

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO MOLECULAR DE COCCÍDIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM
AMOSTRAS TECIDUAIS DE PEQUENOS FELÍDEOS NEOTROPICAIS DO RIO
GRANDE DO SUL

WILLIAM ALBERTO CAÑÓN-FRANCO

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO MOLECULAR DE COCCÍDIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM
AMOSTRAS TECIDUAIS DE PEQUENOS FELÍDEOS NEOTROPICAIS DO RIO
GRANDE DO SUL

Autor: William Alberto Cañón-Franco

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Parasitologia.

Orientador: Flavio Antônio Pacheco de Araújo

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Cañón-Franco, William Alberto

Detecção molecular de coccídios da família Sarcocystidae em amostras teciduais de pequenos felinos neotropicais do Rio Grande do Sul / William Alberto Cañón-Franco. -- 2013.

131 f.

Orientador: Flávio Antônio Pacheco de Araújo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. ITS-1. 2. Pequenos felinos silvestres. 3. Sarcocystis. 4. Toxoplasma. 5. Brasil. I. Pacheco de Araújo, Flávio Antônio, orient. II. Título.

William Alberto Cañón-Franco

DETECÇÃO MOLECULAR DE COCCÍDIOS DA FAMÍLIA SARCOCYSTIDAE EM
AMOSTRAS TECIDUAIS DE PEQUENOS FELÍDEOS NEOTROPICAIS DO RIO
GRANDE DO SUL

Aprovado em: _____

APROVADO POR:

Prof. Dr. Flavio Antônio Pacheco de Araújo
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari – Universidade de São Paulo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Jeronimo Ruas – Universidade Federal de Pelotas
Membro da Comissão

Prof. Dr. David Driemeier – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro da Comissão

DEDICATORIA

Triunfei porque sempre tive Deus ao meu lado, Suas mãos me levaram por caminhos difíceis, mas nunca me largou. E quando quis desistir, Nossa Senhora me abrigou em Seus braços. Pode ser que Eles não leiam as páginas desta tese, mas com certeza absoluta as páginas da minha vida sim e, hoje estarão felizes por mim.

Para a realização deste trabalho, tive muito apoio e amor divino. Por isso posso traduzir meus sentimentos, considerando-se as ordens hierárquicas. Primero Deus e logo os demais, mas devo assumir que fiquei na dúvida, porque duas mulheres mecerem também um lugar privilegiado, a Professora Solange, pela sua generosidade, não só profissional, mas em especial no aspecto pessoal - faço extensivo este sentimento de carinho a Ana, Dante e Clarice -, pois foi no seu lar, onde nos acolheram, a mim e a Natalia, nas horas certas e incertas.

E à minha razão de viver, a “Chiqui”, Natalia, Nati ou Senhora (quando ela está brava). Arrisquei tudo por você, o pouco que eu tinha. Pedi a Deus uma estrela e Ele me deu a lua... “cheinha”. Você é tudo para mim, incondicional, sempre disposta a me escutar, companheira e amiga, que teve paciência, inclusive nos frequentes momentos de desespero. Não fique longe de mim, pois sem você, sou nada. Te amo demais.

À minha família que como toda família latino-americana tem de tudo um pouco. Aos meus pais, Mariela e José Gazul, minhas irmãs, Lina e Claudia e ainda aos meus sobrinhos, Camilia e Alejandro, pela ajuda e apoio.

AGRADECIMENTOS

Tentarei não deixar ninguém no esquecimento, mas se você não estiver aqui, não se preocupe, pode ter a certeza que em meu coração, sou muito grato a todos que se fizeram presentes durante a realização desta tese.

À Universidad de Caldas na Colômbia, que facilitou o afastamento temporário para continuar minha formação profissional, a CAPES e ao programa PEC-PG, pela bolsa de estudos oferecida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou a execução do projeto.

É lógico que sem amostra não se faz nada, por isso diretores, curadores e pesquisadores das coleções biológicas têm também aqui um grato reconhecimento, Carla e Amilton da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Márcia e Fabiana da Fundação Zoobotânica; Alexandre, Eduardo e Felipe da Universidade Luterana do Brasil; Cristiano da Universidade de Caxias do Sul e Camila da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos colegas e amigos que se juntaram nesta jornada desde PAO até Pirassununga. Professor Jerónimo da UFPel; Vera e Maria da Pós-Graduação; João Ricardo do IPVDF; Lara e Rodrigo no VPS; e aos caros amigos da vida Rosane - Luciano e Pedrito, Sandra, Mary, Malheiros, Francis, Manoel e Aurea, Dyomar, Hellen.

A Felix e Renildes que me apoiaram desde o momento em que os conheci, e evitaram uma fuga em massa.

E, em especial, ao Professor Flávio, por depositar toda sua confiança, possibilitando que um projeto se transformasse nesta tese.

RESUMO

Deteção molecular de coccídios da família Sarcocystidae em amostras teciduais de pequenos felídeos neotropicais do Rio Grande do Sul.

Poucos estudos quantificam o risco relativo da saúde humana na transmissão *spillover* de doenças zoonóticas de populações de animais silvestres, estudos cruciais na compreensão da história natural das zoonoses. Coccídios, em particular os da família Sarcocystidae, são importantes agentes transmissíveis na interface homens - animais domésticos e silvestres. O diagnóstico da coccidiose é prejudicado pela limitada disponibilidade de amostras resultantes de populações animais de espécies em risco de extinção. O objetivo deste estudo foi detectar através da amplificação do locus ITS-1, protozoários das subfamílias Sarcocystinae e Toxoplasmatae em amostras teciduais de *Puma yagouaroundi*, *Leopardus geoffroyi*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *L. colocolo* e *L. pardalis*, depositados em coleções biológicas do Rio Grande do Sul, Brasil. Um objetivo adicional foi a obtenção de informações que permitissem avaliar o papel epidemiológico dos protozoários no ciclo silvestre dos parasitas e seu possível impacto sobre as populações de animais silvestres e na saúde pública. Noventa pequenos felídeos neotropicais de vida livre, representando seis espécies, foram amostrados. Destes, 31 felídeos (34,4%), de todas as seis espécies, foram positivos para *Toxoplasma gondii* e DNA foi detectado em 63 das 433 (14,6%) amostras de tecidos primários coletados a partir de língua (28,6%), cérebro (18,6%), músculo esquelético (17,1%), musculatura ocular (13,6%), globo ocular (13,6%), coração (11,1%), diafragma (5,4%) e humor vítreo (4,5%). Doze amostras primárias positivas ao *T. gondii* foram genotipadas com os marcadores moleculares SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3 e a técnica multilocus PCR-RFLP, a amostra Py#36m foi totalmente caracterizada como do tipo I com alelo II no BTUB e um novo genótipo atípico Py#21M, ambos isolados de *Puma yagouaroundi* e nunca descrito no Brasil. Nove outras amostras tiveram caracterização parcial. Treze dos 90 felídeos foram positivos para *Sarcocystis* spp. (14,4%) e outros 18 felídeos, representando cinco espécies albergaram *S. felis*-like [Py (#75m, #83m, #35m, #20li, #55li), Lg (#80m, #70m, #88m, #71li, #67mOi), Lt (#19m, #48m, #89m, #84m), Lw (#12, #73d) e Lc (#82m, #76m)]. Um único felino de *L. pardalis* foi negativo. DNA do parasita foi detectado em 11,8% dos tecidos examinados (51/433): musculatura esquelética (26,5%), língua (23,2%), musculatura ocular (13,6%), diafragma (10,7%), cérebro (2,3%), coração (1,6%) e globo ocular (4,5%), nenhuma das 44 amostras de humor vítreo foi positiva. Esta é a primeira detecção e caracterização genética de *T. gondii* e de *S. felis*-like em felídeos silvestres brasileiros de vida livre, demonstrando a presença destes agentes no ciclo silvestre e, a potencial transmissibilidade ao homem e a outros animais domésticos e silvestres. O uso de amostras de tecidos de animais silvestres depositados em coleções biológicas para estudos epidemiológicos de doenças mostraram serem de grande utilidade.

Palavras-chave: ITS-1, Pequenos felídeos silvestres, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, Brasil.

ABSTRACT

Molecular detection of coccidia family Sarcocystidae in tissues samples of small Neotropical wildlife felids of Rio Grande do Sul.

Few studies have quantified the relative risk of human health from spillover of zoonotic diseases from populations of wild animals; these studies are crucial for understanding the natural history of zoonoses. Coccidia, particularly from the family Sarcocystidae, are important transmissible agents at the interface of man and domestic and wild animals. The diagnosis of Coccidiosis is hampered by the limited availability of samples resulting from protection of natural populations of the species at risk of extinction. The aim of this study was to detect, by amplification of ITS-1 locus, protozoa from the subfamilies Sarcocystinae and Toxoplasmatinae in tissue samples from *Puma yagouaroundi*, *Leopardus geoffroyi*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *L. colocolo* and *L. pardalis*, deposited in biological collections of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. An additional aim was to obtain information that would enable assessment of the epidemiological role of the protozoa in the sylvatic cycle of the parasite, and its possible impact on wildlife populations and public health. Ninety free-living small wild felines, representing 6 species, were sampled. Of these, 31 felids (34.4%) of all six species were positive for *T. gondii* and DNA was detected in 63 of 433 (14.6%) primary tissue samples collected from the tongue (28.6%), brain (18.6%), skeletal muscle (17.1%), ocular muscles (13.6%), eye (13.6%), heart (11.1%), diaphragm (5.4%) and vitreous humor (4.5%). Twelve primary samples positive for *T. gondii* were genotyped with molecular markers SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, and apical CS3. Using the multilocus PCR-RFLP technique, sample Py#36m was fully genotyped as Type I with allele II in locus BTUB, and a new atypical Py#21M, both isolates from *Puma yagouaroundi* and never described in Brazil. Nine other samples had a partial characterization. Thirteen of the 90 felids were positive for *Sarcocystis* spp. (14.4%) and another 18 felids, representing 5 species, harbored *S. felis*-like organisms [Py (#75m, #83m, #35m, #20li, #55li), Lg (#80m, #70m, #88m, #71li, #67mOi), Lt (#19m, #48m, #89m, #84m), Lw (#12, #73d) and Lc (#82m, #76m)]. A single felid of *L. pardalis* was negative. Parasite DNA was detected in 11.8% (51/433) of the tissues examined: muscle skeletal (26.5%), tongue (23.2%), ocular muscles (13.6%), diaphragm (10.7%), brain (2.3%), heart (1.6%) and eye (4.5%); none of the 44 samples of vitreous humor was positive. This is the first description of the detection and genetic characterization of *T. gondii* and *S. felis*-like in free-living Brazilian wild felids, demonstrating the presence of these agents in the sylvatic cycle, and the potential transmission to humans and other domestic and wild animals. The use of tissue samples from wild animals deposited in biological collections for epidemiological studies of diseases demonstrated to be of great utility.

Keywords: ITS-1, Neotropical spotted wildlife felids, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Estudos sobre pesquisa de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em pequenos felídeos neotropicais nas Américas	23
Quadro 2 –	Número de pequenos felídeos silvestres amostrados museus do Rio Grande do Sul	27
Figura 1 –	Distribuição geográfica das amostras coletadas de pequenos felídeos neotropicais no estado do Rio Grande do Sul	29
Figura 2 –	Técnica para a extração de humor vítreo	30
Figura 3 –	Distribuição das 433 amostras de tecidos coletadas em 90 espécimes de pequenos felídeos neotropicais depositados nas coleções biológicas do Rio Grande do Sul	30
Quadro 3 –	Informações referentes à localização do cromossomo, primers externos e internos e enzimas de restrição usadas na genotipagem	33

ARTIGO 1

Quadro 1 –	Eliminação de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> por felídeos silvestres neotropicais	66
Quadro 2 –	Ocorrência (percentagem %) de espécies silvestres predadas por pequenos felídeos neotropicais	67
Quadro 3 –	Estudos com pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em pequenos felídeos neotropicais	68
Quadro 4	Isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> em felídeos silvestres de vida livre e de cativeiro no mundo	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características da amostragem dos pequenos felídeos silvestres neotropicais depositados em coleções biológicas do Rio Grande do Sul (n=90)	28
ARTIGO 2		
Tabela 1 –	Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> pela amplificação do ITS-1 em amostras teciduais de pequenos felídeos silvestres neotropicais do Rio Grande do Sul (n=90)	90
Tabela 2 –	Número de amostras examinadas (E) n=433, amostras positivas (P) n=63 e porcentagem de positividade (%) para <i>Toxoplasma gondii</i> por tecido e por espécie de pequeno felídeo silvestre neotropical do Rio Grande do Sul	91
Tabela 3 –	Genótipos multilocus e identidade de amostras primárias de pequenos felídeos silvestres brasileiros, obtidos pela PCR-RFLP	92
ARTIGO 3		
Tabela 1 –	Amostras positivas para <i>Sarcocystis</i> spp. pela amplificação do gene ITS-1 em tecidos de pequenos felídeos silvestres neotropicais do Rio Grande do Sul.....	112
Tabela 2 –	Número de amostras examinadas (E), amostras positivas (P) e porcentagem de positividade (%) para <i>Sarcocystis</i> spp. por tecido e por espécie de pequeno felídeo silvestre neotropical do Rio Grande do Sul	113
Tabela 3 –	Múltiplo alinhamento das sequências de <i>Sarcocystis felis</i> -like pela amplificação do gene ITS-1 em amostras teciduais de pequenos felídeos silvestres neotropicais do Rio Grande do Sul	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{\circ}\text{C}$	graus celsius
μg	micrograma (s)
μL	microlitro (s)
μM	Micromolar
BSA	albumina sérica bovina
dATP 2'	deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP 2'	deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP 2'	deoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP 2'	deoxitimidina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	et al.
HCl	ácido clorídrico
HD	hospedeiro definitivo
HI	hospedeiro intermediário
IBAMA	Instituto Brasileiro do Medio Ambiente e dos Recursos Renováveis.
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ITS-1	Espacador interno transcrito – 1
KCl	cloreto de potássio
M	Molar
MgCl_2	cloreto de magnésio
mM	Milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NaH_2PO_4	fosfato de sódio monobásico anidro
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico anidro
nPCR	<i>nested</i> -PCR
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
P.I	pós-infecção
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
RNA	ácido ribonucleico
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano

LISTA DE SIMBOLOS

<	Menor
≥	maior ou igual a
>	Maior
%	Porcentagem
#	Número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i> e outros parasitas Sarcocystidae dos felídeos silvestres	15
1.1.1	<i>Sarcocystis</i> spp.	16
1.1.2	<i>Cystoisospora</i> spp.	20
1.1.3	<i>Neospora caninum</i>	21
1.1.4	<i>Hammondia</i> spp.	24
1.1.5	<i>Besnoitia</i> spp.	24
1.1.6	<i>Toxoplasma gondii</i>	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo Geral	26
2.2	Objetivos Específicos	26
3	MATERIAIS E METODOS	27
3.1	Amostras analisadas	27
3.2	Procedimentos Moleculares	31
3.2.1	Extração de DNA dos tecidos	31
3.2.2	Detecção molecular	31
3.2.3	Sequenciamento de ácidos nucleicos	31
3.3	Genotipagem para <i>T. gondii</i> multilocus PCR-RFLP	32
3.3.1	Marcadores moleculares	32
3.3.2	PCR e nPCR.....	32
3.4	Análise dos resultados	35
3.5	Aspectos Éticos	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Artigo 1 <i>Toxoplasma gondii</i> in small neotropical wild felids	37
4.2	Artigo 2 <i>Toxoplasma gondii</i> em pequenos felídeos silvestres brasileiros de vida livre: Detecção molecular e caracterização genética	72
4.3	Artigo 3 Detecção molecular de <i>Sarcocystis felis</i>-like em pequenos felídeos silvestres de vida livre do sul do Brasil	93
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICES	123
	ANEXOS.....	129

1 INTRODUÇÃO

O desconhecimento da ocorrência de doenças dentro de populações de animais silvestres de vida livre vem sendo discutido há várias décadas e tornou-se consenso entre os pesquisadores, que informações sobre a distribuição de vários agentes são ainda insuficientes, elevando o risco de transmissão a novos hospedeiros e aumentando o impacto na saúde pública (SEAL; ARMSTRONG, 2000). Um recente estudo feito por Scotch, Odofin e Rabinowitz (2009) salienta a limitada existência de dados que quantifiquem o risco relativo da saúde humana baseados em pesquisas feitas em populações animais. Isto ocorre devido à falta de compreensão, pelos pesquisadores, da importância dos animais como sentinelas da saúde humana, principalmente das doenças zoonóticas, sendo que a maioria destes patógenos circula entre hospedeiros não humanos apresentando transmissão inter espécies (LLOYD-SMITH et al., 2010).

Dentro dos agentes patogênicos, os coccídios constituem um importante grupo de protozoários, algumas destas espécies são consideradas homoxenas, restritas a um único hospedeiro, enquanto que outras são heteróxenas, com características zoonóticas em um amplo número de hospedeiros, incluindo o homem, (TENDER et al., 2002).

Uma das formas de diferenciação entre protozoários da família Sarcocystidae é através da caracterização molecular do espaçador transcrito interno 1 (ITS-1) do rDNA. Estudos revelam que esta região é um bom marcador para distinguir os membros dessa família (SILVA et al., 2009), permitindo discriminar a variabilidade inter espécie dos coccídios relacionados (*Toxoplasma*, *Neospora*, *Hammondia*, *Besnoitia* e *Sarcocystis*), alguns deles de impacto econômico e inquestionável importância na saúde pública.

No caso dos felídeos silvestres, algumas descrições da presença de anticorpos contra determinados patógenos e alguns estudos de histopatologia têm sido feitos, contudo a caracterização genotípica e a participação de diferentes isolados na epidemiologia e patogenia dessas doenças são bastante reduzidas, com poucos avanços na compreensão da história natural e fundamentalmente das interações epidemiológicas entre as populações silvestres e domésticas ou do homem.

Além da pesquisa em sistemática, como eixo central do conhecimento da biodiversidade, as coleções zoológicas brasileiras representam bancos genéticos importantes, onde os acervos de tecidos são imprescindíveis para estudos em diferentes áreas do conhecimento (ZAHER; YOUNG, 2003).

Destaca-se na presente pesquisa, o uso de material biológico tombado nas coleções biológicas, proveniente de animais mortos em atropelamentos, sem interferência da população natural destes animais silvestres, alguns em alto risco de extinção. Acrescentando a importância das coleções, não só pela riqueza das espécies inventariadas e depositadas para estudos de filogenia ou taxonômicos ao serem conservados unicamente como “pele e esqueleto” e sim como um valioso banco de amostras constituído pelos tecidos destes animais, úteis para estudos de doenças transmissíveis.

1.1 *Toxoplasma gondii* e outros parasitas Sarcocystidae dos felídeos silvestres.

Os gêneros que conformam a família Sarcocystidae, excetuando o *Toxoplasma gondii* (heteróxico facultativo), caracterizam-se por serem heteróxenos obrigatórios e formadores de cistos teciduais. O nome, derivado do grego *sarx* = carne e *kystis* = cisto, vincula a participação de hospedeiros definitivos e intermediários num ciclo de vida que alterna fases de reprodução sexual e assexual. A eliminação de oocistos nas fezes ocorre no hospedeiro definitivo que se infecta após a ingestão de cistos presentes nos tecidos de vários hospedeiros intermediários (FRENKEL; SMITH, 2003).

O diagnóstico diferencial entre protozoários Sarcocystidae pelos métodos tradicionais resulta em discussões científicas que até hoje ainda não foram capazes de fornecer subsídios adequados para tal distinção. Segundo as características fenotípicas, filogenéticas, estruturais, ciclo de vida, e de especificidade de hospedeiro é proposta a seguinte classificação taxonômica (GHIMIRE, 2010; MODRÝ; VOTÝPKA; SVOBODOVÁ, 2004; TENTER et al., 2002).

