012) and was submitted to the Brazil Platform (national and unified database for record of research involving humans in Brazil), and approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (protocol number CAAE 46340415.9.0000.5011). All experiments performed on mice were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on the use of animals at Universidade Federal Rural de Pernambuco (license number 139/2016).

History and serological analysis

A 20-year-old pregnant woman, gave birth at 36 weeks to her first child, a newborn male baby, by cesarean delivery at Professor Alberto Antunes University Hospital (HUPPA), located in Maceió city, Alagoas state, Brazil.

The pregnant woman attended five prenatal consultations at Basic Health Care Unit and acute toxoplasmosis was detected by the presence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies at 5 months (IgM 5.3 UI/mL) and 7 months of pregnancy (IgM 6.43 UI/mL; IgG <200 UI/mL) by Chemiluminescence immunoassay (Cobas® and 411, Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, Brazil). Standard procedures for pregnant women in Brazil include at least six prenatal consultations and a serological exam for toxoplasmosis during the first attended consultation (Brasil, 2006). The pregnant woman had an incomplete elementary school education; the gestational monitoring was only partially completed and no treatment was initiated during pregnancy. This may have been due to difficulties in communicating with the woman.

A blood sample from the newborn was collected on the day of the birth, submitted for a complete blood count (CBC) and used to investigate antibodies against congenital infectious diseases, such as toxoplasmosis. The Chemiluminescence immunoassay result showed a positive result for *T. gondii* (IgM 41.04 UI/mL; IgG 650 UI/mL), confirming congenital toxoplasmosis. The CBC showed anisocytosis, thrombocytopenia (platelet count, 34.000 platelets/mm³) and polychromasia. Clinical exam, cranial ultrasound and cerebral computed tomography imaging tests demonstrated microcephaly, hydranencephaly, areas of calcification in the brain, partial hearing loss, ambiguous genitalia, retinitis and retinal detachment. This serious clinical condition led the death of the child when he was five months old.

Mouse bioassay

Umbilical cord blood (volume of 1 mL) was collected immediately after birth to perform a mouse bioassay. The sample was diluted with 1 mL PBS (pH 7.2) and centrifuged at 700 x g for 10 min. The supernatant was carefully discarded and the pellet resuspended in PBS and centrifuged again. The supernatant was discarded and the final pellet was resuspended in PBS containing antibiotic (1.000 IU of penicillin and 100 mg of streptomycin per mL) and inoculated intraperitoneally into three Swiss Webster mice. Mice were observed twice daily for signs of *Toxoplasma* infection and were euthanized either when they showed signs of severe toxoplasmosis or on day 45 post-inoculation (d.p.i). Blood samples were

collected from mice by submandibular bleeding, centrifuged at 500 x g for 10 min and the serum was evaluated by indirect fluorescent antibody assay (IFA) (cut-off ≥ 16) for the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies, as previously described (Camargo, 1964). Imprints of the brain and peritoneal lavage were microscopically examined for *T. gondii* tissue cysts and tachyzoites, respectively. Positive lavage samples were inoculated into *in vitro* cultures of MA-104 (ATCC[®] CRL-2378.1) in an attempt to generate an isolate (Lima et al., 2019).

Genetic characterization and markers for virulence

DNA was extracted from *in vitro* derived tachyzoites using the NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany) DNA extraction kit following the manufacturer's instructions. Genotyping was performed by multiplex nested PCR-RFLP targeting 10 genetic markers (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 and Apico) as previously described (Su et al., 2010, Hamilton et al., 2016). The genotype of the isolate was determined using RFLP banding profiles of reference strains RH (Type I), M4 (Type II variant; used for all markers except Apico where Type II strain Me49 was used instead) and NED (Type III) (Burrels et al., 2013). The genotype number was determined by comparing its multilocus genotype to the 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 SplitsTree4 software was used for phylogenetic reconstruction (Huson and Bryant, 2006) between the genotype obtained in the present study and others previously isolated in Brazil and other parts of the world. Rhoptry proteins (ROP5, ROP16, ROP17 and ROP18) were genotyped using PCR-RFLP methods as described by Shwab et al. (2016).

Mouse virulence analysis

In vivo virulence analysis was performed according to protocol described by Saraf et al. (2017). Tachyzoites obtained from cell culture were counted using Trypan blue and diluted to 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 and 2×10^1 tachyzoites/mL using sterile PBS. Each dilution was inoculated intraperitoneally (IP) into five Swiss Webster mice that were monitored twice daily for 30 days and evaluated for clinical signs.

To confirm the infection, blood samples were collected to obtain serum for the detection of IgM and IgG antibodies by IFA (cut-off $\geq 1:16$) (Camargo, 1964). Mice with signs of severe clinical toxoplasmosis were euthanized. The virulence classification of the

isolate was determined in accordance with the classification by Pena et al. (2008) where an isolate was classified as virulent (100% mortality), intermediate virulence (mortality between $\geq 30\%$ and $< 100\%$) and avirulent ($< 30\%$ mortality).

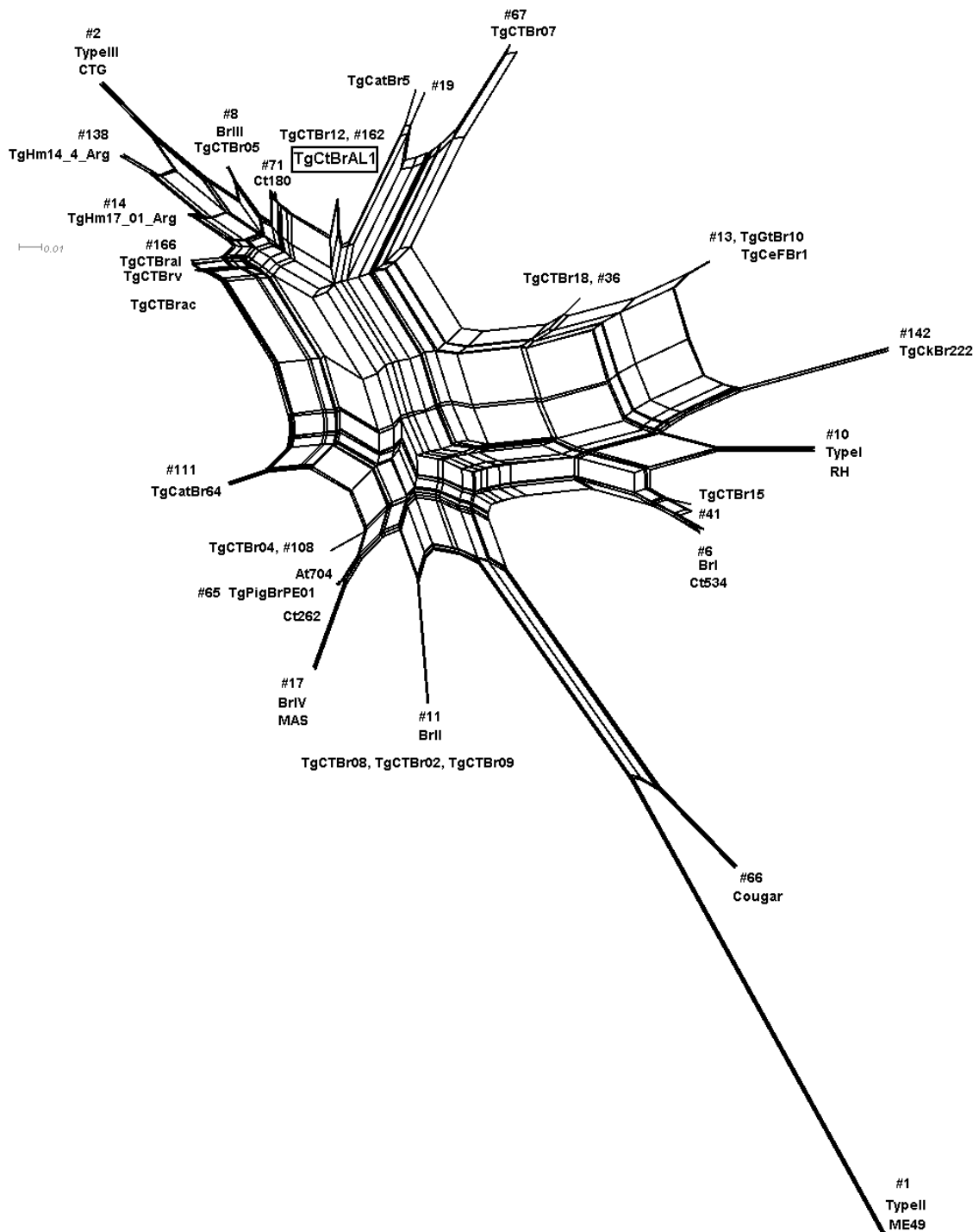
Results and discussion

A *T. gondii* isolate was obtained by mouse bioassay using umbilical cord blood. Two mice inoculated with the umbilical cord blood showed the first clinical signs at day 15 post-infection (p.i.), which were compatible with toxoplasmosis, such as apathy, bristly hair, photophobia, abdominal pain, weight loss. These mice were euthanised at day 18 p.i. and tachyzoites in peritoneal lavage fluid were cultured in MA-104 (ATCC[®] CRL-2378.1) for isolate maintenance. An anti-*T. gondii* IgG antibody titer of 1:256 was detected in all three mice.

This is the first report of successful *T. gondii* isolation from a newborn baby with congenital toxoplasmosis in Northeastern Brazil. The isolate obtained was designated TgCTBrAL1. Genetic characterization with multilocus PCR-RFLP markers revealed the atypical genotype ToxoDB #162, that was previously described in a newborn with congenital toxoplasmosis in Minas Gerais (MG), Southeastern Brazil (Carneiro et al., 2013), a capybara in MG (Yai et al., 2009), a bat in São Paulo (Cabral et al., 2013) and chickens in Espírito Santo (Pena et al., 2013), Brazil. This is the second report of *T. gondii* genotype #162 being involved in a congenital toxoplasmosis case in Brazil and it confirms the capacity of this genotype to cause severe damage.