Familia Sarcocystidae (Poche 1913)

Subfamilia Sarcocystinae (Poche 1913)

Gênero *Sarcocystis* (Lankester 1882)

Subfamilia Toxoplasmatinae (Biocca 1956)

Gênero *Toxoplasma* (Nicolle e Manceaux 1909)

T. gondii

Besnoitia (Henry 1913; Besnoit e Robin 1912)

B. besnoiti, *B. bennetti*, *B. wallacei*, *B. jellisoni*, *B. caprae*, *B. darlingi*, *B. tarandi*, *B. akodoni*

Cystoisospora (Frenkel 1977, Wenyon 1923)

C. felis, *C. rivolta*, *C. ohioensis*, *C. canis*

Hammondia (Frenkel e Dubey 1975)

H. hammondi, *H. heydorni*

Neospora (Dubey 1988, Marsh et al., 1996)

N. caninum, *N. hughesi*

Alguns procedimentos moleculares permitem identificar e diferenciar os parasitas Apicomplexa. Árvores filogenéticas tem sido construídas baseados na sequência do 18S e 28S rDNA, no entanto, uma das formas mais comumente utilizadas é a caracterização molecular do espaçador transcrito interno 1 (ITS-1) rDNA, permitindo discriminar a variabilidade inter espécie existente entre coccídios relacionados (SILVA et al., 2009). Entretanto, a elevada variabilidade da região ITS-1 da família Sarcocystidae torna inapropriado seu uso na construção de árvores filogenéticas (PRAKAS et al., 2011).

1.1.1 *Sarcocystis* spp.

As espécies de *Sarcocystis* envolvem uma diversa gama de hospedeiros intermediários (HI) entre mamíferos (74%), aves (14%), répteis (19%) e peixes (0,5%) em diferentes combinações, aumentando a chance de sobrevivida no ciclo: mamífero/mamífero, mamífero/ave, mamífero/réptil, aves/aves, aves/mamíferos e réptil/réptil (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012), com especificidade maior para o HD (hospedeiro definitivo) embora muitos destes sejam ainda desconhecidos (DOLEZEL et al., 1999; TENTER, 1995).

Poucas espécies como *S. muris* e *S. rodentifelis* apresentem ciclo dihomoxeno (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012), em geral *Sarcocystis* spp. possui ciclo biheteróxico, dependente da oconcorrência de duas espécies no ambiente (HI/HD), e de uma transmissão ligada às relações presa/predador ou animais necrófagos/carniça (FRENKEL; SMITH, 2003), que permite a manutenção do parasita num ciclo circulante com baixa ou moderada virulência nos hospedeiros (JOG; WATVE, 2005).

A reprodução assexuada (merogonia) ocorre no endotélio vascular do HI (omnívoro ou herbívoro) e nas arteríolas da musculatura esquelética. Os merozoítos posteriormente ingressam na musculatura cardíaca e estriada, formando os “sarcocistos” (cistos) contendo bradizoítos, visíveis micro ou macroscopicamente. Estes desenvolvem-se completamente em aproximadamente 75 dias pós-infecção, tornando-se viáveis por meses ou anos. Características ultraestruturais dos cistos são conhecidas em apenas 119 espécies (63%), e nos felídeos são muito semelhantes, de formato fusiforme (diâmetro 24-270µm e comprimento 24-2100µm) com vilosidades irregularmente espaçadas e carentes de microtubulos (GILLIS et al., 2003).

Decorrente do consumo de cistos contidos na musculatura das suas presas; também presentes na língua, esôfago, diafragma, fibras de Purkinje do músculo cardíaco, e inclusive na medula espinal e cérebro, acontece no endotélio intestinal do HD (carnívoro) a fase sexual. Após a gametogênese, originam-se oocistos de parede fina contendo quatro esporozoítos, eliminados nas fezes num curto período prepatente (7 a 14 dias), contaminando o ambiente (CHRISTIE; DUBEY; PAPPAS, 1976; LINDSAY; BLAGBURN; BRAUND, 1995).

Segundo a revisão feita por Odening (1998) e Tenter (1995) em torno de 15 espécies de *Sarcocystis* indicadas entre parêntesis, foram registradas no felino doméstico (HD), tendo como HI: bovinos (*S. buffalonis*, *S. fusiformis*, *S. gigantea*, *S. hirsuta*); ovinos (*S. medusiformis*); caprinos (*S. moulei* ou *S. caprifelis*); suínos (*S. porcifelis*); leporídeos (*S. cuniculorum*, *S. leporum*); roedores (*S. cymruensis*, *S. muris*, *S. neotomafelis*, *S. rodentifelis*); cervídeos (*S. odoi*) e galliformes (*S. wenzeli*). Nos felídeos silvestres só duas espécies são consideradas até hoje, o *S. felis* (ANDERSON et al., 1992) e *S. hirsuta* (DUBEY; SPEER; CHARLESTON, 1989), mas não se descarta a participação na transmissibilidade de outras espécies de *Sarcocystis* (ATKINSON et al., 1993).

Esporocistos *Sarcocystis*-like foram reportados nas fezes de *Lynx rufus* e *Puma concolor* nos Estados Unidos (DUBEY, 1982), e em macrófagos da lamina própria do intestino delgado de leões juvenis (KINSEL et al., 1998). A não presença destes estádios em animais adultos deixa em dúvida o papel dos felídeos silvestres como hospedeiro definitivo do *S. felis*. Entretanto, a “sarcocistose” seria resultante de processos de imunossupressão, porquanto que o parasita dificilmente utilizaria estes predadores como hospedeiros intermediários no ciclo silvestre (GREINER et al., 1989), porém, não é rejeitada a hipótese da transmissão hídrica de esporozoítos (HILL; CHAPMAN; CRESTWOOD, 1988) ou da autoinfecção com fezes contendo oocistos/esporozoítos dos mesmos felídeos ou de outros carnívoros (ANDERSON et al., 1992).

Os sarcocistos foram primeiramente identificados em tecido cardíaco de leões africanos por Bhataydekar e Purohit em 1963 (GILLIS et al., 2003). Posteriormente, a análise histológica feita dos cistos da musculatura esquelética num *Puma concolor* adulto do zoológico de Washington, D.C, sugere o gênero *Sarcocystis* (KLUGE, 1967). Anos mais tarde, recebe o nome de *S. felis* segundo a análise da amostra identificada no tecido muscular de *L. rufus*, para a espécie que acometia os felídeos silvestres (DUBEY et al., 1992).

A língua é considerada como tecido indicador da sarcocistose, a utilidade diagnóstica foi comprovada em sessenta *L. rufus* da Florida (EUA). O parasita foi detectado em 100% das línguas avaliadas (28/28), superando a sensibilidade de outros tecidos como músculo cardíaco (8/26), diafragma (10/27), intestino (1/10) e músculo esquelético (1/4), com uma significância estatística de $p < 0,005$ (ANDERSON et al., 1992).

No entanto, a presença de sarcocistose de *S. felis* é predominante na musculatura esquelética de felídeos silvestres, vinculados ou não à apresentação de imunossupressão do felino (EDWARDS et al., 1988; KIRKPATRICK et al., 1986). Na Florida, todos os quatro *P. concolor* e 78,6% dos *P. concolor coryi* (11/14) analisados apresentaram sarcocistos *Sarcocystis* spp. na musculatura estriada, com maior frequência na língua, músculo esquelético e diafragma, e um único cisto no tecido cardíaco (GREINER et al., 1989).

Resultados semelhantes apresentaram-se em chitas nascidos em cativeiro, 70% destes indivíduos tiveram sarcocistos (BRIGGS; LEATHERS; FOREYT, 1993) assim

como quatro leões adultos da Namíbia (KINSEL et al., 1998); neste último estudo outros seis animais juvenis foram negativos para cistos na musculatura esquelética, embora apresentassem oocistos na lâmina própria do intestino delgado.

Não há sinais clínicos típicos da sarcocistose, implicações maiores ocorrem pela transmissão de canídeos e primatas do que por felídeos, apesar disso ainda se desconhece a verdadeira patogenia que o parasita causa no hospedeiro intermediário, sendo considerada no hospedeiro definitivo como menor (TENTER, 1995). No homem, estudos demonstram a existência de sarcocistoses gastrointestinal. O desconforto abdominal, flatulência, diarreia, perda de apetite, náuseas e vômito, assim como dispnéia e taquicardia são os principais sintomas da infecção, resultante da ingestão de cistos de *S. cruzi*, *S. hirsuta* e *S. hominis* (FAYER, 2004) ou por *S. suishominis* (SAITO et al., 1998), contidos na musculatura de bovinos e suínos respectivamente; com eventual eliminação de esporocistos nas fezes (PENA; OGASSAWARA; SINHORINI, 2001).

As espécies patogênicas de *Sarcocystis* que atingem os animais correspondem nos equinos ao *S. neurona*, agente causante da mieloencefalite protozoária equina, caracterizada por dificuldade na marcha e movimentos cíclicos entre outros sinais neuromusculares. Nos cães e equinos domésticos, assim como no urso grizzly (*Ursus arctos horribilis*) e no urso negro americano (*Ursus americanus*) o *S. canis* causa infecção hepática. E nos ruminantes domésticos, sinais digestivos como anorexia, perda de peso, assim como reprodutivos e neuromusculares são descritos pela infecção por *S. cruzi*, *S. tenella* e *S. capricanis* (PRAKAS; BUTKAUSKAS, 2012).

Nos felídeos silvestres, um caso atípico denominado como *Sarcocystis neurona*-like foi documentado no *L. canadensis* de vida livre, manifestando letargia e anorexia como principais sinais: Fragmentos de tecido submetidos à imunohistoquímica revelaram merontes de *S. neurona* no cérebro, sendo negativos para *T. gondii* e *N. caninum*, contudo os autores são reservados em afirmar a etiológica da doença, que poderia ser originada por uma espécie antígenicamente similar ao *S. neurona* (FOREST et al., 2000). Sinais similares aos apresentados num gato doméstico com ataxia, dor espinal e anisocoria, a análise molecular do coágulo sanguíneo pelo ITS-1 rDNA não foi conclusiva, os dois clones isolados neste caso apresentaram 99 e 95% de homologia com *S. neurona* e *S. dasipy* respectivamente, e de 45% com *S. felis* (BISBY et al., 2010).

Nos Estados Unidos, no intuito de determinar a participação dos felinos domésticos na epidemiologia do *S. neurona*, cinquenta gatos não domiciliados apresentaram uma frequência de 10% de sarcocistos na musculatura examinada, a comparação morfológica dos sarcocistos descartou a presença de *S. neurona* ou de *S. neurona*-like, foram identificados como *Sarcocystis felis*. Contudo, os autores não descartam a possibilidade da infecção pelo *S. neurona*, ao apresentar resultados sorológicos positivos para este agente em 5% dos animais de rua testados (GILLIS et al., 2003).

A patogenia da sarcocistose nos felinos domésticos foi avaliada pelas condições clínico-patológicas presentes em três dos 17 gatos analisados. Hipertrofia cardiomiopática e linfossarcoma foram associadas à presença de sarcocistos na musculatura cardíaca e esquelética (pescoço, intercostais e diafragma). *S. felis* foi identificado molecularmente pela análise do fragmento de 696pb do gene da subunidade menor ribossomal RNA (ssrRNA), a análise filogenética deste isolado (AY576489) revelou 99% de semelhança com *S. mucosa* e *S. neurona* (ELSHEIKHA et al., 2006).

Ao contrário, a análise do gene da ssrRNA feita em duas amostras de sarcocistos de gato doméstico, demonstrou diferenças significativas entre várias espécies de *Sarcocystis*. Simultaneamente, o sequenciamento do ITS-1 destas mesmas amostras comprovou que o produto amplificado de 1080pb, tem baixa homologia com *S. neurona* (45%) e *S. falcatula* (46%). A análise filogenética destas espécies e outras estreitamente relacionadas (*Toxoplasma*, *Neospora* e *Hammondia*), revelou notável divergência com os clones de *S. felis* isolados neste estudo, denominados como AY190081 e AY190082 (GILLIS et al., 2003).

Finalmente, Odening (1998) sugere que estudos da epidemiologia do *Sarcocystis* deve focar-se a espécies de animais silvestres que agem como hospedeiros intermediários no intuito de ampliar o conhecimento dos mecanismos da infecção, ciclo de vida, relações parasito-hospedeiro e, fundamentalmente, ampliar as pesquisas em mamíferos predadores que atuam como hospedeiros definitivos do parasita.

1.1.2 *Cystoisospora* spp.

Foi separado do gênero *Isospora* é classificado como um novo gênero pela formação de cistos teciduais em hospedeiros paratênicos, com ciclo heteroxeno obrigatório em roedores. A sequência e filogenia do gene 18s RNA permite agrupar os

oocistos de mamíferos nos gêneros *Isoospora* com presença do corpo Stieda e *Cystoisospora* (Sarcocystidae) com ausência deste (BARTA et al., 2005; SCHRENZEL et al., 2005).

Nos cães *C. canis*, *C. ohioensis*, *C. burrowsi* e *C. neorivolta* são as espécies patogênicas, agrupadas no complexo *C. ohioensis* pelas dificuldades de identificação morfológica. *C. felis* e *C. rivolta* acometem os felinos. São pouco descritas nos felídeos silvestres e geralmente associadas a processos diarreicos (FRENKEL, 1977; MITREA; IONIȚĂ; ENĂCHESCU, 2006).

Oocistos de *Cystoisospora*, originalmente descritos como *Isoospora*, têm sido descritos nas fezes dos seguintes felídeos silvestres: *Felis silvestris* (gato selvagem europeu), *Leopardus pardalis* (jaguar), *Leptailurus serval* (Serval), *Lynx lynx* (lince europeu), *Neofelis nebulosa* (leopardo das neves), *Panthera leo* (leão africano), *P. onca* (onça-pintada), *P. pardus* (leopardo), *P. tigris* (tigre asiático) e *Prionailurus bengalensis* (gato leopardo) (DUSZYNSKI; COUCH; UPTON, 2000).

1.1.3 *Neospora caninum*

A epidemiologia da neosporose está estreitamente ligada à infecção causada nos bovinos pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de algumas espécies de canídeos silvestres e pelo cão doméstico. Estes infectam o ambiente e, em decorrência, graves perdas econômicas por abortamento bovino são atribuídas a este parasita (DUBEY; SCHARES, 2011).

Alguns autores sugerem a existência de um ciclo silvestre do *N. caninum* envolvendo outras espécies animais, que levaria a uma superposição das vias de transmissão doméstica (cães domésticos) e silvestre (canídeos selvagens) (GONDIM et al., 2004; KING et al., 2011).

No caso dos felídeos silvestres, algumas pesquisas sorológicas revelam contato com o *Neospora*, porém até hoje, nenhum dos estudos tem identificado formas císticas nos tecidos destes animais. Na África do Sul, Cheadle, Spencer e Blagburn (1999) relataram pela primeira vez na literatura, a presença de anticorpos anti-*N. caninum* no IFAT (>50) em duas espécies de felídeos silvestres africanos de vida livre: nos chitas 5,9% (1/17) e em leões 7,3% (3/41). Estudos posteriores demonstraram que felídeos exóticos em cativeiro também apresentaram-se sororeagentes (ANDRÉ et al., 2010;

FERROGLIO et al., 2003; MILLÁN et al, 2009; SEDLÁK; BÁRTOVA, 2006; SOBRINO et al., 2008; SPENCER; HIGGINBOTHAM; BLAGBURN, 2003).

No Brasil, um único inquérito sorológico em zoológicos demonstrou a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em pequenos felídeos neotropicais em cativeiro (ANDRÉ et al., 2010). Dados da infecção de felídeos silvestres por *N. caninum* são apresentados no Quadro 1. A infecção pelo *Neospora* em gatos domésticos imunossuprimidos ocorre com sintomatologia nervosa (DUBEY; LINDSAY; LIPSCOMB, 1990), no entanto, todos os felídeos silvestres avaliados por testes sorológicos foram assintomáticos à infecção.

Quadro 1 - Estudos sobre pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em pequenos felídeos neotropicais nas Américas.

Espécie	Nome comum	Número de positivos / testados	Teste diagnóstico (Ponto de corte)	País	Referência
<i>Leopardus geoffroyi</i>	Gato-do-mato-grande	1 / 1	IFAT (≥ 50)	Estados Unidos	Spencer, Higginbotham e Blagburn (2003)
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguatirica	30 / 42	IFAT (≥ 25)	Brasil	André et al. (2010)
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	11 / 35	IFAT (≥ 25)	Brasil	André et al. (2010)
<i>Leopardus colocolo</i>	Gato palheiro	3 / 3	IFAT (≥ 25)	Brasil	André et al. (2010)
<i>Puma yagouaroundi</i>	Jaguarundi	1 / 1	IFAT (≥ 40)	Rep. Checa	Sedlák e Bártova (2006)
		5 / 25	IFAT (≥ 25)	Brasil	André et al. (2010)

Nota: Abreviatura

IFAT: Teste de Imunofluorescência Indireta.

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

1.1.4 *Hammondia* spp.

A transmissão cíclica de coccídios do gênero *Hammondia* ocorre entre HI (roedores e alguns mamíferos) e HD (gato), entretanto não acontece a transmissão, roedor - roedor ou felino - felino (FRENKEL, SMITH, 2003). Duas espécies são descritas *Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni*. Nos Estados Unidos *Hammondia* spp. foram relatadas no rato almiscareiro (*Galemys pyrenaicus*) e no mink (*Neovison vison*) (RYAN; WYAND; NIELSEN, 1982).

No ciclo de vida heteróximo de *H. heydorni* inclui-se mamíferos e aves (HI) e canídeos como HD, nestes últimos ocorre a fase sexual com a eliminação fecal de oocistos que esporulam de forma exógena, morfologicamente similares aos oocistos de *N. caninum*. As pesquisas demonstram a existência de duas linhagens com heterogeneidade entre as sequências do espaçador interno transcrito ITS-1 de oocistos de *H. heydorni* eliminados por raposas e cães (ABEL et al., 2006; MOHAMMED et al., 2003; MONTEIRO et al., 2008; SCHARES et al., 2002; SCHARES et al., 2003; SOARES et al., 2009; SREEKUMAR et al., 2004).

1.1.5 *Besnoitia* spp.

Cistos do protozoário *Besnoitia* foram descritos pela primeira vez por Besnoit e Robin (1912), na musculatura de um bovino, conhecido inicialmente como *Sarcocystis*, *Gastrocystis* e *Globidium* e redefinidos por Frenkel, 1977 como *Besnoitia*. De ciclo heteróximo presa /predador entre mamíferos e reptis (FRENKEL, 1977; FRENKEL; SMITH, 2003), as características biológicas e morfológicas deste protozoário baseiam-se na presença de cistos grandes e esféricos.

O gato doméstico é definido como único hospedeiro definitivo de *B. darlingi*, *B. wallacei*, *B. oryctofelisi* e *B. neotomofelis* (BASSO et al., 2011; DIESING et al., 1988; DUBEY; LINDSAY, 2003; GUTIÉRREZ-EXPÓSITO et al., 2012). Alguns hospedeiros intermediários têm sido identificados para as espécies *B. wallacei*, *B. jellisoni* (roedores), *B. darlingi* (gambás) e *B. besnoiti* (bovinos), mas na atualidade a taxonomia deste gênero ainda não está bem definida (MASON, 1980; MEHLHORN et al., 2009; MILLÁN et al., 2012).

1.1.6 *Toxoplasma gondii*

No mundo todo, *T. gondii* é considerado um dos protozoários de maior prevalência, infectando o maior número de espécies hospedeiras, desde animais de sangue quente incluído o homem até mexilhões e ostras que agem como transportadores de oocistos. Os felídeos, domésticos e silvestres, são hospedeiros definitivos de *T. gondii*, sendo qualquer mamífero e as aves os hospedeiros intermediários (DUBEY, 2010).

A principal forma de infecção dos felídeos é pela ingestão de cistos tissulares, seguida da liberação dos bradizoítos que penetram as células epiteliais do intestino delgado. A formação de oocistos ocorre em aproximadamente três a dez dias, após endopoligenia e gametogonia (DUBEY, 1998c). No entanto hospedeiros definitivos e intermediários também se infectam ao ingerir água e alimentos contaminados com oocistos esporulados. Como no hospedeiro intermediário, paralela ou independentemente do ciclo intestinal, tecidos ou órgãos podem ser invadidos por esporozoítos, com a formação de taquizoítos e bradizoítos (DUBEY, 2010).

No ambiente, os oocistos resistem às condições ambientais extremas por curtos períodos de tempo, mas em condições ideais a viabilidade pode chegar aos 18 meses (DUBEY, 1986). Chuva e vento dispersam os oocistos infectantes para fontes hídricas ou lavouras, com potencial infecção para os hospedeiros (DUBEY, 2010).