The phylogenetic analysis networks (Figure 1) show that genotype #162 is closely related to clonal lineage type III (ToxoDB #2) and isolate BrIII (ToxoDB #8). This is interesting because these genotypes were previously described as non-virulent in mice (Pena et al., 2008).

Figure 1 NeighborNet phylogenetic network of *Toxoplasma gondii* isolate TgCTBrAL1 characterized by RFLP-PCR, with the following strains used as references: RH, ME49, CTG, BrI, BrII, BrIII, BrIV, MAS, Cougar, TgCatBr5, TgCatBr64, TgCTBr04, TgCTBr07, TgCTBr12, TgCTBr15, TgCTBr18, TgCTBrv, TgCTBraI, TgCTBrac, TgCkBr222, TgPgBrPE01, TgCeFBr1, CT180, At704



Virulence of *T. gondii* strains in mice appears to be correlated with disease manifestations in humans, so the determination of *T. gondii* virulence in the murine model could be useful to predict potential outcomes of human infection (Xiao and Yolken, 2015). Regarding *in vivo* virulence analysis, all mice infected with different doses of tachyzoites (2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 tachyzoites/mL) were euthanized within 11 days p.i., resulting in a mortality rate of 100%, which indicates a high virulence profile for mice (Table 1). The

animals inoculated with the higher dose (2×10^4 tachyzoites/mL) presented clinical signs at day 4 p.i. compatible with acute toxoplasmosis: bristly hair, abdominal pain, photophobia and conjunctivitis. Dyspnoea and lethargy were observed at day 5 p.i and the first euthanizations were at 6 days p.i. Similar clinical signs were observed in mice inoculated with the other dilutions between 2-3 days before they were euthanized. Diarrhea was observed only in mice inoculated with the lower dose at day 8 p.i. Detection of anti-*T.gondii* IgM antibodies was performed due to the early deaths and were detected in all inoculated mice. Anti-*T.gondii* IgG antibodies were detected in mice from 8 days p.i. with lower titers (1:16).

The virulence of *T. gondii* can be affected by some factors including stage of the parasite inoculated, dose, route of inoculation, mouse lineage and the parasite strain (Dubey et al., 2002). Review of the literature reporting CT cases indicated that atypical strains are associated with more severe clinical manifestations than with clonal type II strains (Delhaes et al., 2010). A study conducted between 2006 and 2007 in MG State obtained 27 isolates from newborn babies with congenital toxoplasmosis (Carneiro et al., 2013). One isolate (TgCTBr12) was characterized as the same genotype (#162) as the isolate in our study and an intermediate virulence in mice was described. However, the dosages analysed (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 tachyzoites/mL) were different and this may be the reason of the divergence. As well as in our study, Carneiro et al. (2013) described retinochoroidal lesions and intracranial calcifications in newborn babies infected with genotype #162.

The main polymorphic rhoptry protein genes associated with mouse virulence were analysed. Genotyping of ROP genes revealed allele 4 was identified for ROP5, ROP18 and ROP17 and allele 1 for ROP16. Shwab et al. (2016) demonstrated a correlation between mouse virulence and the combination of these ROP18 and ROP5 alleles. However, this association was not observed for the ROP16 and ROP17 loci. In our study, allele 4 was identified for ROP5 and ROP18 and this profile is strongly associated with high virulence in mice (Shwab et al., 2016), which was confirmed by the mouse virulence analysis in this study.

The present study addresses the association of disease manifestations, parasite genetic characteristics and virulence in mice, which may help in the development of improved diagnostics and treatments and also for designing epidemiological studies.

Table 1. Results of *in vivo* virulence of *Toxoplasma gondii* isolate TgCTBrAL1 obtained from newborn with congenital toxoplasmosis in Alagoas state, northeastern of Brazil

Isolate	Dosages	Mice survived	Mice seronegative	Mice seropositive	No. mice euthanized	No. mice infected	Day euthanized	Level of virulence
TgCTBrAL1	2x10 ⁴	0	0	5	5	5	6;6;6;7;7	100%
	2x10 ³	0	0	5	5	5	8;8;8;8;8	High virulence
	2x10 ²	0	0	5	5	5	8;8;9;10;10	
	2x10 ¹	0	0	5	5	5	10;10;11;11;11	