Nos HI a infecção pode ser adquirida de duas formas. Na primeira por ingestão de oocistos esporulados; esporozoítos livres invadem a parede intestinal, logo taquizoítos disseminam-se via hematogênica e invadem a célula. No ciclo extra-intestinal taquizoítos formam cistos teciduais. No interior destes, os bradizoítos multiplicam-se lentamente por endodiogénia. A distribuição dos cistos é aleatória, localizando-se principalmente no músculo esquelético e cardíaco e, em menor grau no pulmão, fígado e rins. (DUBEY et al., 1988). A segunda forma de infecção é a ingestão de bradizoítos contidos em cistos teciduais. Neste caso o ciclo é semelhante à ingestão de oocistos (DUBEY, 1998b).

Detalhes da epidemiologia da toxoplasmose nos felídeos silvestres são apresentados no artigo de revisão 1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Detectar e identificar, por meio da amplificação por PCR e sequenciamento automático do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) os gêneros da família Sarcocystidae em amostras teciduais de felídeos silvestres (*Puma yagouaroundi*, *Leopardus geoffroyi*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *L. colocolo* e *L. pardalis*) depositados em coleções biológicas do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o papel epidemiológico dos protozoários caracterizados, no ciclo silvestre do parasita, seu possível impacto em populações de animais silvestres e as implicações na saúde pública.
- Ponderar a utilidade das amostras provenientes de coleções de museus para estudos epidemiológicos de doenças transmissíveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras analisadas

A pesquisa molecular de cocídios da subfamília Sarcocystidae pela amplificação do espaçador interno transcrito ITS-1, foi realizada com a coleta de amostras teciduais em 90 pequenos felídeos silvestres neotropicais mortos em atropelamentos veiculares nas estradas do estado. Material existente em cinco coleções biológicas do Rio Grande do Sul, ilustrado no Quadro 2. Sendo registradas quando disponíveis as variáveis espécie, sexo, idade (considerando animais adultos pelo desgaste e tamanho da dentição, assim como pelo seu tamanho corporal), procedência e data de depósito na coleção, dados ilustrados na Tabela 1 e Figura 1.

Quadro 2- Número de pequenos felídeos silvestres amostrados museus do Rio Grande do Sul.

Espécie de Felídeo	Museus (Quantidade amostrada)					Total Amostrado
	PUC	UFRGS	FZB	UCS	ULBRA	
<i>Puma yagouaroundi</i>	2	0	15	1	4	22
<i>Leopardus geoffroyi</i>	2	0	13	0	7	22
<i>Leopardus tigrinus</i>	1	1	19	1	6	28
<i>Leopardus wiedii</i>	2	0	8	0	0	10
<i>Leopardus pardalis</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Leopardus colocolo</i>	1	0	3	0	3	7
TOTAL	8	1	59	2	20	90

Nota: Abreviaturas

PUCRS: Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular

FZB: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul

UCS: Museu de Ciências Naturais da Universidade de Caxias do Sul

ULBRA: Museu de Ciências da Universidade Luterana do Brasil

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

Tabela 1- Características da amostragem dos pequenos felídeos silvestres neotropicais depositados em coleções biológicas do Rio Grande do Sul (n=90).

Variável	Número	Porcentagem (%)
Espécie		
<i>Puma yagouaroundi</i>	22	24,4
<i>Leopardus geoffroyi</i>	22	24,4
<i>Leopardus tigrinus</i>	28	31,1
<i>Leopardus wiedii</i>	10	11,1
<i>Leopardus pardalis</i>	1	1,1
<i>Leopardus colocolo</i>	7	7,8
Sexo		
Macho	41	45,6
Fêmea	15	16,7
Sem dado disponível	34	37,8
Idade		
Adulto	52	57,8
Jovem	4	4,4
Sem dado disponível	34	37,8
Procedência		
Com registro	64	71,1
Sem dado disponível	26	28,9
Data de depósito (ano)		
1999 a 2005	22	24,1
2006 a 2010	46	51,1
Sem dado disponível	22	24,4

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

Figura 1- Distribuição geográfica das amostras (indicadas por números) coletadas de pequenos felídeos neotropicals no estado do Rio Grande do Sul.



Nas mesoregões *Centro Ocidental* $n = 2$ (#73, #82); *Centro Oriental* $n = 15$ (#2, #3, #18, #19, #29, #30, #43, #45, #48, #49, #54, #58, #66, #68, #80); *Metropolitana* $n = 12$ (#28, #31, #33, #39, #42, #52, #53, #55, #70, #77, #90, #93); *Nordeste* $n = 3$ (#12, #23, #69); *Noroeste* $n = 7$ (#21, #24, #36, #38, #78, #79, #84); *Sudeste* $n = 11$ (#5, #10, #22, #27, #35, #41, #50, #61, #72, #83, #86) e *Sudoeste* $n = 14$ (#1, #11, #20, #26, #37, #62, #67, #74, #75, #76, #85, #87, #88, #92).

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

As noventa carcaças de felídeos silvestres foram submetidas à necropsia taxidérmica para obtenção segundo o grau de decomposição dos seguintes tecidos: cérebro, musculatura esquelética do quadríplices femoral, diafragma, coração, língua, olhos e humor vítreo.

Ao todo, 433 tecidos foram obtidos conforme o seguinte protocolo: a)

Descongelamento prévio da carcaça; b) Retirada da pele sem prejuízo à integridade do material e; c) Coleta de fragmentos de tecidos com auxílio de pinças, tesouras e bisturi, previamente esterilizados.

Para a obtenção do humor vítreo optou-se por fazer um corte ao nível do nervo óptico e a retirada com seringa do humor vítreo desde a câmara posterior do olho, no intuito de diminuir a contaminação do globo e da musculatura ocular, como se ilustra nas Figuras 2 e 3, informações adicionais encontram-se nos apêndices A e B.

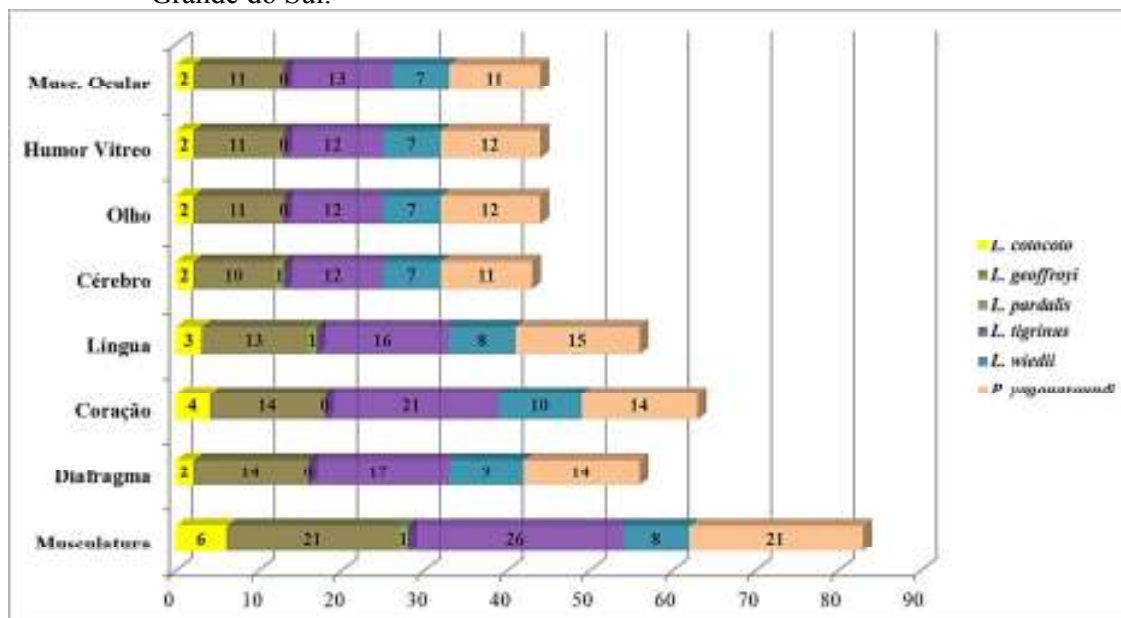
Figura 2 - Técnica para a extração de humor vítreo



Corte ao nível do nervo óptico e, retirada com seringa do humor vítreo da câmara posterior do olho.

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

Figura 3 - Distribuição das 433 amostras de tecidos coletadas em 90 espécimes de pequenos felídeos neotropicais depositados nas coleções biológicas do Rio Grande do Sul.



Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

3.2 Procedimentos Moleculares

3.2.1 Extração de DNA dos tecidos

Um grama de tecido (dependendo da disponibilidade do órgão), foi macerado em TE pH 8,0 (Tris HCl 10mM, EDTA 1 mM) na proporção 1:4; duas alíquotas de 200µL do macerado final foram obtidas no intuito de aumentar a chance de detecção (MURADIAN et al., 2012). Seguido de extração enzimática com proteinase K e purificação com fenol – clorofórmio 1:1 (PENA et al., 2006, 2008). O DNA foi precipitado com etanol 70%, ressuspendido em TE buffer pH 8,0 (30µL) e estocado à -20°C até a execução da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.2.2 Detecção molecular

A amplificação pela PCR foi realizada com os primers externos JS4 (CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C) e CT2c (CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC) dirigidos aos genes 18S e 5,8S rRNA, seguida da *nested*-PCR (*n*-PCR-ITS-1) com os primers internos JS4b (AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG) e CT2b (TTG CGC GAG CCA AGA CAT C) que flanqueiam a sequência completa do ITS-1 comum para coccídios Sarcocystidae (SOARES et al., 2011).

As condições do ciclo da PCR foram de 94°C por três min., seguido de 35 ciclos a 94°C por 40 s., 30 s. a 56°C e 30 s. a 72°C (SLAPETA et al., 2002). Cada 25µL da reação contendo 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) platinum high fidelity (Invitrogen); 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 0,5µL da mistura de dNTPs (10mM); 1,5µL de cada primer *sensu* e *anti-sensu* (10pM) e 2,5µL da amostra de DNA. Na *n*-PCR-ITS-1 usaram-se quantidades iguais da mistura com a substituição dos primers. Controles positivos de *Toxoplasma gondii* (RH) e *Neospora caninum* (NC1) foram incluídos. Os amplicons obtidos na *n*-PCR-ITS-1 foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% corados com brometo de etídio, com um tamanho de banda esperado de ~471pb para a subfamília Toxoplasmatinae e ~870pb para a subfamília Sarcocystinae.

3.2.3 Sequenciamento de ácidos nucleicos

Para a subfamília Sarcocystidae, considerando o perfil de banda obtido e a qualidade da mesma os produtos da *n*-PCR-ITS-1 foram purificados com ExoSAP-IT

USB[®] (Affymetrix, Cleveland, Ohio, USA), sequenciados utilizando os *primers* JS4b e CT2b, seguindo as instruções do fabricante e encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, para sequenciamento utilizando o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456) (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) e o software Sequencing Analysis 5.3.1 no Base Caller KB. As seqüências derivadas da *n*-PCR-*ITS-I* foram submetidas na busca BLASTn no GenBank (2009) a fim de identificar a espécie do parasita, importadas e editadas para o software BioEdit.

3.3 Genotipagem para *T. gondii* multilocus PCR-RFLP

3.3.1 Marcadores moleculares

Os produtos amplificados positivos obtidos pela PCR, foram submetidos a genotipagem utilizando 12 marcadores de restrição de polimorfismo PCR-RFLP: SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico (DUBEY et al., 2007; SU; ZHANG; DUBEY, 2006) e CS3 (PENA et al., 2008) para distinguir as três linhagens clonais. Como controles positivos os genótipos de referência I (RH), II (PTG), III (CTG) e TgCgCa1, MAS, TgCatBr5 foram utilizados.

3.3.2 PCR e nPCR

Conforme a metodologia referida por Vitaliano (2012), o DNA alvo foi primeiramente amplificado por multiplex PCR usando primers externos para todos os marcadores, seguido de *nested*-PCR para os marcadores individualmente.

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

Quadro 3 - Informações referentes à localização do cromossomo, primers externos e internos e enzimas de restrição usadas na genotipagem.

(continua)

Marcador molecular	Número do cromossomo	PCR primers	Tamanho (pb)	Enzimas de restrição	Digestão enzimática e eletroforese	Referencia
c22-8	Ib	E-F TGA TGC ATC CAT GCG TTT AT E-R CCT CCA CTT CTT CGG TCT CA I-F TCT CTC TAC GTG GAC GCC I-R AGG TGC TTG GAT ATT CGC	521	<i>BsmAI</i> <i>MboIII</i>	NEB2, BSA, 37°C 30min, 55oC 30 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
c29-2	III	E-F ACC CAC TGA GCG AAA AGA AA E-R AGG GTC TCT TGC GCA TAC AT I-F AGT TCT GCA GAG TGT CGC I-R TGT CTA GGA AAG AGG CGC	446	<i>HpyCH4IV</i> <i>RsaI</i>	NEB1, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
L358	V	E-F TCT CTC GAC TTC GCC TCT TC E-R GCA ATT TCC TCG AAG ACA GC I-F AGG AGG CGT AGC CGA AGT I-R CCC TCT GGC TGC AGT GCT	418	<i>HaeIII</i> <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
PK1	VI	E-F GAA AGC TGT CCA CCC TGA AA E-R AGA AAG CTC CGT GCA GTG AT I-F CGC AAA GGG AGA CAA TCA GT I-R TCA TCG CTG AAT CTC ATT GC	903	<i>AvaI</i> <i>RsaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
SAG1	VIII	E-F GTT CTA ACC ACG CAC CCT GAG E-R AAG AGT GGG AGG CTC TGT GA I-F CAA TGT GCA CCT GTA GGA AGC I-R GTG GTT CTC CGT CGG TGT GAG	390	<i>Sau96I</i> <i>HaeII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Grig et al. (2001)
3'SAG2	VIII	E-F TCT GTT CTC CGA AGT GAC TCC E-R TCA AAG CGT GCA TTA TCG C I-F ATT CTC ATG CCT CCG CTT C I-R AAC GTT TCA CGA AGG CAC AC	222	<i>HhaI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
5'SAG	VIII	E-F GCT ACC TCG AAC AGG AAC AC E-R GCA TCA ACA GTC TCT TCG TTG C I-F GAA ATG TTT CAG GTT GCT GC I-R GCA AGA GCG AAC TTG AAC AC	241	<i>MboI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)

(conclusão)

alt. SAG2	VIII	I-F ACC CAT CTG CGA AGA AAA CG I-R ATT TCG ACC AGC GGG AGC AC	546	<i>HinfI</i> <i>TapI</i>	NEB3, BSA, 37°C 30 min, 65°C 30 min 2,5% gel	Lehmann et al. (2000) Su et al. (2006)
BTUB	IX	E-F TCC AAA TGA GAG AAA TCG T E-R AAA TTG AAT GAC GAA GAA I-F GAG GTC ATC TCG GAC GAA CA I-R TTG TAG GAA CAC CCG GAC GC	411	<i>BsiEI</i> <i>TaqI</i>	NEB4, BSA, 60°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
GRA6	X	E-F ATT TGT GTT TCC GAG CAG GT E-R GCA CCT TCG CTT GTG GTT I-F TTT CCG AGC AGG TGA CCT I-R TCG CCG AAG AGT TGA CAT AG	344	<i>MseI</i>	NEB2, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Fazaeli et al. (2000) Su et al. (2006)
SAG3	XII	E-F CAA CTC TCA CCA TTC CAC CC E-R GCG CGT TGT TAG ACA AGA CA I-F TCT TGT CGG GTG TTC ACT CA I-R CAC AAG GAG ACC GAG AAG GA	311	<i>NciI</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Grig et al. (2001)
Apico	Plastideo	E-F TGG TTT TAA CCC TAG ATT GTG G E-R AAA CGG AAT TAA TGA GAT TTG AA I-F TGC AAA TTC TTG AAT TCT CAG TT I-R GGG ATT CGA ACC CTT GAT A	640	<i>AflIII</i> <i>DdeI</i>	NEB2, BSA, 37°C 60 min 3% gel	Su et al. (2006)
CS3	VIIa	E-F GTG TAT CTC CGA GGG GGT CT E-R TGT GAC TTC TTC GCA TCG AC I-F AGC GGA TTT CCA ACA CTG TC I-R CTG CTG CAT TCA CAA ACT CC	557	<i>MboI</i> <i>NlaIII</i>	NEB4, BSA, 37°C 60 min 2,5% gel	Khan et al. (2005)

Nota: Abreviacoes (em inglês)

E-F: External Forward

E-R: External Reverse

I-F: Internal Forward

I-R: Internal Reverse

Fonte: Modificado de Su, Zhang e Dubey (2006)

3.4 Análise dos resultados

Os dados coletados foram analisados pelo software IBM SPSS Statistics19 e o teste de chi quadrado foi realizado para estabelecer diferenças entre as variáveis (localidade, espécie, sexo e idade) e o encontro dos diferentes coccídios, com um nível de significância $p < 0,005$.

3.5 Aspectos Éticos

A presente pesquisa está amparada pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, segundo o estabelecido na Instrução Normativa Federal nº154 do 01 de março de 2007 e na normativa do IBAMA no. 119 de 11 de outubro 2006 para o aproveitamento científico de animais atropelados. No Anexo A apresentam-se copia das licencias de coleta outorgadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão deste trabalho de tese são apresentados a seguir no formato de artigos científicos. Cada um destes artigos foi escrito e formatado seguindo as normas técnicas para a escritura de manuscritos nas guias para autores das revistas científicas às quais serão submetidos. Cada subtítulo corresponde ao produto de um artigo. O Apêndice A e B, contem as informações gerais dos felídeos silvestres e das amostras teciduais analisadas no presente estudo.

ARTIGO 1

***Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids**

Submetido à publicação na revista *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.

ARTIGO 2

***Toxoplasma gondii* em pequenos felídeos silvestres brasileiros de vida livre: Detecção molecular e caracterização genética.**

Há ser submetido na revista *Veterinary Parasitology*.

ARTIGO 3

Detecção molecular de *Sarcocystis felis*-like em pequenos felídeos silvestres de vida livre do sul do Brasil.

Há ser submetido na revista *International Journal of Wildlife Diseases*.

4.1 Artigo 1

***TOXOPLASMA GONDII* EM PEQUENOS FELÍDEOS SILVESTRES NEOTROPICAIS**

***Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids**

William Alberto CAÑÓN-FRANCO¹; Flávio Antônio Pacheco de ARAÚJO²; Solange Maria
GENNARI³

¹Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas,
Manizales, Caldas, Colombia

²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido:

Aprovado:

Correspondência para:

William Alberto Cañón-Franco
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas,
Calle 65 No 26 – 10, Manizales, Caldas, Colombia.
e-mail: william.canon@ucaldas.edu.co

Resumo

Na última década, pesquisas em animais silvestres no mundo todo, tem demonstrado aspectos importantes na epidemiologia do ciclo silvestre de *Toxoplasma gondii*, no entanto poucos estudos enfocaram a participação dos felídeos silvestres. Embora seja conhecido o papel desses animais como hospedeiros definitivos na transmissão e manutenção desse parasita. O Brasil possui a maior quantidade de espécies de felídeos silvestres do continente americano, todas em estado crítico de conservação. Porém, a detecção sorológica, pesquisas epidemiológicas e algumas caracterizações moleculares do *T. gondii* nestas espécies, utilizaram principalmente populações de felídeos neotropicais mantidos em cativeiro, o que não reflete o comportamento da doença em condições de vida livre. Uma revisão sistemática da literatura científica mundial foi realizada focando a toxoplasmose em pequenos felídeos neotropicais, abrangendo aspectos como o estado da pesquisa científica, transmissão do parasita na vida silvestre, características genéticas dos isolados e sua relação com a patogenicidade, além dos fatores de risco ligados aos conflitos com o homem. Esta revisão mostra a importância do estudo dessas populações de felídeos, em função das frequentes interações com o homem em áreas periurbanas e a necessidade de estudos mais abrangentes, que estabeleçam a real importância do *T. gondii* no tangente à saúde pública e saúde animal nas regiões tropicais e temperadas.

Palavras-Chave: *Toxoplasma gondii*. Felídeos silvestres. Felídeos neotropicais. Toxoplasmose.

Introdução

O desconhecimento da ocorrência de doenças em populações de animais silvestres vem sendo discutido há décadas e tornou-se consenso entre pesquisadores, que informações da distribuição de vários agentes são insuficientes. Um recente estudo salienta a limitada existência de dados que quantifiquem o risco relativo da saúde humana, principalmente de doenças zoonóticas que apresentam transmissão inter-espécies^{1,2}.