Conflict of interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Brasil. Ministério da Saúde. (2006). *Pré-natal e Puerpério: atenção qualificada e humanizada – manual técnico* (Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos – Caderno nº 5). Brasília. Available on:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_pre_natal_puerperio_3ed.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. (2012). *Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012*. Brasília. Available on:
<https://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>
- Burrells, A., Bartley, P. M., Zimmer, I. A., Roy, S., Kitchener, A. C., Meredith, A., Wright, S. E., Innes, E. A., Katzer, F. (2013). Evidence of the three main clonal *Toxoplasma gondii* lineages from wild mammalian carnivores in the UK. *Parasitology*, 140(14), 1768-1776. doi: [10.1017/S0031182013001169](https://doi.org/10.1017/S0031182013001169).
- Cabral, A. D., Gama, A. R., Sodré, M. M., Savani, E. S. M. M., Galvão-Dias, M. A., Jordão, L. R., Maeda, M. M., Yai, L. E. O., Gennari, S. M., Pena, H. F. J. (2013). First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). *Veterinary Parasitology*, 193, 100–104. doi: [10.1016/j.vetpar.2012.11.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.015).
- Camargo, M.E. (1964). Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6, 117–118.
- Carneiro, A. C. A. V., Andrade, G. M., Costa, J. G. L., Pinheiro, B. V., Vasconcelos-Santos, D. V., Ferreira, A. M., Su, C., Januário, J. N., Vitor, R. W. A. (2013). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in Southeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (3), 901–907. doi: [10.1128/JCM.02502-12](https://doi.org/10.1128/JCM.02502-12).
- Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Darde, M. L., Dei-Cas, E., Houfflin-Debarge, V. (2010). Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenatal Diagnosis*, 30 (9), 902–905. doi: [10.1002/pd.2563](https://doi.org/10.1002/pd.2563).
- Dubey, J. P., Graham, D. H., Blackston, C. R., Lehmann, T., Gennari, S. M., Ragozo, A. M. A., Shen, S. K., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., Thulliez, P. (2002). Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *International Journal for Parasitology*, 32, 99–105. doi: [10.1016/s0020-7519\(01\)00364-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00364-2).
- Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*. (2nd ed). CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., Gondon, E., Janaud, J. C., Thulliez, P. (2009). Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *The Journal of Infectious Diseases*, 199, 280–285. doi: [10.1086/595793](https://doi.org/10.1086/595793).
- Etheridge, R. D., Alaganan, A., Tang, K., Lou, H. J., Turk, B. E., Sibley, L. D. (2014). The *Toxoplasma* pseudokinase ROP5 forms complexes with ROP18 and ROP17 kinases that synergize to control acute virulence in mice. *Cell Host Microbe*. 15, 537-550. doi: [10.1016/j.chom.2014.04.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.002).
- Hamilton, C. M., Kelly, P. J., Bartley, P. M., Burrells, A., Porco, A., Metzler, D., Crouch, K., Ketzis, J. K., Innes, E. A., Katzer, F. (2015). *Toxoplasma gondii* in livestock in St. Kitts and Nevis, West Indies. *Parasites & Vectors*, 8:166, 1-9. doi: [10.1186/s13071-015-0776-7](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0776-7).
- Huson, D. H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254-267. doi: [10.1093/molbev/msj030](https://doi.org/10.1093/molbev/msj030).
- Lima, D. C. V., Melo, R. P. B., Almeida, J., Magalhães, F. J. R., Ribeiro-Andrade, M., Pedrosa, C. M., Oliveira, C. A. V., Porto, W. J. N., Su, C., Mota, R. A. (2019). *Toxoplasma gondii* in invasive animals on the Island of Fernando de Noronha in Brazil: Molecular characterization and mouse virulence studies of new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 67, 101347. doi: [10.1016/j.cimid.2019.101347](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101347).
- McAuley, J. B. (2014). Congenital Toxoplasmosis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 3 (1), S30–S35. doi: [10.1093/jpids/piu077](https://doi.org/10.1093/jpids/piu077).
- Pena, H. F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, 38(5), 561-569. doi: [10.1016/j.ijpara.2007.09.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004).
- Pena, H. F. J., Vitaliano, S. N, Beltrame, M. A. V, Pereira, F. E. L, Gennari, S. M, Soares, R. M. (2013). PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. *Veterinary Parasitology*, 192, 111– 117. doi: [10.1016/j.vetpar.2012.10.004](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.004).
- Rajendran, C., Su, C., Dubey, J. P. (2012). Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 359–368. doi: [10.1016/j.meegid.2011.12.010](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.010).
- Reese, M. L., Zeiner, G. M., Saeij, J. P., Boothroyd, J. C., Boyle, J. P. (2011). Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in *Toxoplasma* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 9625–9630. doi: [10.1073/pnas.1015980108](https://doi.org/10.1073/pnas.1015980108).
- Shwab, E. K., Jiang, T., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Su, C. (2016). The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 46(2), 141-146. doi: [10.1016/j.ijpara.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.10.005).

Saraf, P., Shwab, E. K., Dubey, J. P., Su C. (2017). On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Experimental Parasitology*, 174, 25-30. doi: [10.1016/j.exppara.2017.01.009](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.009).

Taylor, S., Barragan, A., Su, C., Fux, B., Fentress, S. J., Tang, K., Beatty, W. L., Hajj, H. E., Jerome, M., Behnke, M. S., White, M., Wootton, J. C., Sibley, L. D. (2006). A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Science*, 314, 1776–1780. doi: [10.1126/science.1133643](https://doi.org/10.1126/science.1133643).

Xiao, J., Yolken, R. H. (2015). Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 213(4), 828-45. doi: [10.1111/apha.12458](https://doi.org/10.1111/apha.12458).

Yai, L. E. O, Ragozo, A. M. A., Soares, R. M., Pena, H. F. J., Su, C., Gennari, S. M. (2009). Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 162, 332–337. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.03.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.007).

Yamamoto, M., Standley, D. M., Takashima, S., Saiga, H., Okuyama, M., Kayama, H., Kubo, E., Ito, H., Takaura, M., Matsuda, T., Soldati-Favre, D., Takeda, K. (2009). A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 2747–2760. doi: [10.1084/jem.20091703](https://doi.org/10.1084/jem.20091703).

7 CAPÍTULO 3

Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in heart tissue from common marmoset (*Callithrix jacchus*) monitored for yellow fever and rabies in Pernambuco state, Northeastern of Brazil

Abstract

Toxoplasma gondii is an intracellular coccidian capable of infecting a wide range of warm-blooded animals, including domestic and wild animal, besides humans. New World monkeys (NWM) are highly susceptible to toxoplasmosis, which is a conservation concern as high susceptibility and mortality has been reported in captive NWM in different countries. We report *T. gondii* DNA (7/39 - 17,9%) in common marmoset (*Callithrix jacchus*) collected for yellow fever and rabies surveillance program in Northeastern region of Brazil. As toxoplasmosis in NWM is predominantly acute and fatal, we suggest including this parasite in the differential diagnosis of yellow fever and rabies in the Northeastern region of Brazil.

Introduction

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan with a wide range of warm-blooded animals as intermediate hosts and felids as definitive hosts (Tenter et al., 2000). Animals and humans can be infected by ingesting food or water contaminated with *T. gondii* oocysts or consuming *T. gondii* tissue cysts from raw or undercooked meat (Dubey and Beattie, 1988).

Limited information is available concerning the prevalence of *T. gondii* in non captive monkeys, though serological research evidenced *T. gondii* antibodies in different monkey species worldwide (Molina et al., 2014; Ferreira et al., 2015; Tidy et al., 2017; Cano-Terriza et al., 2019). New World monkeys (NWM) are highly susceptible to toxoplasmosis (Lindsay and Dubey, 2007), particularly squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), in which acute disease have been reported (Dietz et al., 1997; Inoue, 1997; Epiphonio et al., 2003). However, NWM can die suddenly, without obvious symptoms (Dubey and Beattie, 1988).

Toxoplasmosis in nonhuman primates is a conservation concern as high susceptibility and mortality has been reported in captive NWM and lemur species in different countries (Dubey, 2010). In Brazil, Ferreira et al. (2015) performed a serological study in captive monkeys from Northeastern, using Modified Agglutination Test (MAT, cut-off ≥ 25), and detected anti-*T. gondii* antibodies in 85.3% (99/116) of *Sapajus libidinosus*, 55.6% (5/9) of *S.*

flavius, 80.0% (4/5) of *S. apella*, and 75.0% (3/4) of *Sapajus* spp. Molina et al. (2014) reported frequencies of 75% (15/20) in *Alouatta caraya* and 16,6% (8/48) in *Callithrix penicillata* from a forest fragment of the Brazilian Cerrado, São Paulo state. Another study reported isolation and genetic characterisation of *T. gondii* from young male red handed howler monkey (*Alouatta belzebul*) from a zoo in Northeastern of Brazil (Pena et al., 2011). Recently, in Argentina, Pardini et al. (2015) described an outbreak of acute fatal toxoplasmosis in a colony of blackcapped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*) from La Plata zoo, being the first report of fatal toxoplasmosis in *Saimiri boliviensis* caused by an atypical *T. gondii* genotype.

Brazil is considered to be the country with the greatest biodiversity on the planet, accounting for the highest numbers of both terrestrial vertebrates and invertebrates in the world (Lambertini, 2000) and little is known about toxoplasmosis in wild animals. In this study, we described *T. gondii* DNA in common marmoset (*Callithrix jacchus*) collected for yellow fever and rabie surveillance program in Northeastern region of Brazil.

Material and methods

Sampling

This study was authorized by Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade (SISBIO) under license n° 69664-1.

Biological samples from 39 free-ranging common marmoset (*C. jacchus*) found death were sent to Medicine Veterinary Department of Universidade Federal Rural de Pernambuco by municipal units of Department of Ambiental Surveillance of Metropolitan Region of Recife, Brazilian Northeastern, for monitoring of yellow fever and rabies. After necropsy, fragments of heart were collect to perform molecular detection of members of subphylum apicomplexan. Tissue samples were kept frozen until analysis.