No caso dos felídeos silvestres, alguns patógenos têm sido descritos, com poucos avanços na compreensão da história natural e fundamentalmente das interações epidemiológicas entre as populações silvestres e domésticas ou do homem. *Toxoplasma gondii* constitui um importante agente com impacto na saúde pública pelas características zoonóticas amplamente conhecidas³.

Excluindo o *Puma concolor*, o *Lynx rufus* nos Estados Unidos e o *Lynx canadensis* do Canadá⁴ todas as demais espécies de felídeos neotropicais encontram-se em diferentes categorias de vulnerabilidade⁵ pelas ações antrópicas sobre a biodiversidade⁶ especialmente as duas únicas espécies endêmicas da América do Sul, o *Leopardus guigna* (kodkod) do Chile e o *L. jacobita* (gato andino) da cordilheira dos Andes. Neste panorama pouco favorável, poucos conhecimentos biológicos, ecológicos e infecciosos existem sobre as doze espécies de felídeos silvestres que circulam no continente americano.

A toxoplasmose nos pequenos felídeos neotropicais

Teoricamente os 15 gêneros e as 41 espécies de felídeos agrupadas nas subfamílias Felinae e Pantherinae do mundo, incluindo o gato doméstico, são hospedeiros definitivos de *T. gondii*⁷. Experimental ou naturalmente os estudos demonstraram eliminação de oocistos em seis das oito espécies de felídeos neotropicais brasileiros (Quadro 1): jaguatirica *Leopardus pardalis*, gato maracajá *L. wiedii*, gato-do-mato-pequeno *L. tigrinus*, gato-do-mato-grande *L. geoffroyi*, gato palheiro *Leopardus colocolo*, jaguarundi *Puma yagouaroundi*, onça-parda *P. concolor* e onça-pintada *Panthera onca*^{8,9,10}.

A quantidade de oocistos de *T. gondii* eliminados pelos gatos nas fezes é elevada, entretanto o diagnóstico é difícil devido ao curto período de excreção (ao redor de três semanas), podendo ocasionalmente ocorrer novas eliminações¹¹. Nos felídeos silvestres, em alguns casos a eliminação é associada a episódios diarreicos. Na Bélgica um tigre siberiano teve um surto diarreico de 14 dias, com uma concentração de 200.000 oocistos/grama de fezes¹². Também em cativeiro, *Felis silvestris*, *Prionailurus bengalensis euptilurus* e *Leopardus geoffroyi* apresentaram vários episódios diarreicos, todos com eliminação de oocistos¹³. Mas em animais de vida livre pouco se conhece da quantidade e período de eliminação. Em *P. concolor* a concentração foi estimada entre $2,4 \times 10^5$ a $12,5 \times 10^6$ oocistos/grama de fezes¹⁴.

Estima-se que a contaminação ambiental anual seja de 94 a 4.671 oocistos/m², por fezes de felinos domésticos naturalmente infectados¹⁵. Níveis maiores podem ocorrer na natureza devido aos felídeos silvestres, considerando que alguns hábitos comportamentais podem contribuir na dispersão dos oocistos. Nos leões (*Panthera leo*), a reprodução é programada e ninhadas de filhotes convivem num mesmo local. Assim, logo após a primo-infecção pelo *T. gondii* estas áreas receberiam grandes cargas parasitárias¹⁶.

Nos felídeos neotropicais, pontos de defecação ou latrinas, são consideradas áreas de demarcação territorial e encontro social de adultos e filhotes¹⁷ concentrando duas ou mais fezes de diferentes tempos de eliminação, indicando o uso repetido. A maioria situa-se em sambaquis e na base de árvores (68%), entre rochas (17%) e trilhas (15%) como demonstram estudos feitos com *L. geoffroyi*, nas 182 amostras fecais obtidas em Monte Deserto, Argentina¹⁸ e nas 1.274 amostras de 357 pontos de defecação de cinco parques naturais observou-se em média 6,1 amostras de fezes por ponto¹⁹. Fezes concentradas numa mesma área e o contato direto com animais susceptíveis facilitaria a transmissão e a manutenção do ciclo silvestre de *T. gondii*^{12,20,21}.

As duas vias clássicas na transmissão de *T. gondii* compreendem a ingestão de cistos teciduais viáveis e presentes em quase todos os animais de sangue quente ou a ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos, contaminantes de água e alimentos.

O impacto epidemiológico dos oocistos no ambiente foi registrado no Canadá em 1995. Embora a pesquisa de oocistos na água do reservatório não tenha sido bem sucedida, amostras fecais de um *P. concolor* capturado na região e a análise de fezes coletadas no ambiente apontaram este animal como o responsável direto da toxoplasmose hídrica que acometeu a população humana pelo isolado TgCgCa1^{14,22,23}.

A toxoplasmose hídrica foi documentada no Panamá²⁴ em 39 dos 600 soldados estadunidenses, e no Brasil em 155 habitantes de Santa Isabel do Ivaí, Paraná²⁵. Neste último surto as características biológicas e moleculares dos isolados determinaram a presença do genótipo BrI de ampla circulação na região (outbreak1, outbreak2 e TgCatBr85)²⁶. Na Guiana Francesa²⁰ comprovou-se a participação do genótipo atípico GUY-2004-JAG (hoje denominado tipo 12)²⁷ como causa da toxoplasmose fatal em pacientes imunocompetentes. Em todos estes estudos existiu associação entre água de consumo não tratada e a presença de felinos domésticos e silvestres, com graves implicações clínicas⁷.

Nas Américas, felídeos neotropicais foram incorporados nas culturas pré-colombianas, numa relação místico-religiosa que ainda prevalece em várias comunidades ameríndias e junto a outros animais silvestres fazem parte da medicina tradicional brasileira em práticas zoterapêuticas para tratamento de doenças^{28,29} sendo utilizados como amuletos³⁰ e como alimento por comunidades indígenas do amazonas colombiano e da Nova Guiné³¹. Na ausência de gatos domésticos, a presença de felídeos silvestres foi fator de risco ligado à transmissão da toxoplasmose, concluíram os estudos feitos em comunidades indígenas no Panamá, na Venezuela e na Amazônia brasileira^{32,33,34,35,36,37,38,39,40} e recentemente em soldados do exército de selva colombiano⁴¹.

Cadeia alimentar e papel na epidemiologia da toxoplasmose

O impacto das espécies de vida silvestre na transmissão e epidemiologia da toxoplasmose tem sido objeto de estudo na última década, no intuito de estabelecer a diversidade genética e a estrutura da população selvática e/ou doméstica do parasita⁴². Várias

pesquisas envolvendo sorologia, detecção molecular e isolamento de *T. gondii* têm sido feitas em diferentes ordens de mamíferos brasileiros^{9,36,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53, 54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65}. Embora discutível, as pesquisas indicam que a reprodução assexuada, nestes hospedeiros intermediários, é responsável pela expansão clonal do *T. gondii* e suficiente para manter o ciclo do parasito sem a presença de felídeos, movimentando-se na cadeia alimentar pelo carnivorismo⁶⁶.

A taxa de infecção por carnivorismo é proporcional à prevalência do coccídio nos animais predados^{3,16}. Teoricamente, todas as espécies dos diferentes níveis biológicos podem conter cistos do parasita, mas diferenças entre prevalências existem segundo a preferência biótica dos animais (arborícola estrito, arborícola e terrestre ou terrestre estrito)⁶⁷.

Existem grandes variações na composição da dieta dos felídeos neotropicais, originadas pela distribuição biogeográfica da fauna e sazonalidade climática (Quadro 2)^{68,69}. Esta plasticidade na alimentação tem reflexo na epidemiologia das doenças de ciclo silvestre. A jaguatirica (*L. pardalis*) é um felino generalista, mamíferos arborícolas menores de 100g compõem a dieta e eventualmente espécies maiores como *Dasyprocta punctata* (paca), *Choloepus didactylus* (bicho-preguiça), xenartros e primatas neotropicais (*Alouatta guariba clamitans*)^{69,70,71,72,73,74,75}. O gato maracajá (*L. wiedii*) tem habilidade na procura de marsupiais, aves e répteis^{76,77}. O gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) é um predador oportunista terrestre, arbóreo ou semiaquático, de pequenos mamíferos (<400g) e aves aquáticas (<200g)^{68,78,79}. O gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) ingere roedores e alguns mamíferos maiores como *Bradypus variegatus* (preguiça de três dedos)⁷⁵. Insuficientes são os registros dos hábitos alimentícios do gato-palheiro (*L. colocolo*); espécies de roedores *Lagidium viscacia*, *Phyllotis* spp. e *Ctenomys* spp. foram descritas como presas^{80,81}. O *Puma yagouaroundi* (jaguarundi) possui na dieta várias espécies de aves e didelphídeos^{76,82}.

Em algumas circunstâncias, o predador pode virar presa, casos raros foram registrados de um *Puma concolor* predando *Leopardus pardalis*⁸³ *P. concolor* v.s *P. yagouaroundi*⁷³ e casos infrequentes de canibalismo entre *L. pardalis*⁸⁴.

Os níveis de infecção das presas estão relacionados com a susceptibilidade das espécies, contaminação ambiental por oocistos e tempo de vida. Animais escavadores e mamíferos terrestres e/ou arborícolas são mais expostos a *T. gondii*, enquanto que espécies com curto período de vida tem menos chance de exposição ao agente^{46,48}.

Espécies de elevada massa corpórea têm altos índices de anticorpos anti-*T. gondii*. Na infecção de *Felis catus* os roedores, lagomorfos e aves, tiveram maior impacto na prevalência dos felinos⁸⁵ com menor índice de sororeagentes nas áreas com maior presença de aves. Os machos tiveram cinco vezes mais chance de contrair o parasita, uma vez que as fêmeas consomem principalmente pequenos roedores enquanto que machos percorrem um território maior predando todos os níveis da cadeia alimentar.

Adicionalmente, modificações etológicas do hospedeiro intermediário podem aumentar significativamente a taxa de predação pelo felino e inclusive por outros animais carnívoros, assegurando a transmissibilidade do parasita. Nos roedores, a infecção crônica pelo *T. gondii* afeta as funções sensoriais, locomotoras, de memória espacial e defensiva, diminuição da ansiedade e a sensação neofóbica (medo à novidade e ao odor do gato)^{86,87} contribuindo sua predação pelos felinos.

Soro-epidemiologia do *T. gondii* nos felídeos silvestres neotropicais

Estudos soro-epidemiológico da toxoplasmose dos felídeos silvestres indicam ampla exposição ao parasita no mundo³. No Brasil as primeiras descrições da presença de anticorpos contra *T. gondii* datam de 1977. No zoológico de São Paulo, seis dos nove *L. tigrinus* e cinco dos seis *L. pardalis* estudados, foram positivos no teste de Sabin-Feldman, apesar dos resultados negativos ao bioensaio em camundongos⁶⁴.

Apesar da pouca informação existente, os testes sorológicos em geral apresentam boa concordância diagnóstica, como observado na espécie doméstica. O estudo de 33 amostras de animais silvestres exóticos naturalmente infectados, indicou que o teste imunoenzimático ELISA-IgG é superior aos testes de aglutinação em látex (LAT) e de inibição da

hemaglutinação (IH)⁸⁸. A avaliação de 88 amostras de felídeos neotropicais sugere que a sensibilidade do LAT é menor que a do MAT (teste de aglutinação modificada)⁸⁹. Soros de felídeos neotropicais em cativeiro, demonstraram que resultados concordantes para os testes MAT e IH estiveram somente em oito amostras positivas (38,1%) e em três negativas 14,3% das 21 analisadas⁹⁰.

Em animais de vida livre, são poucos os estudos de prevalência e as informações correspondem, na sua maioria, aos zoológicos ou centros de proteção da vida silvestre seja nas Américas ou em outras regiões (Quadro 3). Duas grandes pesquisas em zoológicos brasileiros^{91,92} estabeleceram prevalências de 52,8% (253/481) e de 59,6% (65/109), nas espécies *L. colocolo*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *L. pardalis*, *L. geoffroyi* e *P. yagouaroundi* e concluiu-se que animais adultos (>3 anos), alimentados com carne crua congelada por menos de sete dias, assim como o fornecimento de carcaças de animais atropelados são fatores de risco para a infecção e manutenção desta nos centros de conservação. Observou-se também que os animais capturados foram três vezes mais susceptíveis à infecção que os nascidos em cativeiro⁹³.

A dificuldade na coleta de amostras de felídeos silvestres restringe a realização de inquéritos mais aprimorados e estudos populacionais da toxoplasmose são ainda escassos. Um estudo soro-epidemiológico conduzido em 15 países do continente americano com *P. concolor* (76/346) e *L. rufus* (26/52) indica que existem diferenças geográficas, sendo maior a prevalência para *T. gondii* nas fêmeas de puma de vida livre da América do Sul, fato associado ao tipo e a susceptibilidade das presas⁹⁴. Adultos e fêmeas de lince pardo de vida livre nos Estados Unidos apresentaram maior prevalência com 83% (109/131) dos animais positivos pelo MAT⁹⁵. No México, estas variáveis foram analisadas em 26 indivíduos de jaguatirica, demonstrando maior prevalência entre machos e sub-adultos, quando avaliados pelo LAT⁹⁶. No Brasil, a soropositividade pelo MAT foi registrada em todos os três indivíduos capturados de *L. pardalis* do Pará⁹⁷.

A co-infecção do *T. gondii* com agentes imunossupressores acontece em felinos domésticos e silvestres⁹⁸. Felídeos exóticos em cativeiro na Tailândia⁹⁹, foram reagentes a *T. gondii* e ao vírus de leucemia felina. Nos Estados Unidos, pumas de vida livre e gatos Pallas de cativeiro reagiram concomitantemente ao vírus de imunodeficiência felina^{100,101}. No Chaco boliviano, a prevalência de *T. gondii* em *L. geoffroyi* e *L. pardalis* de vida livre foi de 63,2%, reagindo ao vírus da cinomose canina, calicivírus felino e vírus da panleucopenia felina^{102,103}. Soros de *L. tigrinus* (2/2) e *L. pardalis* (1/1) de vida livre do Brasil, reagiram quando testados para herpes vírus-1, calicivirus (FHV-1), coronavírus (FCoV), parvovirus (FPV) e *Bartonella henselae*¹⁰⁴ agentes infecciosos também detectados em felídeos neotropicais em cativeiro de zoológicos brasileiros, com prevalências para FHV-1 19,6%, FCV 52,9%, FPV 68,6%, FCoV 25,2%, *Ehrlichia canis* 0,7% e *B. henselae* 50%¹⁰⁵.

A presença destes agentes em populações de felídeos silvestres da América do Sul preocupa a pesquisadores no sentido de compreender que tipo de interações ocorre quando as populações de felinos domésticos sobrepõem-se sob as populações silvestres e qual o papel destes hospedeiros como “*spill-over*” ou “*spill-back*” de vírus imunossupressores felinos¹⁰⁶.

Toxoplasmose clínica nos felídeos silvestres

À exceção do *Lynx rufus*, não existem descrições no continente americano da toxoplasmose clínica envolvendo pequenos felídeos silvestres neotropicais os relatos existentes correspondem a felídeos silvestres exóticos mantidos em cativeiro³.

Os felídeos silvestres apresentam-se sororeagentes assintomáticos à infecção ou com sinais inespecíficos¹⁰⁷. A severidade da infecção está relacionada com a virulência e a variabilidade genética do parasita, a resposta imune do hospedeiro⁵⁹ e à co-infecção com outros agentes imunossupressores¹⁰⁸. Na forma generalizada ocorrem sinais neurológicos como encefalite, midríase, atrofia muscular, ataxia de membros posteriores, pneumonia e miocardite³ e nas formas severas lesões atípicas como degeneração da retina e necrose dos linfonodos do trato digestivo^{109,110}.

O gato das areias (*Felis margarita*) e o gato Pallas (*Otocolobus manul*)^{108,111} são até hoje as duas espécies mais susceptíveis, nas quais a transmissão congênita acontece com elevada mortalidade neonatal (50-58%). Nesta última, filhotes de fêmeas soropositivas não adquirem imunidade ao nascer¹¹². A explicação estaria na co-evolução com *Toxoplasma* uma vez que gatos domésticos não são animais de companhia na cultura tibetana e condições ambientais extremas (altitude e temperatura) não permitem a esporulação dos oocistos, limitando a exposição dos hospedeiros ao agente e consequentemente a imunidade^{101,113}.

No animal infectado, ainda é desconhecida a afinidade de *T. gondii* pelos tecidos e órgãos, a preferência pelo sistema nervoso central é baseada no modelo de infecção em camundongo e o número de cistos produzidos, assim como sua localização espacial, não está relacionado com a concentração do inóculo. Entretanto, é possível que exista relação entre presença de cistos em áreas específicas do cérebro e mudanças comportamentais do hospedeiro¹¹⁴.

Utilizando o modelo de bioensaio em camundongo, avaliou-se a distribuição de *T. gondii* em gatos experimentalmente infetados^{115,116}. No primeiro estudo, o isolamento foi possível em coração (5/7), músculo esquelético e cordão espinal (4/7) e cérebro (3/7); no segundo estudo uma maior apresentação foi registrada na língua (9/9), coração (5/9), cérebro (4/9) e olhos (1/9). Posteriormente, em gatos naturalmente infectados no Brasil demonstrou-se, no bioensaio em camundongo, que a densidade de *T. gondii* é menor em cérebro (7/54), entretanto pelo bioensaio em gatos, resultados melhores foram obtidos em músculo esquelético (9/15) e coração (13/15)¹¹⁷.

A detecção molecular de *T. gondii* pelo gene B1 quando utilizado tecido cardíaco, músculo ou homogeneizado cerebral de puma jaguarundi teve resultados negativos, entretanto o isolamento foi bem sucedido no bioensaio com músculo esquelético, indicando maior concentração do parasita neste tecido¹²². Os autores enfatizam que a quantidade de DNA de *T. gondii* presente em amostras primárias de replicação do material no modelo camundongo¹¹⁸.

Diversidade genética do *T. gondii* em felídeos silvestres

O estudo clássico de virulência ou capacidade patógena da infecção no camundongo é insuficiente para explicar as diferenças marcantes entre isolados derivadas do polimorfismo existente no genoma parasitário. Polimorfismo que vem sendo desvendado perante genotipagem *multilocus* PCR-RFLP com uso de marcadores moleculares^{119,120,121} permitindo importantes avanços no estudo da estrutura populacional de *T. gondii*.

Tipicamente, isolados originários da Europa e América do Norte são classificados nas linhagens genéticas tipo I, II e III¹²². Estrutura clonal caracterizada em diferentes hospedeiros de regiões geográficas distantes, com divergência genética <1% entre linhagens¹²³. Em termos de virulência, a divergência é maior. Na infecção experimental, o tipo I provoca letalidade elevada em camundongos com rápida multiplicação do parasita, o tipo II leva à infecção crônica, com multiplicação lenta e formação de cistos teciduais, menos frequente é o tipo III, que embora pouco virulento, pode causar a morte dos camundongos inoculados em poucas semanas ou meses pós inoculação¹²⁴.

Outros estudos propõem uma estrutura clonal composta pelas linhagens SA1 e SA2 (Américas do Sul e Central), RW (Europa, Ásia, África e América do Norte) e WW de distribuição mundial¹²⁵. As distâncias genéticas entre isolados levantaram a hipótese que *T. gondii* teve origem na América do Sul, com maior variabilidade genética, as populações RW e WW foram distribuídas no século XVI surgindo logo no continente Americano.

No Brasil o panorama é diferente, uma elevada diversidade genética de *T. gondii* ficou evidente com os marcadores moleculares SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Tipificados 48 genótipos nos 125 isolados de animais domésticos, foram denominadas as linhagens clonais BrI, BrII, BrIII e BrIV, como as de maior ocorrência além de várias outras distintas e menos prevalentes, que, ao contrário do resto do mundo, demonstraram estrutura populacional epidêmica com pouca expansão clonal¹²⁶.

No livro “Toxoplasmose dos animais e do homem”³ descreve-se a tentativa de vários pesquisadores no isolamento de *T. gondii* em felídeos silvestres. Os estudos demonstram que

embora alguns animais sejam soropositivos para o agente, em muitos casos não foi possível a detecção, pela PCR, devido a baixa quantidade do parasita no tecido ou a fragmentos de tecido muito pequenos ao ser coletados¹²⁷. Um resumo das pesquisas feitas é apresentado na quadro 4.