Molecular analysis

Fristly, fragments of heart were macerated and weight (25 mg), then DNA extraction was performed using the Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega), according to manufacturer's protocol.

DNA samples were submitted to Nested Polimerase Chain Reaction (nested PCR) to amplify the 18S ribosomal DNA (rDNA) gene of apicomplexan parasites, following

methodology described by Su et al. (2010). For the first PCR reaction, the external primers Tg18s48F (5'-CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3') and Tg18s359R (5'-GTTACCCGTCCTGACCAC-3') were used, and thermal profile was comprised by initial denaturation at 94°C for 2 minutes, 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 57°C for 30 seconds, extension at 72°C for 30 seconds, followed by final extension at 72°C for 1 minute. For nested PCR, the internal primers Tg18s58F (5'-CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC-3') and Tg18s348R (5'-TGCCACGGTAGTCCAATAC-3') were used, as well as similar thermal profile as described above, modifying only the number of cycles to 35. PCR reactions were performed in a final volume of 12,5µL, including: 0,5µL of each primer at 2µM, 6,25µL of GoTaq Green Master Mix (Promega), 2,75µL of ultrapure water and 2,5µL of DNA. For the second amplification, first reaction amplicon was used as DNA.

Amplified fragment of about 300 base pairs was detected by electrophoresis in agarose gel at 2%, stained with Blue Green (LGC Biotecnologia) and fotodocumented (Loccus Biotecnologia).

Sequencing

Gel bands of positive amplicons for 18S rDNA gene were purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen), according to manufacturer's protocol. Then, the products were sequenced bi-directionally using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for sequencing were the same as those used in nested PCR (Tg18s48F and Tg18s349R). The sequencing reaction was performed by capillary electrophoretic separation on ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequencer.

Sequencing data were collected using Data Collection software (Applied Biosystems) and then quality inspection was performed using Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems). Manual editing and analysis of sequences were performed in the Staden Package 4.1.4 (Gene Codes Corporation, USA). The sequence generated by each primer was first analyzed separately and then clustered with the sequences of the same fragment to generate the consensus sequence, which was analyzed for similarity to sequences deposited in GenBank using Basic Alignment Search Tools (BLAST) in National Center for Biotechnology Information (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) to investigate species identification.

Results and discussion

Heart samples from 39 common marmoset (*Callithrix jacchus*) were analysed for the presence of 18S rDNA gene of apicomplexan parasites, and seven samples were positive. Sequencing analysis of positive samples indicated 100% similarity with *T. gondii* sequences of 18S rDNA gene (reference numbers from KX 008024.1 to KX008033.1).

Results obtained in this study indicate the presence of *T. gondii* DNA and the contact of free-ranging common marmoset (*Callithrix jacchus*) with this coccidian in Northeastern region of Brazil. These monkeys were found dead around domiciliary zones in Metropolitan Region of Recife, Brazil, and they were sent to pathology department of Universidade Federal Rural de Pernambuco as a part of yellow fever and rabies surveillance program.

To the best of authors' knowledge this is the first report of *T. gondii* presence in *Callithrix jacchus* in Brazil and the findings should alert wildlife conservation institutions, as outbreaks of fatal toxoplasmosis have been described in New World monkeys (Maluenda et al., 2009; Nishimura et al., 2019). The greater susceptibility of monkeys to *T. gondii* was suggested by Dubey et al. (2010) as a result of the evolution of these animals, where the arboreal environment reduced contact with the parasite oocysts in the soil when compared to other animal species. This increased susceptibility of NWM may lead to severe disease, including death in affected population. Thus, *T. gondii* could be involved as the cause of the death of these animals, nevertheless, it was not possible to perform immunohistochemical technique or isolation by mouse bioassay to verify the etiology of the death.

According to Pardini et al. (2015), other studies are necessary to elucidate some aspects of *T. gondii* infection in NWM, specially related to isolation, genetic and biologic characterization of *T. gondii* isolates. Finally, as toxoplasmosis in NWM is predominantly acute and fatal, we suggest including this parasite in the differential diagnosis of rabies and yellow fever in Northeastern region of Brazil.