Nos Estados Unidos, o primeiro isolado viável de *T. gondii* em felídeos silvestres *in situ* foi obtido do cérebro de *L. rufus*, embora não caracterizado geneticamente, o bioensaio em camundongo demonstrou baixa virulência¹²⁸. Posteriormente, em seis *L. rufus* sorologicamente positivos ao *T. gondii* (MAT 25), obteve-se cinco isolados viáveis de virulência média (18 a 31 dias) ao bioensaio de tecido cardíaco é tipificados como genótipo II¹¹⁸.

Genótipos atípicos de felídeos silvestres neotropicais e sua relação com a toxoplasmose humana, foram primeiramente estudados no Canadá^{14,129}. Oocistos de *T. gondii* coletados em fezes de *P. concolor* foram inoculados em camundongo com apresentação de virulência moderada (9-16 dias), o posterior bioensaio em gatos demonstrou a eliminação fecal de oocistos; após uma década de criopreservação na genotipagem o isolado da amostra B foi tipificado como recombinante I-II-III (TgCgCa2), enquanto que a amostra A foi diferente dos arquétipos anteriores (TgCgCa1, Cougar2, Cougar ou COUG)¹³⁰.

In situ, nos Estados Unidos, foram caracterizadas pela PCR-RFLP do gene B1 e dos locus SAG1 e GRA6 30 amostras de felídeos silvestres. Encontrou-se os genótipos I e II em *P. concolor*, o recombinante II-III no *L. rufus* e o atípico-X em ambas as espécies. Este último, correlacionado com a contaminação litorânea da Califórnia e à apresentação da toxoplasmose em focas marinhas da região^{127,131}.

Posteriormente um genótipo atípico, foi caracterizado na Guiana Francesa em *Panthera onca* de vida livre, vinculado à toxoplasmose em humanos imunocompetentes (GUY-2004-JAG) pelo sequenciamento com seis marcadores de microssatélite, o bioensaio de tecido cardíaco do felino provocou a morte de todos os comundongos (11 a 33 dias pós-inoculação)²⁰. Na Alemanha, DNA de *T. gondii* foi detectado em amostras primarias de cérebro e pulmão de *Felis silvestris silvestris*, duas foram caracterizadas com variante tipo II com alelo I no locus Apico (TgFsGER02, TgFsGER03) e o genótipo tipo II (TgFsGER01) usando nove marcadores

moleculares. Estes resultados são congruentes com a distribuição clonal do parasita na Europa, predominantemente tipo II¹³².

Em felídeos silvestres *ex situ*, numa *Panthera tigris altaica* do zoológico de Amneville, França, homogeneizado de tecido cardíaco inoculado em camundongos, o isolado foi caracterizado como arquétipo II, pelas enzimas de restrição Hha I no *locus* SAG2 e Mbo II e EcoRI no *locus* GRA7¹³³. Arquétipo isolado também, num gato das areias (*Felis margarita*) no Qatar (TgSandcatQA1), no estudo foram registrados nos Emirados Árabes Unidos três genótipos atípicos (TgSandcatUAE1-3), previamente documentado em cães na Sri Lanka¹⁰⁹.

No Brasil⁵⁹ em animais do zoológico Parque Dois Irmãos de Recife, Pernambuco, isolou-se, pela primeira vez, *T. gondii* num *P. yagouaroundi* por bioensaio em camundongos e na genotipagem um novo genótipo virulento foi observado (TgJabBr1). Outro isolado de *L. tigrinus*, do mesmo zoológico, foi caracterizado como NOVO 5 e, o marcador molecular de virulência CS3 tipificou esta amostra como alelo tipo I, concordante com os resultados de virulência obtidos pelo bioensaio (100% mortalidade e 17 dias de sobrevivência dos camundongos inoculados)¹³⁴.

Os felídeos silvestres no ciclo selvagem do *Toxoplasma*: Implicações na saúde pública

Na Europa e na América do Norte, em geral, o gato doméstico e outros animais domésticos ou silvestres atuam na transmissão de *T. gondii*. Estima-se que 80% da população humana imunocompetente é assintomática à infecção clássica pelo *T. gondii*, causada pela linhagem clonal tipo II e 15 a 20% apresentam sintomatologia febril e ganglionar. Uma forma grave poder ocorrer em mulheres gestantes primo-infectadas e em pacientes imunossuprimidos com a participação do tipo III, de virulência variável, e do tipo I, altamente virulento, causando encefalite, coriorretinites, infecção congênita e mortalidade neonatal^{135,136,137}.

Ao contrário, a “toxoplasmose amazônica”, ou da “floresta tropical” ou “toxoplasmose guianense” é a forma mais severa da doença clínica em pacientes imunocompetentes. Neste ciclo participam os felídeos silvestres e praticamente todos os mamíferos e aves da floresta

como hospedeiros intermediários do parasita. A transmissão ocorre seja pela ingestão de cistos contidos na carne destes animais ou pela ingestão de água não potável contaminada por oocistos eliminados nas fezes dos felídeos⁶⁷.

Na Guiana Francesa, 44 primo-infecções humanas foram registradas entre 1997 a 2005 (sete crianças, dois casos de mãe e filho e 33 pacientes não relacionados com a epidemia). Neste episódio três genótipos atípicos de *T. gondii* patogênicos foram, genotipados (GUY-2002-KOE, GUY-2003-MEL e RMS-2003-DJO)¹³⁸. Duas semanas pós-infecção os pacientes apresentaram quadro clínico febril, alteração mental diarreia, coriorretinite e severo compromisso pulmonar, resultante numa toxoplasmose disseminada com mortalidade de 6,8%. Os autores sugerem que genótipos atípicos são menos adaptados ao sistema imune do homem¹³⁹.

Ainda com pouca informação, os estudos revelam ampla diversidade genética, relacionada com as características patogênicas do parasita nos hospedeiros¹¹⁸ mas o efeito na saúde do ecossistema é ainda intrincado e pouco estudado¹⁴⁰. Pesquisas são necessárias, a fim de elucidar a circulação do parasita no ambiente, pela contaminação ambiental com oocistos eliminados por felídeos silvestres brasileiros¹⁴¹ inclusive em áreas onde o contato homem-animal doméstico e silvestre vem se tornando maior^{20,142,143,144,145,146,147,148,149,150}.

Apesar de algumas restrições no habitat, todas as espécies felinas silvestres possuem ampla distribuição na região zoogeográfica neotropical, desde o Sudoeste do Texas, nos Estados Unidos, até o extremo Sul da Argentina e calcula-se uma população de pequenos felídeos neotropicais entre 800.000 a 3 milhões de indivíduos¹⁵¹.

O número de encontros com a população humana no Brasil é crescente, de esporádicos a cada vez mais frequentes. No ano 2012, pelo menos 57 eventos foram registrados pela ferramenta Google *alerts*, envolvendo jaguatirica (24), onça-parda (20), gato-do-mato (9) e onça-pintada (4) em centros urbanos e áreas rurais com ataques a humanos e atropelamentos em estradas.

Autoestradas de baixo e alto trânsito são barreiras cruciais para o movimento da fauna entre diferentes biomas e constituem lugares atrativos para os felídeos, onde podem obter, de

maneira fácil, animais atropelados para sua dieta. A chance de observar um felino silvestre numa estrada é sete vezes maior do que a probabilidade de serem observados no interior das florestas¹⁵².

Estudos de atropelamentos de animais silvestres nas estradas brasileiras revelam dados alarmantes. Em Santa Catarina (BR-116, BR-282 e BR-470) 257 indivíduos foram atropelados (cinco *L. tigrinus*, quatro *P. yagouaroundi* e um *L. wiedii*)¹⁵³. Na província de Serrana de Cáceres-MT (BR 070) registraram-se durante um ano, colisão veicular com 211 indivíduos, entre *P. concolor*, *L. pardalis*, *P. yagouaroundi* e *L. colocolo*¹⁵⁴. Nas BR-101 e RS-389, na região sul, a mortalidade das espécies nativas foi de 869 mortes em 92 espécies e um único exemplar de *L. tigrinus*¹⁵⁵. Para os felídeos silvestres os números podem ser maiores, visto que alguns animais feridos fogem para dentro da mata ou ainda outros animais carnívoros levam as carcaças para fora do local de atropelamento.

Considerações finais

Algumas questões devem ser respondidas: a) Nos centros urbanos é possível que o risco de transmissão de isolados silvestres seja igual ao descrito nas regiões florestais? b) Qual seria a probabilidade de isolados de *T. gondii*, originários de felídeos silvestres, estar circulando em regiões urbanas e quão importantes seria sua participação na epidemiologia da doença? E do ponto de vista da predação: c) Qual é o verdadeiro papel dos felídeos silvestres no ciclo selvático da toxoplasmose, a contaminação ambiental pelos oocistos, ou a conservação e troca genética do parasita?

Assim sendo o conhecimento do papel desses felídeos na epidemiologia de *T. gondii* é de relevante importância para a introdução de técnicas de controle e no estudo da dinâmica do parasita no ciclo silvestre.

Agradecimentos

WAC-F agradece à CAPES PEC-PG pelo auxílio da bolsa de estudos de doutorado e ao CNPq pela bolsa pesquisa a SMG.

Referências

1. LLOYD-SMITH, J. O.; GEORGE, D.; PEPIN, K. M.; PITZER, V. E.; PULLIAM, J. R. C.; DOBSON, A. P.; HUDSON, P. J.; GRENFELL, B. T. Epidemic dynamics at the human-animal interface. **Science**, v. 326, n. 5958, p. 1362-1367, 2009.
2. SCOTCH, M.; ODOFIN, L.; RABINOWITZ, P. Linkages between animal and human health sentinel data. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 15, p. 1-9, 2009.
3. DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, 2010b. 338 p.
4. OLIVEIRA, T. G.; TORTATO, M. A.; KASPER, C. B.; MARQUES, R. V.; MARQUES, M. C.; CASSAR, K. The quest for little known cats of the Americas Project wild cats of Brazil. **Wild Cat News**, v. 2, n. 2, p. 12-19, 2006.
5. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **The IUCN red list of threatened species**. Version 2012.1, 2012. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 17set. 2012.
6. LOVERIDGE, A. J.; WANG, S. W.; FRANK, L. G.; SEIDENSTICKER, J. People and wild felids: conservation of cats and management of conflicts. In: MACDONALD, D. W.; LOVERIDGE, A. J. **Biology and conservation of wild felids**. New York: Oxford University Press, 2010. p. 161-195.
7. JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010.
8. ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 190-196, 2010.
9. FERREIRA, J. R. V.; NAVARRO, I. T. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em animais selvagens - Revisão. **Semina: Ciências Agrárias Londrina**, v. 15, n. 1, p. 94-100, 1994.
10. PIZZI, H. L.; RICO, C. M.; PESSAT, O. A. N. Hallazgo del ciclo ontogénico selvático del *Toxoplasma gondii* en félidos salvajes (*Oncifelis geoffroyi*, *Felis colocolo* y *Felis eirá*) de la Provincia de Córdoba. **Revista Militar de Veterinaria**, v. 25, p. 293-300, 1978.
11. DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.
12. DORNY, P.; FRANSEN, J. Toxoplasmosis in a Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). **Veterinary Record**, v. 125, n. 26-27, p. 647-647, 1989.

13. LUKEŠOVÁ, D.; LITERÁK, I. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 1-7, 1998.
14. ARAMINI, J. J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island Cougars (*Felis concolor vancouverensis*): Serology and oocyst shedding. **International Journal for Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 438-440, 1998.
15. DABRITZ, H. A.; MILLER, M. A.; ATWILL, E. R.; GARDNER, I. A.; LEUTENEGGER, C. M.; MELLI, A. C.; CONRAD, P. A. Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. **JAVMA**, v. 231, n. 11, p. 1676-1684, 2007.
16. HOVE, T.; MUKARATIRWA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm-reared ostriches and wild game species from Zimbabwe. **Acta Tropica**, v. 94, n. 1, p. 49-53, 2004.
17. MORENO, R.; GIACALONE, J. Ecological data obtained from latrine use by ocelots (*Leopardus pardalis*) on Barro Colorado Island, Panama. **Tecnociencia**, v. 8, n. 1, p. 7-21, 2006a.
18. BISCEGLIA, S. B. C.; PEREIRA, J. A.; TETA, P.; QUINTANA, R. D. Food habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in the central Monte desert of Argentina. **Journal of Arid Environments**, v. 72, n. 6, p. 1120-1126, 2008.
19. SOLER, L.; LUCHERINI, M.; MANFREDI, C.; CIUCCIO, M.; CASANAVE, E. B. Characteristics of defecation sites of the Geoffroy's cat *Leopardus geoffroyi*. **Mastozoologia Neotropical Mendoza**, v. 16, n. 2, p. 485-489, 2009.
20. DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; SERRURIER, B.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Case report: Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French Guiana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 195-197, 2008.
21. WALLACE, G. D. Intermediate and transport host in the natural history of *Toxoplasma gondii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, n. 4, p. 456-464, 1973.
22. BRITISH COLUMBIA TOXOPLASMOSIS TEAM (BCTT). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water - British Columbia. **Canada Communicable Disease Report**, v. 21, n. 18, p. 1-2, 1995.
23. STEPHEN, C.; HAINES, D.; BOLLINGER, T.; ATKINSON, K. Serologic evidence of *Toxoplasma* infection in cougars on Vancouver island, British Columbia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 37, n. 4, p. 241, 1996.
24. BENENSON, M. W.; TAKAFUJI, E. T.; LEMON, S. M.; GREENUP, R. L.; SULZER, A. J. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. **The New England Journal of Medicine**, v. 307, n. 11, p. 666-669, 1982.
25. de MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M. T.; SILVA, A. J. da; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326-329, 2006.

26. VAUDAUX, J. D.; MUCCIOLI, C.; JAMES, E. R.; SILVEIRA, C.; MAGARGAL, S. L.; JUNG, C.; DUBEY, J. P.; JONES, J. L.; DOYMAZ, M. Z.; BRUCKNER, D. A.; BELFORT JR., R.; HOLLAND, G. N.; GRIGG, M. E. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1226-1233, 2010.
27. DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M. J.; THOMAS, N. J.; BECKMEN, K. B.; SINNETT, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P. A.; McFEE, W. E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O. C. H.; FERREIRA, L. R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E. B.; ZHOU, H.; FELIX, T. A.; SU, C. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 11, p. 1139-1147, 2011.
28. ALVES, R. R. N.; ALVES, H. N. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, n. 9, p. 1-43, 2011.
29. ALVES, R. R. N. Fauna used in popular medicine in Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2009.
30. GONZÁLEZ-MAYA, J. F.; ZÁRRATE-CHARRY, D.; HERNÁNDEZ-ARÉVALO, A.; CEPEDA, A. A.; BALAGUERA-REINA, S. A.; CASTAÑO-URIBE, C.; ANGE, C. Traditional uses of wild felids in the Caribbean region of Colombia: new threats for conservation. **Latin American Journal of Conservation**, v. 1, n. 1, p. 64-69, 2010.
31. WALLACE, G. D.; ZIGAS, V.; GAJDUSEK, D. C. Toxoplasmosis and cats in New Guinea. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, n. 1, p. 8-13, 1974.
32. BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A.; SODRÉ, F. C.; PINTO, G. M. T.; AMENDOEIRA, M. R. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 17-20, 2008.
33. BORGES, F. G. **Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* na população da calha do rio Purus no município de Lábrea, Amazonas**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2006.
34. CHACIN-BONILLA, L.; SANCHEZ-CHÁVEZ, Y.; MONSALVE, F.; ESTEVEZ, J. Seroepidemiology of toxoplasmosis in Amerindians from Western Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 131-135, 2001.
35. ETHEREDGE, G. D.; MICHAEL, G.; MUEHLENBEIN, M. P.; FRENKEL, J. K. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama. **Pan American Journal of Public Health**, v. 16, n. 3, p. 176-186, 2004.
36. FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e agrupamentos humanos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 1-2, p. 99-109, 1980.
37. LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; BARRUZI, R. Toxoplasmosis serologic tests in Brazilian Indians (Kren-Akorore) of recent contac with civilized man. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 19, n. 4, p. 232-236, 1977.

38. LOVELACE, J. K.; MORAES, M. A.; HAGERBY, E. Toxoplasmosis among the Ticuna Indians in the state of Amazonas, Brazil. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 30, n. 3, p. 295-300, 1978.
39. ROSA, M. D. L.; BOLIVAR, J.; PEREZ, H. A. Infección por *Toxoplasma gondii* en amerindios de la selva amazónica de Venezuela. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 59, p. 759-762, 1999.
40. SOBRAL, C. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; TEVA, A.; PATEL, B. N.; KLEIN, C. H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 37-41, 2005.
41. GÓMEZ-MARÍN, J. E.; DE-LA-TORRE, A.; BARRIOS, P.; CARDONA, N.; ÁLVAREZ, C.; HERRERA, C. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 46-51, 2012.
42. LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in wild and domestic animals. In: WEISS, L.; KAMI, K. A. ***Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan, perspective and methods**. London: Academic Press, 2007. p. 133-152.
43. ANDRADE, M. C. R.; COELHO, J. M. C. O.; AMENDOEIRA, M. R. R.; VICENTE, R. T.; CARDOSO, C. V. P.; FERREIRA, P. C. B.; MARCHEVSKY, R. S. Toxoplasmosis in squirrel monkeys: histological and immunohistochemical analysis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1724-1727, 2007.
44. ANTONIASSI, N. A. B.; BOABAID, F. M.; SOUZA, R. L.; NAKAZATO, L.; PIMENTEL, M. F. A.; FILHO, J. O. X.; PESCADOR, C. A.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M. Granulomatous meningoencephalitis due to *Toxoplasma gondii* in a black-headed night monkey (*Aotus nigriceps*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 1, p. 118-120, 2011.
45. ARAÚJO, J. B.; SILVA, A. V.; ROSA, R. C.; MATTEI, R. J.; SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 328-331, 2010.
46. CARME, B.; AZNAR, C.; MOTARD, A.; DEMAR, M.; DE THOISY, B. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guiana. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2002.
47. SILVA, A. V. da; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H.; BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 81-83, 2006.
48. THOISY, B. de; DEMAR, M.; AZNAR, C.; CARME, B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 2, p. 456-459, 2003.
49. DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.

50. EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Toxoplasmosis in emperor tamarin (*Saguinus imperator*): case report. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 72-74, 1999.
51. EPIPHANIO, S.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FEDULLO, D. L.; CORREA, S. H. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 2, p. 231-235, 2000.
52. EPIPHANIO, S.; SÁ, L. R. M.; TEIXEIRA, R. H. F.; CATÃO-DIAS, J. L. Toxoplasmosis in a wild-caught black lion tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Veterinary Record**, v. 149, n. 20, p. 627-628, 2001.
53. EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATÃO-DIAS, J. L. Pathology of toxoplasmosis in captive New World primates. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 196-204, 2003.
54. FORNAZARI, F.; TEIXEIRA, C. R.; SILVA, R. C.; LEIVA, M.; ALMEIDA, S. C.; LANGONI, H. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* among Brazilian white-eared opossums (*Didelphis albiventris*). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 238-241, 2011.
55. GARCIA, J. L.; SVOBODA, W. K.; CHRYSOAFIDIS, A. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; AGUIAR, L. M.; TEIXEIRA, G. M.; LUDWIG, G.; da SILVA, L. R.; HILST, C.; NAVARRO, I. T. Sero-epidemiological survey for toxoplasmosis in wild New World monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 307-311, 2005.
56. GONDIM, L. S. Q.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R. S.; SILVA, M. S. A.; SANTOS, S. L.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; GONDIM, L. F. P. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 121-124, 2010.
57. LEITE, A. S.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Serological survey of toxoplasmosis in birds from Cracidae family in a wild bird center facility at Pernambuco State, Northeast of Brazil. **Medicina Veterinaria Recife**, v. 1, n. 1, p. 55-57, 2007.
58. MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; PENA, H. F. J.; ORTOLANI, E. L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 3, p. 572-574, 2010.
59. 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, n. 3-4, p. 377-381, 2011.
60. PIMENTEL, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; MARVULO, M. F. V.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SILVA, J. C. R.; NETO, J. E. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 1009-1014, 2009.

61. SILVA, A. V.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H.; BAGAGLI, E. Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: Serological evidence in *Dasyopus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 81-83, 2006.
62. SILVA, R. C.; ZETUN, C. B.; BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ROSA, P. S.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* and *Leptospira* spp. Infection in free-ranging armadillos. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p. 291-293, 2008.
63. SOARES, H. S.; MINERVINO, A. H. H.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, J. R.; VAN SAUERS, A. R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in *Dasyprocta aguti* from Brazil: Comparison of diagnostic techniques. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 4, p. 763-765, 2011.
64. SOGORB, F.; JAMRA, L. F.; GUIMARAES, E. C. Toxoplasmose em animais de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, n. 9, p. 191-194, 1977.
65. YAI, L. E. O.; CAÑÓN-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E. L.; CAMARGO, M. C. G. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the City of São Paulo, Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 870-871, 2003.
66. WENDTE, J. M.; GIBSONA, A. K.; GRIGG, M. E. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 96-111, 2011.
67. AJZENBERG, D.; CARME, B.; DEMAR, M.; BOUKHARI, R.; DARDÉ, M-L. La Toxoplasmose "Guyanaise". **Reveu Francophone des Laboratoires**, v. 396, p. 51-60, 2007.
68. MANFREDI, C.; LUCHERINI, M.; CANEPUCCIA, A. D.; CASANAVE, E. B. Geographical variation in the diet of geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in pampas grassland of Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 6, p. 1111-1115, 2004.
69. MORENO, R. S.; KAYS, R. W.; SAMUDIO JR, R. Competitive release in diets of ocelot (*Leopardus pardalis*) and puma (*Puma concolor*) after jaguar (*Panthera onca*) decline. **Journal of Mammalogy**, v. 87, n. 4, p. 808-816, 2006b.
70. ABREU, K. C.; MORO-RIOS, R. F.; SILVA-PEREIRA, J. E.; MIRANDA, J. M. D.; JABLONSKI, E. F.; PASSOS, F. C. Feeding habits of ocelot (*Leopardus pardalis*) in Southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 73, n. 5, p. 407-411, 2008.
71. ALIAGA-ROSSEL, E.; MORENO, R. S.; KAYS, R. W.; GIACALONE, J. Ocelot (*Leopardus pardalis*) predation on agouti (*Dasyprocta punctata*). **Biotropica**, v. 38, n. 5, p. 691-694, 2006.
72. DELIBES, M.; CALZADA, J.; CHÁVEZ, C.; REVILLA, E.; RIBEIRO, B. A.; PRADO, D.; KELLER, C.; PALOMARES, F. Unusual observation of an ocelot (*Leopardus pardalis*) eating an adult Linnaeus's two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). **Mammalian Biology**, v. 76, n. 2, p. 240-241, 2011.

73. MARTINS, R.; QUADROS, J.; MAZZOLLI, M. Hábito alimentar e interferência antrópica na atividade de marcação territorial do *Puma concolor* e *Leopardus pardalis* (Carnivora: Felidae) e outros carnívoros na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 3, p. 427-435, 2008.
74. MIRANDA, J. M. D.; BERNARDI, I. P.; ABREU, K. C.; PASSOS, F. C. Predation on *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae) by *Leopardus pardalis* (Linnaeus) (Carnivora, Felidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 793-795, 2005.
75. WANG, E. Diets of ocelots (*Leopardus pardalis*), margays (*L. wiedii*), and oncillas (*L. tigrinus*) in the Atlantic Rainforest in Southeast Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 3, p. 207-212, 2002.
76. BIANCHI, R. C.; ROSA, A. F.; GATTI, A.; MENDES, S. L. Diet of margay, *Leopardus wiedii*, and jaguarundi, *Puma yagouaroundi*, (Carnivora: Felidae) in Atlantic Rainforest, Brazil. **Zoologia**, v. 28, n. 1, p. 127-132, 2011.
77. CINTA-MAGALLÓN, C. C.; BONILLA-RUZ, C. R.; ALARCÓN-D, I.; ARROYO-CABRALES, J. Dos nuevos registros de margay (*Leopardus wiedii*) en Oaxaca, México, con datos sobre hábitos alimentarios. **Cuadernos de Investigación UNED**, v. 4, p. 1, p. 33-40, 2012.
78. CANEPUCCIA, A. D.; MARTINEZ, M. M.; VASSALLO, A. I. Selection of waterbirds by Geoffroy's cat: Effects of prey abundance, size, and distance. **Mammalian Biology**, v. 72, n. 3, p. 163-173, 2007.
79. PEREIRA, J. A.; WALKER, R. S.; NOVARO, A. L. Effects of livestock on the feeding and spatial ecology of Geoffroy's cat. **Journal of Arid Environments**, v. 76, p. 36-42, 2012.
80. GARCÍA, E. C. M.; CARRERA, C. J. D.; MOREIRA, G. J. M.; CAZÓN, C. A. V.; SANTIS, L. J. M. Microvertebrados depredados por *Leopardus pajeros* (Carnivora: Felidae) en el sur de la provincia de Mendoza, Argentina. **Mastozoología Neotropical**, v. 16, n. 2, p. 455-457, 2009.
81. WALKER, R. S.; NOVARO, A. J.; PEROVIC, P.; PALACIOS, R.; DONADIO, E.; LUCHERINI, M.; PIA, M.; LÓPEZ, M. S. Diets of three species of Andean carnivores in high-altitude deserts of Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 2, p. 519-525, 2007.
82. TÓFOLI, C. F.; ROHE, F.; SETZ, E. Z. F. Jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) (Geoffroy, 1803) (Carnivora, Felidae) food habits in a mosaic of Atlantic Rainforest and eucalypt plantations of southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 3, p. 871-877, 2009.
83. NÚÑEZ, R.; MILLER, B.; LINDZEY, F. Food habits of jaguars and pumas in Jalisco, Mexico. **Journal of Zoology**, v. 252, n. 3, p. 373-379, 2000.
84. THOMPSON, C. L. Intraspecific killing of a male ocelot. **Mammalian Biology**, v. 76, n. 3, p. 377-379, 2011.
85. AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; PONTIER, D.; GILOT-FROMONT, E. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. **Parasitology**, v. 134, n. 14, p. 1963-1971, 2007.
86. AFONSO, C.; PAIXÃO, V. B.; COSTA, R. M. Chronic *Toxoplasma* infection modifies the structure and the risk of host behavior. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32489, 2012.

87. WEBSTER, J. P. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: Playing cat and mouse. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 752-756, 2007.
88. LAPPIN, M. R.; JACOBSON, E. R.; KOLLIAS, G. V.; POWELL, C. C.; STOVER, J. Comparison of serologic assays for the diagnosis of toxoplasmosis in nondomestic felids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 2, p. 169-174, 1991.
89. SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA-NETO, J. S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 217-224, 2001.
90. SILVA CC. **Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) em felídeos selvagens nos municípios de Capitão Poço e Belém, Pará**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
91. ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; BORTOLLI, C. P. de; FALCADE, M.; SOUSA, L. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **International Journal for Parasitology**, v. 96, n. 5, p. 1007-1009, 2010.
92. SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; ADANIA, C. H.; NETO, J. S. F. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 78, n. 3-4, p. 286-295, 2007.
93. ULLMANN, L. S.; SILVA, R. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; dos SANTOS, L. C.; HOFFMANN, J. L.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A. M. S.; MONTAÑO, P.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1-2, p.144-146, 2010.
94. KIKUCHI, Y.; CHOMELA, B. B.; KASTEN, R. W.; MARTENSON, J. S.; SWIFT, P. K.; O'BRIEN, S. J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American free-ranging or captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 2, p. 1-9, 2004.
95. MUCKER, E. M.; DUBEY, J. P.; LOVALLO, M. J.; HUMPHREYS, G. Seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the Pennsylvania Bobcat (*Lynx rufus rufus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 1, p. 188-191, 2006.
96. RENDÓN-FRANCO, E.; CASO-AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, N. G.; HERNANDEZ-JAUREGUI, D. M. B.; SANDOVAL-SÁNCHEZ, A. L.; ZEPEDA-LÓPEZ, H. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in free-ranging ocelots (*Leopardus pardalis*) from Tamaulipas, Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 3, p. 829-831, 2012.
97. WHITEMAN WC. **Conservação de carnívoros e a interfase homem-fauna doméstica-fauna silvestre numa área fragmentada da Amazônia oriental brasileira**. 2007. 88 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.
98. LICKEY, A. L. A.; KENNEDY, M.; PATTON, S.; RAMSAY, E. C. Serologic survey of domestic felids in the Petén region of Guatemala. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 1, p. 121-123, 2005.

99. BUDDHIRONGAWATR, R.; TUNGSUDJAI, S.; CHAICHOUNE, K.; SANGLOUNG, C.; TANTAWIWATTANANON, N.; PHONAKNGUEN, R.; SUKTHANA, Y. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 37, n. 3, p. 15-17, 2006.
100. BEVINS, S. N.; CARVER, S.; BOYDSTON, E. E.; LYREN, L. M.; ALLDREDGE, M.; LOGAN, K. A.; RILEY, S. P. D.; FISHER, R. N.; VICKERS, T. W.; BOYCE, W.; SALMAN, M.; LAPPIN, M. R.; CROOKS, K. R.; VANDEWOUDE, S. Three pathogens in sympatric populations of pumas, bobcats, and domestic cats: Implications for infectious disease transmission. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31403, 2012.
101. KETZ-RILEY, C. J.; RITCHEY, J. W.; HOOVER, J. P.; JOHNSON, C. M.; BARRIE, M. T. Immunodeficiency associated with multiple concurrent infections in captive Pallas'cats (*Otocolobus manul*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 3, p. 239-245, 2003.
102. FIORELLO, C. V.; NOSS, A. J.; DEEM, S. L.; MAFFEI, L.; DUBOVI, E. J. Serosurvey of small carnivores in the Bolivian Chaco. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 551-557, 2007.
103. FIORELLO, C. V.; ROBBINS, R. G.; MAFFEI, L.; WADE, S. E. Parasites of free-ranging small canids and felids in the Bolivian Chaco. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 2, p. 130-134, 2006.
104. FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S. P.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and *Ehrlichia* Exposure in Brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470-477, 2006.
105. FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; WILLI, B.; MELI, M. L.; CORRÊA, S. H. R.; MARQUES, M. C.; ADANIA, C. H.; SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; NETO, J. S. F.; DURIGON, E. D.; CARVALHO, V. M. de; COUTINHO, S. D'A.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropic and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, p. 166-173, 2012.
106. TEIXEIRA, B. M.; HAGIWARA, M. K.; CRUZ, J. C. M.; HOSIE, M. J. Feline Immunodeficiency Virus in South America. **Viruses**, v. 4, n. 3, p. 383-396, 2012.
107. CHEADLE, M. A.; SPENCER, J. A.; BLAGBURN, B. L. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from southern Africa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 2, p. 248-251, 1999.
108. BASSO, W.; EDELHOFER, R.; ZENKER, W.; MÖSTL, K.; KÜBBER-HEISS, A.; PROSL, H. Toxoplasmosis in Pallas'cats (*Otocolobus manul*) raised in captivity. **Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 293-299, 2005.
109. DUBEY, J. P.; PAS, A.; RAJENDRAN, C.; KWOK, O. C. H.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; HEBEL, C.; HAMMER, S.; SU, C. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 195-203, 2010.

110. VAN RENSBURG, I. B.; SILKSTONE, M. A. Concomitant feline infectious peritonitis and toxoplasmosis in a cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 55, n. 4, p. 205-207, 1984.
111. PAS, A.; DUBEY, J. P. Fatal toxoplasmosis in sand cats (*Felis margarita*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 39, n. 3, p. 362-369, 2008.
112. KENNY, D. E.; LAPPIN, M. R.; KNIGHTLY, F.; BAIER, J.; BREWER, M.; GETZY, D. M. Toxoplasmosis in Pallas' cats (*Otocolobus felis manul*) at the Denver zoological gardens. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 2, p. 131-138, 2002.
113. BROWN, M.; LAPPIN, M. R.; BROWN, J. L.; MUNKHTSOB, B.; SWANSON, W. F. Exploring the ecologic basis for extreme susceptibility of Pallas's cats (*Otocolobus manul*) to fatal toxoplasmosis. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 691-700, 2005.
114. BERENREITEROVÁ, M.; FLEGR, J.; KUBĚNA, A. A.; NĚMEC, P. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent Toxoplasmosis: Implications for the behavioral manipulation hypothesis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28925, 2011.
115. DUBEY, J. P. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cats. **International Journal for Parasitology**, v. 63, n. 1, p. 156-157, 1977.
116. 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, n. 1, p. 15-20, 1997.
117. DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: Seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **International Journal for Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004.
118. DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DE YOUNG, R. W.; DAHL, E.; EBERHARD, M. L.; NACE, E. K.; WON, K.; BISHOP, H.; PUNKOSDY, G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; SUMNERS, J. A.; DEMARAIS, S.; HUMPHREYS, J. G.; LEHMANN, T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 67-71, 2004.
119. DARDÉ, M-L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiori di Sanità**, v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.
120. 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, n. 1, p. 1-11, 2010.
121. SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841-848, 2006.
122. HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

123. AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 3, p. 1-19, 2001.
124. MAUBON, D.; AJZENBERG, D.; BRENIER-PINCHART, M-P.; DARDÉ, M-L.; PELLOUX, H. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 299-303, 2008.
125. LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **PNAS**, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.
126. 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, n. 5, p. 561-569, 2008.
127. MILLER, M. A.; MILLER, W. A.; CONRAD, P. A.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; LEUTENEGGER, C. M.; DABRITZ, H. A.; PACKHAM, A. E.; PARADIES, D.; HARRIS, M.; AMES, J.; JESSUP, D. A.; WORCESTER, K.; GRIGG, M. E. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1319-1328, 2008.
128. WALTON, B. C.; WALLS, K. W. Prevalence of toxoplasmosis in wild animals from Fort Stewart, Georgia, as indicated by serological tests and mouse inoculation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, n. 4, p. 530-533, 1964.
129. ARAMINI, J. J.; STEPHEN, C.; DUBEY, J. P.; ENGELSTOFT, C.; SCHWANTJE, H.; RIBBLE, C. S. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Epidemiology and Infection**, v. 122, n. 2, p. 305-315, 1999.
130. DUBEY, J. P.; QUIRK, T.; PITT, J. A.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; KWOK, O. C. H.; LECLAIR, D.; HILL, R.; SU, C. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada. **International Journal for Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 42-45, 2008.
131. MILLER, M. A.; GRIGG, M. E.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; CROSBIE, P. R.; JESSUP, D. A.; BOOTHROYD, J. C.; BROWNSTEIN, D.; CONRAD, P. A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 275-284, 2004.
132. HERRMANN, D. C.; WIBBELT, G.; GÖTZ, M.; CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from European beavers (*Castor fiber*) and European wildcats (*Felis silvestris silvestris*). **Veterinary Parasitology**, v. 91, n. 1-2, p. 108-111, 2013.
133. ALERTE, V. M. **Prevalence de *Toxoplasma gondii* sur les animaux d'un parc zoologique (Amneville): seroprevalence et isolement du parasite**. 2008. 131 p. These - l'Université Paul-Sabatier de Toulouse; Versailles (Yvelines), France, 2008.
134. VITALIANO, S. M. **Isolamento e caracterizacao biologica e genotípica de *T. gondii* em animais selvagens do Brasil**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

135. DIAS, R. A. F.; FREIRE, R. L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 239-248, 2005.
136. SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137-142, 2006.
137. WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895-901, 2009.
138. AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.
139. CARME, B.; DEMAR-PIERRE, M. La toxoplasmose en Guyane Française: Particularités (Néo)tropicales d'une parasitose cosmopolite. **Medecine Tropicale**, v. 6, n. 5, p. 495-503, 2006.
140. JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; MAY JR., J. A.; MORATO, R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 686-710, 2010.
141. CARME, B.; DEMAR-PIERRE, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M-L. Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 656-658, 2009.
142. de AZEVEDO, F. C. C.; MURRAY, D. L. Spatial organization and food habits of jaguars (*Panthera onca*) in a floodplain forest. **Biological Conservation**, v. 137, n. 3, p. 391-402, 2007.
143. LUCCA, E. R. de. Presencia del puma (*Puma concolor*) y conflicto con el hombre en las pampas Argentinas. **Nótulas faunísticas - Segunda Serie**, v. 48, p. 1-17, 2010. Segunda série.
144. GOODRICH, J. M.; SERYODKIN, I.; MIQUELLE, D. G.; BEREZNUK, S. L. Conflicts between Amur (Siberian) tigers and humans in the Russian Far East. **Biological Conservation**, v. 144, n. 1, p. 584-592, 2011.
145. GRAHAM, K.; BECKERMAN, A. P.; THIRGOOD, S. Human-predator-prey conflicts: ecological correlates, prey losses and patterns of management. **Biological Conservation**, v. 122, n. 2, p. 159-171, 2005.
146. MAZZOLLI, M. Loss of historical range of jaguars in southern Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 18, n. 6, p. 1715-1717, 2008.
147. NETO, M. F. C.; NETO, D. G.; HADDAD JR., V. Attacks by jaguars (*Panthera onca*) on humans in Central Brazil: Report of three cases, with observation of a death. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 22, n. 2, p. 130-135, 2011.
148. PALMEIRA, F. B. L.; CRAWSHAW JR., P. G.; HADDAD, C. M.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; VERDADE, L. M. Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil. **Biological Conservation**, v. 141, n. 1, p. 118-125, 2008.
149. POLISAR, J.; MAXIT, I.; SCOGNAMILLO, D.; FARRELL, L.; SUNQUIST, M. E.; EISENBERG, J. F. Jaguars, pumas, their prey base, and cattle ranching: ecological

- interpretations of a management problem. **Biological Conservation**, v. 109, n. 2, p. 297-310, 2003.
150. WANG, S. W.; MACDONALD, D. W. Livestock predation by carnivores in Jigme Singye Wangchuck National Park, Bhutan. **Biological Conservation**, v. 129, n. 4, p. 558-565, 2006.
151. RUIZ-GARCÍA, M.; MURILLO, A.; CORRALES, C.; ROMERO-ALEÁN, N.; ÁLVAREZ-PRADA, D. Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí, reconstruida a partir de sus genes. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 30, n. 2, p. 115-130, 2007.
152. DILLON, A.; KELLY, M. J. Ocelot *Leopardus pardalis* in Belize: the impact of trap spacing and distance moved on density estimates. **Oryx**, v. 41, n. 4, p. 469-477, 2007.
153. CHEREM, J. J.; KAMMERS, M.; GHIZONI JR., I. R.; MARTINS, A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. **Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 81-96, 2007.
154. MELO, E. S.; SANTOS-FILHO, M. Efeitos da BR-070 na Província Serrana de Cáceres, Mato Grosso, sobre a comunidade de vertebrados silvestres. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 9, n. 2, p. 185-192, 2007.
155. COELHO, I. P.; KINDEL, A.; COELHO, A. V. P. Roadkills of vertebrate species on two highways through the Atlantic Forest Biosphere Reserve, southern Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, v. 54, n. 4, p. 689-699, 2008.
156. JEWELL, M. L.; FRENKEL, J. K.; JOHNSON, K. M.; REED, V.; RUIZ, A. Development of *Toxoplasma* oocysts in neotropical felidae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 21, n. 5, p. 512-517, 1972.
157. PATTON, S.; RABINOWITZ, A.; RANDOLPH, S.; JOHNSON, S. S. A coprological survey of parasites of wild neotropical felidae. **International Journal for Parasitology**, v. 72, n. 4, p. 517-520, 1986.
158. MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. **International Journal for Parasitology**, v. 58, n. 55, p. 928-937, 1972.
159. MARCHIONDO, A. A.; DUSZYNSKI, D. W.; MAUPIN, G. O. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals of New Mexico, Arizona and Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 12, n. 2, p. 226-232, 1976.
160. ROCHA-MENDES, F.; MIKICH, S. B.; QUADROS, J.; PEDRO, W. A. Feeding ecology of carnivores (Mammalia, Carnivora) in Atlantic Forest remnants, Southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 21-30, 2010.
161. SILVA-PEREIRA, J. E.; MORO-RIOS, R. F.; BILSKI, D. R.; PASSOS, F. C. Diets of three sympatric Neotropical small cats: Food niche overlap and interspecies differences in prey consumption. **Mammalian Biology**, v. 76, n. 3, p. 308-312, 2011.
162. SOUSA, K. S.; BAGER, A. Feeding habits of Geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*) in southern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 73, n. 4, p. 303-308, 2008.