References

CANO-TERRIZA, D.; ALMERÍA, S.; CABALLERO-GÓMEZ, J.; DÍAZ-CAO, J.M.; JIMÉNEZ-RUIZ, S.; DUBEY, J.P.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive nonhuman primates in zoos in Spain. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, p. 54–57, 2019.

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

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

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

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

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

INOUE, M. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, p. 593–595, 1997.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in Wild and Domestic Animals. In: *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan – Perspectives and Methods*. Academic Press, p. 133-152, 2007.

LAMBERTINI, M. **A Naturalist's Guide to the Tropics**. University of Chicago Press, 336 p., 2000.

MALUENDA, A.C.H.; CASAGRANDE, R.A.; NEMER, V.C., et al. Infecção aguda fatal por *Toxoplasma gondii* em macaco barrigudo (*Lagothrix lagotricha*) - relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, v. 81, p. 100–104, 2009.

MOLINA, C.V.; DIAS, J.L.; FERREIRA NETO, J.S.; VASCONCELLOS, S.A.; GENNARI, S.M.; VALLE, R.R.; SOUZA, G.O.; MORAIS, Z.M.; VITALIANO, S.N.; STREFEZZI, R.F.; BUENO, M.G. Seroepidemiological survey for brucellosis, leptospirosis, and toxoplasmosis in free-ranging *Alouatta caraya* and *Callithrix penicillata* from São Paulo State, Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 43, p. 197–201, 2014.

NISHIMURA, M.; GOYAMA, T.; TOMIKAWA, S.; FERREIG, R.M.; EL-ALFY, E.S.N.; NAGAMUNE, K.; KOBAYASHI, Y.; NISHIKAWA, Y. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. **Parasitology International**, v. 68, p.79–86, 2019.

PARDINI, L.; DELLARUPE, A.; BACIGALUPE, D.; QUIROGA, M.A.; MORÉ, G.; RAMBEAUD, M.; BASSO, W.; UNZAGA, J.M.; SCHARLES, G.; VENTURINI, M.C. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). **Parasitology International**, v. 64, p. 587–590, 2015.

PENA, H.F.J.; MARVULO, M.F.V.; HORTA, M.C.; SILA, M.A.; SILVA, J.C.R.; SIQUEIRA, D.B.; LIMA, 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.

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*. **Parasitology**, v. 137, p. 1-11, 2010.

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

TIDY, S.F.; DUBEY, J.P.; CARDOSO, L.; LOPES, A.P. Seroepidemiology and risk assessment of *Toxoplasma gondii* infection in captive wild birds and mammals in two zoos in the North of Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 235, p. 47–52, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a infecção por *Toxoplasma gondii* está presente em ovinos e suínos do Arquipélago de Fernando de Noronha ao comprovar a presença de anticorpos e a viabilidade do protozoário no tecido desses animais. Estes resultados devem alertar a população local e as autoridades sanitárias em virtude do risco para a saúde pública e animal, visto que esses hospedeiros são importantes para a cadeia epidemiológica da toxoplasmose humana, além de outros animais. Desta forma, medidas de controle baseadas na educação sanitária devem ser reforçadas para prevenir e reduzir as fontes de infecção para outros hospedeiros intermediários, sobretudo para a população humana desta Ilha.

Este estudo também traz resultados importantes sobre o primeiro relato de toxoplasmose congênita em humano da região Nordeste do Brasil, causada pelo genótipo atípico ToxoDB #162, com severas consequências para o recém-nascido. Em virtude da 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. O estudo das características fenotípicas e genéticas dos isolados obtidos neste trabalho são essenciais para elucidar a epidemiologia da infecção por *T. gondii* na região Nordeste do Brasil.

Ademais, reporta-se a presença do DNA de *T. gondii* em saguis (*Callithrix jacchus*) de Pernambuco; devido à alta suscetibilidade de primatas do Novo Mundo à toxoplasmose aguda, podendo causar inclusive morte súbita, este resultado deve servir de alerta às instituições de conservação e preservação da vida silvestre.