163. BISCEGLIA, S. B. C.; PEREIRA, J. A.; TETA, P.; QUINTANA, R. D. Rodent selection by Geoffroy's cats in a semi-arid scrubland of central Argentina. **Journal of Arid Environments**, v. 75, n. 11, p. 1024-1028, 2011.
164. SPENCER, J. A.; HIGGINBOTHAM, M. J.; BLAGBURN, B. L. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 3, p. 246-249, 2003.
165. SEDLÁK, K.; BÁRTOVÁ, E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 223-231, 2006.
166. RIVETTI JR., A. V.; CAXITO, F. A.; RESENDE, M.; LOBATO, Z. I. P. Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1281-1283, 2008.
167. DEEM, S. L.; DAVIS, R.; PACHECO, L. F. Serologic evidence of nonfatal rabies exposure in a free-ranging oncilla (*Leopardus tigrinus*) in Cotapata National Park, Bolivia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 4, p. 811-815, 2004.

Espécie de Felino Silvestre	No de animais		Infecção	Autor
	Positivos / Examinados			
Gato-do-mato-grande (<i>Leopardus geoffroyi</i>)	SD		N	a
	1 / 1		N	b
Gato palheiro (<i>Leopardus colocolo</i>)	SD		N	a
Jaguaririca (<i>Leopardus pardalis</i>)	2 / 2		E	c
	2 / 8		N	d
Jaguarundi (<i>Puma yagouaroundi</i>)	1 / 1		E	c
	SD		N	a
Onça-parda (<i>Puma concolor</i>)	1 / 1		E	e
	1 / 2		N	f
<i>P. c. vancouverensis</i>	1 / 16		N	g
Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)	1 / 25		N	d

Referências: a. Pizzi; Rico e Pessat¹⁰; b. Lukešová; Literák¹³; c. Jewell et al.¹⁵⁶; d. Patton et al.¹⁵⁷; e. Miller; Frenkel e Dubey¹⁵⁸; f. Marchiondo; Duszynski e Maupin¹⁵⁹; g. Aramini; Stephen e Dubey¹⁴. N: Natural; E: Experimental; SD: Sem dados disponíveis.

Fonte: Modificado de Elmore et al.⁸

Quadro 1 - Eliminação de oocistos de *Toxoplasma gondii* por felídeos silvestres neotropicais

Espécie de Felino	Ordem predada % (referência)										
	Marsupiais	Xenartras	Rodentia	Primata	Carnívora	Repteis	Artiodátila	Aves	Lagomorfos	Invertebrados	
<i>Leopardus wiedii</i> (Gato maracajá)	34,5 ^e 18,2 ^l	3,6 ^e	18,2 ^e 18,2 ^l **80,7 ^f					10,9 ^e 9,1 ^l 9,7 ^f	29,1 ^e 36,4 ^l 3,2 ^f	3,6 ^e	9,1 ^l
<i>Leopardus tigrinus</i> (Gato-do-mato-pequeno)	6,1 ^l 2,3 ^m		37,7 ^l 83,3 ^m		1,0 ^k	2,0 ^l 1,2 ^m		29,6 ^l 11,8 ^m		1,5 ^l	17,3 ^l
<i>Leopardus pardalis</i> (Jaguaririca)	6,0 ^c 18,5 ^d 3,2 ^b 16,8 ^l 1,5 ^m	6,0 ^c 11,1 ^d 31,5 ^b	57,0 ^c 25,9 ^d 42,4 ^b 50,1 ^l 92,4 ^m	7,0 ^c 4,3 ^b	3,2 ^b 5,6 ^l	18,5 ^d 14,1 ^b 3,0 ^m		16,0 ^c 14,8 ^d 22,3 ^l 3,0 ^m		5,6 ^l	
<i>Leopardus geoffroyi</i> (Gato-do-mato-grande)	1,7 ^a	2,8 ^g 0,8 ⁿ	79,7 ^a 86,2 ^o 45,2 ^g 58,3 ^h 79,0 ⁿ			4,4 ^a 1,2 ^g 14,5 ⁱ 5,3 ⁿ	0,9 ⁿ	16,1 ^a *39,4 ^g 9,7 ^g 7,3 ^h 19,9 ⁿ		1,2 ^a 15,9 ^g 1,7 ^h	13,1 ^h 6,0 ⁿ
<i>Leopardus colocolo</i> (Gato palheiro)			92,0 ⁱ			5,2 ⁱ		2,7 ⁱ			
<i>Puma yagouaroundi</i> (Jaguarundi)	33,3 ^e 17,2 ^l 4,8 ^m 6,2 ^j	0,8 ^m 1,5 ^j	8,3 ^e 64,8 ^l 77,6 ^m 30,0 ^j			16,7 ^e 4,0 ^m 13,5 ^j	4,3 ^l 1,5 ^j	41,7 ^e 10,4 ^m 21,0 ^j			8,6 ^l 20,0 ^j

Referências: a. Bisceglia et al.¹⁸; b. Moreno; Kays e Samudio Jr.⁶⁹; c. Abreu et al.⁷⁰; d. Martins; Quadros e Mazzolli⁷³; e. Bianchi et al.⁷⁶; f. Cinta-Magallón et al.⁷⁷; g. Canepuccia; Martinez e Vassallo⁷⁸; h. Pereira; Walker e Novaro⁷⁹; i. García et al.⁸⁰; j. Tófoli; Rohe e Setz⁸²; k. Wang e MacDonald¹⁵⁰; l. Rocha-Mendes et al.¹⁶⁰; m. Silva-Pereira et al.¹⁶¹; n. Sousa e Bager¹⁶²; o. Bisceglia et al.¹⁶³. *Aves aquáticas; **Incluí Soricomorpha (Musaranha).

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2003).

Quadro 2 - Ocorrência (percentagem %) de espécies silvestres predadas por pequenos felídeos neotropicais

(continua)

Espécie	Nome comum	Cativo		Vida Livre		País	Autor
		Nº de positivos / testados	Teste diagnóstico (Ponto de corte)	Nº de positivos / testados	Teste diagnóstico (Ponto de corte)		
<i>Leopardus geoffroyi</i>	Gato-do-mato-grande			2/8	IH (≥ 16)	Bolívia	a
		10 / 12	MAT (≥ 20)			Brasil	b
		1 / 1	MAT (≥ 16)			Brasil	c
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato maracajá	1 / 2	MAT (≥ 32)			Guatemala	d
		34 / 63	MAT (≥ 20)			Brasil	b
		4 / 4	IFAT (≥ 25)			Brasil	e
		10 / 17	MAT (≥ 16)			Brasil	c
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaririca	5 / 6	SF (≥ 256)			Brasil	f
		1 / 1	IFAT (≥ 50)			Estados Unidos	g
		1 / 1	IFAT (≥ 40)			Eslováquia	h
				10/10	IH (≥ 16)	Bolívia	a
				3/3	MAT (≥ 25)	Brasil	i
		97 / 168	MAT (≥ 20)			Brasil	b
		4 / 5	IFAT (≥ 16)			Brasil	j
		6 / 8	MAT (≥ 16)			Brasil	k
		28 / 42	IFAT (≥ 25)			Brasil	e
		3 / 3	MAT (≥ 25)			Brasil	l
		10 / 14	MAT (≥ 16)			Brasil	c
				18/26	LAT (≥ 32)	México	m

							(conclusão)
<i>Leopardus tigrinus</i>	Gato-do-mato-pequeno	6 / 9	SF (≥256)			Brasil	f
				1/1	KELA (≥48)	Bolívia	n
		1 / 1	IFAT (≥40)			Eslováquia	h
		66 / 131	MAT (≥20)			Brasil	b
		22 / 35	IFAT (≥25)			Brasil	e
		15 / 22	MAT (≥16)			Brasil	c
<i>Leopardus colocolo</i>	Gato palheiro	1 / 8	MAT (≥20)			Brasil	b
		1 / 3	IFAT (≥25)			Brasil	e
<i>Puma yagouaroundi</i>	Jaguarundi	1 / 1	ELISA (≥64)			Estados Unidos	o
		1 / 1	IFAT (≥40)			Eslováquia	h
		1 / 1	IFAT (≥16)			Brasil	j
		49 / 99	MAT (≥20)			Brasil	b
		1 / 2	MAT (≥16)			Brasil	k
		10 / 25	IFAT (≥25)			Brasil	e
		2 / 3	MAT (≥16)			Brasil	c

Referências: a. Fiorello et al.¹⁰³; b. Silva et al.⁹²; c. Ullmann et al.⁹³; d. Lickey et al.⁹⁸; e. André et al.⁹¹; f. Sogorb; Jamra; Guimaraes⁶³; g. Spencer; Higginbotham e Blagburn¹⁶⁴; h. Sedlák e Bártová¹⁶⁵; i. Whiteman⁹⁷; j. Rivetti et al.¹⁶⁶; k. Silva⁹⁰; l. Minervino et al.⁵⁷; m. Rendón-Franco et al.⁹⁶; n. Deem; Davis e Pacheco¹⁶⁷; o. Lappin et al.⁸⁸. ELISA: Teste imunoenzimático; IFAT: Teste de Imunofluorescência Indireta; IH: Teste de Inibição da Hemaglutinação; MAT: Teste de Aglutinação Direta Modificada; SF: Teste Sabin-Feldman; KELA: Teste imunoenzimático baseado na cinética.

Fonte: Modificado de Dubey³

Quadro 3 - Estudos com pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em pequenos felídeos neotropicais.

(continua)

Espécie	Condição	Positivos / Examinados	Tipo de Amostra	Deteção	Genotipagem (número de amostras)	Nome do Isolado	País	Autor
<i>Lynx rufus</i> (Lince americano)	Vida Livre	1 / 11	Cérebro	Bioensaio	NA	NA	USA	a
<i>Lynx rufus</i> (Lince americano)	Vida Livre	5 / 6	Coração	Bioensaio SAG2	Genótipo II (5)	NA	USA	b
<i>Puma concolor vancouverensis</i> (Puma)	Vida Livre	2 / 2	Fezes	Bioensaio SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, C29-2, L358, PK1, Apico.	Genótipo atípico recombinante I-II-III (2)	TgCgCa1 TgCgCa2 Cougar2 Cougar COUG	Canadá	c
<i>Lynx rufus</i> (Lince americano)	Vida Livre	2 / 4	Cérebro Músculo pectoral	SAG1, GRA6, B1.	Atípico X (3) Genótipo I (2) Genótipo II (1)	Tipo X	USA	d
<i>Puma concolor</i> (Puma)	Vida Livre	5 / 26	Língua Coração		Recombinante II-III (1)			e
<i>Panthera onca</i> (Onça-pintada)	Vida Livre	1 / 1	Coração	GRA6, TUB2, W35, TgM-A, B18, B17	Atípico (1)	Genótipo atípico GUY-2004-JAG	Guiana Francesa	f
<i>Felis silvestris silvestris</i> (Gato selvagem europeu)	Vida Livre	4 / 12	Cérebro Pulmão	nSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico	Genótipo II (1) Variante genótipo II (2)	TgFsGER01 TgFsGER02 TgFsGER03	Alemanha	g
<i>Panthera tigris</i> (Tigre asiático)	Cativeiro	1 / 1	Coração	GRA7, SAG2	Genótipo II	NA	França	h

								(conclusão)
<i>Felis margarita</i> (Gato das areias)	Cativeiro	4 / 4	Pulmão	Bioensaio	Genótipo atípico (3)	TgSandCatUAE	Emirados Árabes Unidos Qatar	i
			Coração			1		
			Músculo ocular	SAG1, SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico	Genótipo II (1)	TgSandCatUAE		
			Músculo esquelético			TgSandCatUAE		
			Rim			3		
			Fígado			TgSandCatQA1		
<i>Puma yagouaroundi</i> (Jaguarundi)	Cativeiro	1 / 1	Coração	Bioensaio	Genótipo atípico (1)	TgJagBr1	Brasil	j
			Músculo esquelético					
			Cérebro	SAG1, SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico				
<i>Leopardus tigrinus</i> (Gato-do-mato-pequeno)	Cativeiro	1 / 1	Cérebro	Bioensaio	Genótipo atípico (1)	Novo 5	Brasil	k
			Coração					
				SAG1, SAG2, nSAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico, CS3				

Referências: a. Walton e Walls¹²⁸; b. Dubey et al.¹¹⁸; c. Dubey et al.¹³⁰; d. Miller et al.¹³¹; e. Miller et al.¹²⁷; f. Demar et al.²⁰; g. Herrmann et al.¹³²; h. Alerte¹³³; i. Dubey et al.¹⁰⁹; j. Pena et al.⁵⁹; k. Vitaliano¹³⁴.

Fonte: Modificado de Dubey³

Quadro 4 - Isolados de *Toxoplasma gondii* em felídeos silvestres de vida livre e de cativeiro no mundo

1 **4.2 Artigo 2**

2

3 *Toxoplasma gondii* em pequenos felídeos silvestres brasileiros de vida livre: Detecção
4 molecular e caracterização genética.

5

6 W.A. Cañón-Franco ^{a, b,*}, F.A.P. Araújo ^b, N. López-Orozco ^c, M.M.A. Jardim ^d, C.S.
7 Fontana ^e, A.U. Christoff ^f, C.D. Rosa ^g, S.N. Vitaliano ^h, H.F.J. Pena ^h, S.M. Gennari ^h

8

9 ^a Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de
10 Caldas, Calle 65 26-10, Manizales, Colombia.

11 ^b Departamento de Patologia e Clinica Veterinária, Faculdade de Veterinária,
12 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-
13 000, Porto Alegre, RS, Brasil.

14 ^c Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São
15 Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Edifício Biomédicas II, CEP 05508-000, São
16 Paulo, SP, Brasil.

17 ^d Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Rua Dr.
18 Salvador França 1427, CEP 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

19 ^e Museu de Ciência e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
20 Sul, Av. Ipiranga 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

21 ^f Departamento de Biologia, Museu de Ciências Naturais, Universidade Luterana do
22 Brasil, Av. Farroupilha 8001, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brasil.

23 ^g Museu de Ciências Naturais, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio
24 Vargas 1130, Campus Sede, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil.

25 ^h Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de
26 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando
27 Marques de Paiva 87 Cidade Universitária, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

* Correspondência para autor:

Tel.: + 57 6 8781500; fax: + 57 6 8781501.

E-mail: william.canon@ucaldas.edu.co (W.A. Cañón-Franco).

28 Resumo

29 Embora os felídeos silvestres sejam considerados hospedeiros definitivos do
30 *Toxoplasma gondii*, até hoje poucas descrições deste parasita tem sido realizados. Neste
31 estudo, a detecção molecular pela amplificação do ITS-1 em amostras obtidas de 90
32 pequenos felídeos silvestres neotropicais brasileiros de vida livre foi realizada. Destes,
33 34,4% (n=31) dos animais, das espécies *Puma yagouaroundi* (9/22), *Leopardus*
34 *geoffroyi* (6/22), *L. tigrinus* (8/28), *L. wiedii* (6/10), *L. pardalis* (1/1) e *L. colocolo* (1/7)
35 foram positivos. DNA foi detectado com uma frequência de 14,6% (63/433) em
36 amostras primárias de língua (16/56), cérebro (8/43), músculo esquelético (15/83),
37 coração (7/63), diafragma (3/56), humor vítreo (2/44), musculatura ocular (6/44) e olhos
38 (6/44). A genotipagem multilocus PCR-RFLP de doze amostras primárias positivas com
39 os marcadores moleculares SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358,
40 PK1, Apico e CS3, permitiu a caracterização parcial de nove genótipos e somente duas
41 amostras totalmente caracterizadas, correspondentes a novos genótipos não descritos
42 anteriormente no Brasil. A amostra Py#36m foi caracterizada como tipo I com alelo II
43 no GRA6, implicada na apresentação da toxoplasmose ocular na região Noroeste do Rio
44 Grande do Sul. Esta é a primeira detecção e caracterização genética de *T. gondii* em
45 felídeos de vida livre brasileiros, demonstrando a circulação do agente no ciclo silvestre,
46 com potencial transmissibilidade ao homem e a outros animais domésticos e silvestres.

47

48 **Palavras chave:** *Toxoplasma gondii*, felídeos silvestres, *Leopardus*, *Puma*, Brasil.

49

50

51 **Introdução**

52 *Toxoplasma gondii* é um protozoário de grande importância médica, em especial pelo
53 impacto nas mulheres gestantes, com manifestações clínicas severas como aborto e
54 malformações fetais, e como uma das principais causas de morte em
55 imunocomprometidos (Pappas et al., 2009; Innes, 2010). Águas contaminadas por
56 oocistos e a ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo cistos viáveis do parasita,
57 são as principais formas de infecção para humanos e animais de sangue quente
58 incluindo aves e mamíferos terrestres, aquáticos e voadores (Dubey, 1998).

59

60 Gatos domésticos e virtualmente todas as espécies de felídeos silvestres existentes no
61 mundo são hospedeiros definitivos de *T. gondii* (Elmore et al., 2010; Jones e Dubey,
62 2010). Na Guiana Francesa foi registrada a toxoplasmose amazônica ou tropical em
63 humanos imunocompetentes (Ajzenberg et al., 2007) e a transmissão foi vinculada a
64 felídeos neotropicais com isolamento e caracterização de *T. gondii* em uma *Panthera*
65 *onca* (Ajzenberg et al., 2004). No entanto, as implicações zoonóticas e ecológicas da
66 toxoplasmose nestas espécies de felídeos silvestres ainda são motivo de estudos.

67

68 O Brasil alberga o maior número de espécies de felídeos silvestres neotropicais do
69 continente americano (de Oliveira et al., 2006). Segundo inquéritos sorológicos feitos
70 até hoje, *T. gondii* circula amplamente entre populações de felídeos neotropicais e
71 exóticos mantidos em zoológicos e centros conservacionistas (Sogorb et al., 1977; Silva
72 et al., 2007; Rivetti et al., 2008; André et al., 2010; Minervino et al., 2010; Ullmann et
73 al., 2010). O isolamento e a caracterização genética do parasita em um *Puma*
74 *yagouaroundi* abrigado em um zoológico brasileiro, confirmam as observações prévias
75 (Pena et al., 2011).

76 O carnivorismo é a principal via de transmissão de *T. gondii* na cadeia alimentar (de
77 Thoisy et al., 2003; Wendte et al., 2011). Pesquisas sorológicas, moleculares e
78 biológicas feitas em diversas espécies de animais silvestres têm documentado a
79 movimentação de *T. gondii* entre diferentes níveis bióticos (Dubey et al., 2012). Os
80 felídeos silvestres são exímios predadores de uma ampla variedade de mamíferos, aves
81 e insetos (Manfredi et al., 2004; Moreno et al., 2006), no entanto sua participação no
82 ciclo silvestre deste parasita ainda é pouco conhecida (Cañón-Franco et al., 2013 *in*
83 *press*).

84

85 Estudos feitos em animais silvestres no Brasil comprovaram a existência de uma ampla
86 diversidade genética de *Toxoplasma*, genótipos divergentes aos arquétipos I, II e III
87 existentes em outras partes do mundo (Dubey et al., 2002, 2007; Lehmann et al., 2006).
88 A linhagem clonal BrI, BrII, BrIII e BrIV identificada em espécies de mamíferos
89 silvestres e domésticos brasileiros, caracterizam-se por uma estrutura populacional
90 epidêmica de pouca expansão clonal (Pena et al., 2008).

91

92 Em felídeos silvestres de vida livre o genótipo II foi caracterizado em *Lynx rufus*
93 (Dubey et al., 2004) e em *Felis silvestris silvestres* (isolado TgFsGER01), incluindo a
94 variante II (TgFsGER02-03) (Herrmann et al., 2012). Genótipos recombinantes foram
95 descritos em *P. concolor* (I-II) em *L. rufus* (II-III) e o genótipo atípico-X foi detectado
96 em amostras de ambas as espécies (Miller et al., 2008) e posteriormente identificado no
97 *P. concolor vancouverensis* (TgCgCa1, Cougar2, Cougar ou COUG) por Dubey et al.
98 (2008). O arquétipo atípico-X foi renomeado como tipo 12 (Dubey et al., 2011) e
99 recentemente isolado em *L. rufus* (ToxoDB#5) por Yu et al. (2012). Em *Panthera onca*
100 (GUY-2004-JAG), com uso de marcadores microsatélites, outro isolado foi

101 caracterizado como atípico, responsável pela toxoplasmose guianense (Demar et al.,
102 2008).

103 Em felídeos de cativeiro o arquétipo II foi documentado em *Panthera tigris altaica*
104 (Alerte, 2008) e em *Felis margarita* (TgSandcatQA1), nesta última espécie outros três
105 genótipos atípicos foram descritos (TgSandcatUAE1-3) por Dubey et al. (2010b). O
106 primeiro registro de genótipos de *T. gondii* em pequenos felídeos neotropicais foi num
107 *P. yagouaroundi* do zoológico de Recife, Brasil, identificado como TgJabBr1 (Pena et
108 al., 2011). Outro isolado de *T. gondii* foi obtido em *L. tigrinus* proveniente do mesmo
109 zoológico e caracterizado como NOVO 5 por Vitaliano (2012).

110

111 O presente estudo teve por objetivo detectar molecularmente, o parasito, pela
112 amplificação do ITS-1 do *T. gondii* em diferentes tecidos de seis espécies de pequenos
113 felídeos silvestres neotropicais brasileiros de vida livre (*Puma yagouaroundi* -
114 jaguarundi, *Leopardus geoffroyi* - gato-do-mato-grande, *L. tigrinus* - gato-do-mato-
115 pequeno, *L. wiedii* - gato maracajá, *L. pardalis* - jaguatirica, *L. colocolo* - gato palheiro).
116 Também objetivou a caracterização genética de amostras teciduais primárias destes
117 felídeos e assim fornecer dados da participação desses animais na manutenção do ciclo
118 silvestre do *T. gondii* na região sul do Brasil.

119

120 **Materiais e métodos**

121 Noventa pequenos felídeos silvestres neotropicais mortos em atropelamentos no período
122 1999 a 2010, foram necropsiados e mantidos congeladas a -20°C. Destes, um total de
123 433 amostras teciduais de musculatura esquelética do quadríceps femoral, diafragma,
124 coração, língua, cérebro, olhos, musculatura ocular e humor vítreo (por punção da
125 câmara posterior do olho) foram obtidas. Os felídeos pertenciam a cinco coleções

126 biológicas do estado de Rio Grande do Sul sendo estas: Museu de Ciências e Tecnologia
127 da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Universidade
128 Federal do Rio Grande do Sul – Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular -
129 UFRGS, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul - FZB, Museu de Ciências
130 Naturais da Universidade de Caxias do Sul - UCS e Museu de Ciências da Universidade
131 Luterana do Brasil - ULBRA.

132

133 Informações sobre data de depósito na coleção, localidade dentro do Estado (Centro
134 Ocidental, Centro Oriental, Metropolitana, Nordeste, Noroeste, Sudeste, Sudoeste),
135 espécie (*Puma yagouaroundi*, *Leopardus geoffroyi*, *L. tigrinus*, *L. wiedii*, *L. pardalis*, *L.*
136 *colocolo*), sexo (macho, fêmea) e idade (adulto, jovem) foram registradas quando
137 disponíveis e associação entre estas variáveis e a presença de *T. gondii* foi analisada pelo
138 teste de chi quadrado com uma significância de $p=0,05$, usando o software estatístico
139 IBM SPSS Statistics19.

140

141 Os tecidos foram macerados em TE pH8,0 (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM) na
142 proporção 1:4 e submetidos à digestão enzimática com proteinase K (1mg/mL). O DNA
143 genômico de *T. gondii* foi obtido pelo método de fenol-clorofórmio como proposto por
144 Pena et al. (2006), ressuspendido em TE pH 8,0 e estocado a -20°C até a realização dos
145 procedimentos moleculares.

146

147 Um fragmento de ~500-pb do espaçador interno transcrito (ITS-1) de *T. gondii* foi
148 utilizado para a detecção molecular, amplificado pela PCR com primers externos JS4 e
149 CT2c, seguida da *nested*-PCR com primers internos JS4b e CT2b dirigidos aos genes
150 18S e 5,8S rRNA (Soares et al., 2011). A genotipagem foi realizada pela técnica

151 multilocus PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length
152 Polymorphism) como previamente descrito por Su et al. (2006) e Dubey et al. (2007),
153 com os marcadores moleculares SAG1, 5'3'SAG2, Alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6,
154 c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3.

155

156 **Resultados**

157 Pela amplificação do ITS-1, DNA de *T. gondii* foi detectado em 31 dos 90 pequenos
158 felídeos neotropicais brasileiros (34,4%), nas espécies *Puma yagouaroundi* (9/22),
159 *Leopardus geoffroyi* (6/22), *L. tigrinus* (8/28), *L. wiedii* (6/10), *L. pardalis* (1/1) e *L.*
160 *colocolo* (1/7) conforme Tabela 1. Os animais eram provenientes das regiões Oriental
161 (6/31), Metropolitana (6/31) e Noroeste (5/31) do Rio Grande do Sul. Felídeos machos
162 (20/41) e adultos (24/52) tiveram a maior frequência de positividade para o coccídio, não
163 obstante, nenhuma das variáveis analisadas (localidade, espécies, sexo e idade) teve
164 correlação estatisticamente significativa pelo teste chi quadrado ($p>0,005$).

165

166 DNA de *T. gondii* foi obtido em 63 das 433 amostras primárias teciduais analisadas
167 (14,6%), incluindo língua 28,6% (16/56), cérebro 18,6% (8/43), músculo esquelético
168 18,1% (15/83) e coração 11,1% (7/63), assim como em diafragma (3/56), humor vítreo
169 (2/44), musculatura ocular (6/44) e olhos (6/44). A análise molecular do ITS-1
170 apresenta-se na Tabela 2.

171

172 Das 63 amostras primárias positivas para *T. gondii*, nove foram parcialmente genotipadas
173 (*L. geoffroyi* (#24m), *L. wiedii* (#30m e #31li), *P. yagouaroundi* (#36m e #47m), *L.*
174 *tigrinus* (#58co, #68li, #69li e #93co) e duas amostras tiveram o genótipo completamente
175 resolvido com os doze marcadores moleculares utilizados, *P. yagouaroundi* (#21m e

176 #56ce), como apresentado na Tabela 3.

177

178 **Discussão**

179 Estudos sorológicos prévios de *T. gondii* de felídeos silvestres brasileiros em
180 confinamento, demonstram prevalências entre 52,8 a 66,7% (Silva et al., 2007; André et
181 al., 2010; Ullmann et al., 2010), entretanto a detecção do parasita pela amplificação do
182 ITS-1 revelou uma frequência menor (34,4%) nos 90 felídeos silvestres de vida livre
183 estudados. Animais provenientes da natureza são importante fonte de infecção
184 toxoplásmica para centros conservacionistas (Ullmann et al., 2010) e nossos resultados
185 reforçam esta observação ao demonstraram a existência de *T. gondii* em todas as seis
186 espécies de pequenos felídeos silvestres neotropicais de vida livre.

187

188 Nos felídeos silvestres analisados, resultados positivos foram obtidos para *T. gondii* em
189 língua (28,6%), cérebro (18,6%), músculo esquelético (18,1%) e coração (11,1%). Em
190 felinos domésticos, cérebro, músculo esquelético e cardíaco foram considerados
191 apropriados para a obtenção de isolados viáveis do parasita, ao apresentarem maior
192 quantidade de cistos (Dubey, 2010). Pena et al., (2011) realizaram bioensaio em
193 camundongo salientando a utilidade do músculo esquelético de *Puma yagouaroundi* na
194 obtenção do isolado do parasita.

195

196 A forma ocular de *T. gondii* é amplamente descrita em humanos (Commodaro et al.,
197 2009) e cães (Swinger et al., 2009). Nos felinos domésticos a infecção causa cegueira
198 parcial ou total e anisocoria (Dubey e Carpenter, 1993), decorrentes da coriorretinite e
199 uveites (Powell e Lappin, 2001). Neste estudo registra-se pela primeira vez a detecção
200 de DNA de *T. gondii* no humor vítreo de dois felídeos silvestres neotropicais sendo um

201 *P. yagouaroundi* (20HvO) e um *L. geoffroyi* (67HvO). Nestes felídeos, amostras de
202 globo ocular e musculatura do olho foram igualmente positivas. Dubey et al. (2010b)
203 identificaram cistos de *T. gondii* na musculatura ocular de *Felis margarita*, sem
204 manifestação de lesões oculares.

205

206 Dubey et al. (2004) enfatizam a necessidade de replicação das amostras primárias no
207 modelo camundongo, visto que a quantidade de DNA de *T. gondii* presente nos tecidos
208 pode ser inferior a 250µg/100g de tecido, explicando a baixa positividade obtida nas
209 amostras teciduais analisadas.

210

211 Adicionalmente, as características do atropelamento, tempo de permanência na estrada
212 ou temperatura de conservação são fundamentais na estabilidade do material genético.
213 Não obstante, DNA de *T. gondii* foi extraído de 40,9% (9/22) dos felídeos depositados
214 entre 1999 a 2005 e de 32,6% (15/46) dos felídeos depositados entre 2006 a 2010.

215

216 A estrutura genética da população de *T. gondii* no Brasil começa a ser construído na
217 base de uma elevada diversidade de genótipos obtidos de animais domésticos e
218 silvestres, caracterizados por uma expansão clonal de genótipos recombinantes,
219 distantes dos arquétipos presentes no resto do mundo (Dubey e Su, 2009).

220

221 A cidade de Erechim – RS é mundialmente reconhecida pelo elevado número de
222 pacientes com toxoplasmose ocular, frequência superior a 17,7% (Glasner et al., 1992).
223 Estudos moleculares nesta região têm demonstrado em humanos e em suínos a circulação
224 do genótipo I e recombinantes do tipo I (Vallochi et al., 2005; Khan et al., 2006;
225 Belfort-Neto et al., 2007) vinculando esta patologia pelo consumo de carne suína crua

226 ou mal passada (Jones et al. 2006). Excepcionalmente, o felino *P. yagouaroundi* (#36m)
227 obtido na cidade de Gaurama, distante 17 quilômetros de Erechim, no Noroeste do
228 estado, exibiu o alelo I em onze dos 12 marcadores analisados, com alelo II no BTUB,
229 indicando a circulação deste genótipo no ambiente silvestre, em animais domésticos e
230 no homem.

231

232 Hospedeiros silvestres urbano-adaptados facilitam a transmissão de vários patógenos,
233 incrementando o risco para as populações humanas, animais domésticos e silvestres
234 vulneráveis (Bradley e Altizer, 2007). Considerando as frequentes incursões de
235 pequenos felídeos silvestres brasileiros em áreas urbanas e peri-urbanas, estes poderiam
236 ter um papel importante no ciclo da toxoplasmose como hospedeiros definitivos,
237 circulando o parasita entre hospedeiros susceptíveis. Na Guiana Francesa, Mercier et al.
238 (2011) demonstraram a hibridização entre genótipos selvagens e antropizados do *T.*
239 *gondii* potencialmente patógenos para o homem.

240

241 A genotipagem multilocus das onze amostras primárias de felídeos silvestres revelou
242 genótipos recombinantes e não descarta a possibilidade de existir “*spill-over*” ou “*spill-*
243 *back*” do *Toxoplasma* decorrente do contato dos pequenos felídeos silvestres estudados.

244

245 **Agradecimentos**

246 WAC-F agradece à CAPES pela bolsa de estudos (PEC-PG) e SMG ao CNPq pela
247 bolsa de pesquisa. Este estudo foi financiado com recursos da FAPESP (processo
248 número 2010/52308-0).

249 **Bibliografia**

- 250 Ajzenberg, D., Bañuls, A.L., Su, C., Dumètre, A., Demar, M., Carme, B., Dardé, M.L.
251 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol.
252 34, 1185-1196.
- 253 Ajzenberg, D., Carme, B., Demar, M., Boukhari, R., Dardé, M-L. 2007. La
254 Toxoplasmose "Guyanaise". Reveu Francophone des Laboratoires. 396, 51-60.
- 255 Alerte VM. **Prevalence de *Toxoplasma gondii* sur les animaux d'un parc zoologique**
256 **(Amneville): seroprevalence et isolement du parasite.** 2008. 131 p. These [ph.D] -
257 l'Université Paul-Sabatier de Toulouse; Versailles (Yvelines), France, 2008.
- 258 André, M.R., Adania, C.H., Teixeira, R.H.F., Silva, K.F., Jusi, M.M.G., Machado,
259 S.T.Z., de Bortolli, C.P., Falcade, M., Sousa, L. 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii*
260 and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. J.
261 Parasitol. 96, 1007-1009.
- 262 Belfort-Neto, R., Nussenblatt, V., Rizzo, L., Muccioli, C., Silveira, C., Nussenblatt, R.,
263 Khan, A., Sibley, L. D., Belfort-Jr., R. 2007. High prevalence of unusual genotypes of
264 *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. An.
265 Acad. Bras. Ciênc. 79, 111-114.
- 266 Commodaro, A.G., Belfort, R.N., Rizzo, L.V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier, M.N.
267 Jr., Belfort Jr., R. 2009. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature.
268 Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 104, 345-350.
- 269 Bradley, C.A.; Altizer, S. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases.
270 Trends Ecol. Evol., 22(2): 95-102.
- 271 Cañón-Franco, W.A.; de Araújo, F.A.P., 2; Gennari, S.M. 2013. *Toxoplasma gondii* em
272 pequenos felídeos silvestres neotropicais. *In press*.

- 273 de Oliveira, T.G., Tortato, M.A., Kasper, C.B., Marques, R.V., Marques, M.C., Cassar,
274 K. 2006. The quest for little known cats of the Americas Project wild cats of Brazil.
275 Wild Cat News. 2, 12-19.
- 276 de Thoisy. B., Demar, M., Aznar, C., Carne, B. 2003. Ecologic correlates of
277 *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. J. Wildlife Dis. 39,
278 456-459.
- 279 Demar, M., Ajzenberg, D., Serrurier, B., Dardé, M.L., Carne, B. 2008. Case report:
280 Atypical *Toxoplasma gondii* strain from a free-living jaguar (*Panthera onca*) in French
281 Guiana. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78, 195-197.
- 282 Dubey, J.P. 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans. Second edition. CRC Press;
283 Maryland, 313 pp.
- 284 Dubey, J.O., Lago, E.G., Gennari, S.M., Su, C., Jones, J.L. 2012. Toxoplasmosis in
285 humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and
286 epidemiology. Parasitology. 10,1-50.
- 287 Dubey, J.P. 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 28,
288 1019-1024.
- 289 Dubey, J.P., Carpenter, J.L. 1993. Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in
290 cats: 100 cases (1952–1990). J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 1556-1566.
- 291 Dubey, J.P., Graham, D.H., Blackston, C.R., Lehmann, T., Gennari, S.M., Ragozo,
292 A.M.A., Nishi, S.M., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Hill, D.E., Thulliez, P. 2002.
293 Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens
294 (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. Int. J. Parasitol. 32,
295 99–105.
- 296 Dubey, J.P., Graham, D.H., de Young, R.W., Dahl, E., Eberhard, M.L., Nace, E.K.,
297 Won, K., Bishop, H., Punkosdy, G., Sreekumar, C., Vianna, M.C.B., Shen, C.K., Kwok,

- 298 O.C.H., Summers, J.A., Demarais, S., Humphreys, J.G., Lehmann, T. 2004. Molecular
299 and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United
300 States. *J. Parasitol.* 90, 67-71.
- 301 Dubey, J.P., Pas, A., Rajendran, C., Kwok, O.C.H., Ferreira, L.R., Martins, J., Hebel,
302 C., Hammer, S., Su, C. 2010b. Toxoplasmosis in Sand cats (*Felis margarita*) and other
303 animals in the Breeding Centre for Endangered Arabian Wildlife in the United Arab
304 Emirates and Al Wabra Wildlife Preservation, the State of Qatar. *Vet. Parasitol.* 172,
305 195-203.
- 306 Dubey, J.P., Quirk, T., Pitt, J.A., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Kwok, O.C.H.,
307 Leclair, D., Hill, R., Su, C. 2008. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma*
308 *gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis*
309 *mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada. *J.*
310 *Parasitol.* 94, 42-45.
- 311 Dubey, J.P., Su, C. 2009. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and
312 where did they come from. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 104, 190-195.
- 313 Dubey, J.P., Sundar, N., Gennari, S.M., Minervino, A.H.H., Farias, N.A.R., Ruas, J.L.,
314 Santos, T.R.B., Cavalcante, G.T., Kwok, O.C.H., Su, C. 2007. Biologic and genetic
315 comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in freerange chickens from the northern Pará
316 state and the Southern state Rio Grande do Sul Brazil, revealed highly diverse and
317 distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.* 143, 182–188.
- 318 Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Rajendran, C., Yabsley, M.J., Thomas, N.J., Beckmen,
319 K.B., et al. 2011. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North
320 America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int. J.*
321 *Parasitol.* 41, 1139-1147.

- 322 Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S., Dubey, J.P. 2010.
323 *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. Trends
324 Parasitol. 26, 190-196.
- 325 Glasner, P.D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D., Martins, M.C., Burnier Jr., M., Silveira,
326 S., Camargo, M.E., Nussenblatt, R.B., Kaslow, R.A., Belfort Jr., R. 1992. An unusually
327 high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. Am. J. Ophthalmol. 114,
328 136–144.
- 329 Herrmann, D.C., Wibbelt, G., Götz, M., Conraths, F.J., Schares, G. 2012. Genetic
330 characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from European beavers (*Castor fiber*)
331 and European wildcats (*Felis silvestris silvestris*). Vet. Parasitol. 191, 108-111.
- 332 Howe, D.K., Honoré, S., Derouin, F., Sibley, L.D. 1997. Determination of Genotypes of
333 *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Patients with Toxoplasmosis. J. Clin.
334 Microbiol. 35, 1411–1414.
- 335 Innes, E.A. 2010. A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses
336 Public Health. 57, 1–7.
- 337 Jones, J.L., Dubey, J.P. 2010. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. Exp.
338 Parasitol. 124, 10–25.
- 339 Jones, J.L., Muccioli, C., Belfort, R. Jr., Holland, G.N., Roberts, J.M., Silveira, C. 2006.
340 Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. Emerg. Infect. Dis. 12, 582-587.
- 341 Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L.V., Belfort, R. Jr., Vitor,
342 R.W., Silveira, C., Sibley, L.D. 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains
343 associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. Emerg. Infect. Dis. 12, 942-949.
- 344 Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., Dubey, J.P. 2006. Globalization
345 and the population structure of *Toxoplasma gondii*. PNAS. 103, 11423-11428.

- 346 Manfredi, C., Lucherini, M., Canepuccia, A.D., Casanave, E.B. 2004. Geographical
347 variation in the diet of geoffroy's cat (*Oncifelis geoffroyi*) in pampas grassland of
348 Argentina. J. Mamm. 85, 1111-1115.
- 349 Mercier, A.; Ajzenberg, D.; Devillard, S.; Demar, M.P.; de Thoisy, B.; Bonnabau, H.;
350 Collinet, F.; Boukhari, R.; Blanchet, D.; Simon, S.; Carme, B.; Darde, M.-L. 2011.
351 Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: Example of the anthropized
352 environment from French Guiana. Infect. Genet. Evol., 11, 1378–1387.
- 353 Miller, M.A., Miller, W.A., Conrad, P.A., James, E.R., Melli, A.C., Leutenegger, C.M.,
354 Dabritz, H.A., Packham, A.E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D.A.,
355 Worcester, K., Grigg, M.E. 2008. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and
356 terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial
357 mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. Int. J. Parasitol. 38, 1319-1328.
- 358 Minervino, A.H.H., Soares, H.S., Barrêto-Júnior, R.A., Neves, K.A.L., Pena, H.F.J.,
359 Ortolani, E.L., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*
360 antibodies in captive wild mammals and birds in Brazil. J. Zoo. Wildlife Med. 41, 572-
361 574.
- 362 Moreno, R.S., Kays, R.W., Samudio Jr., R. 2006. Competitive release in diets of ocelot
363 (*Leopardus pardalis*) and puma (*Puma concolor*) after jaguar (*Panthera onca*) decline.
364 J. Mamm. 87, 808-816.
- 365 Pappas, G., Roussos, N., Falagas, M.E. 2009. Toxoplasmosis snapshots: Global status
366 of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital
367 toxoplasmosis. Int. J. Parasitol. 39, 1385–1394.
- 368 Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C. 2008. Population structure and mouse-
369 virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. Int. J. Parasitol. 38, 561–569.

- 370 Pena, H.F.J., Marvulo, M.F.V., Horta, M.C., Silva, M.A., Silva, J.C.R., Siqueira, D.B.,
371 Lima, P-A.C.P., Vitaliano, S.N., Gennari, S.M. 2011. Isolation and genetic
372 characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta*
373 *belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis*
374 *aurita*) from Brazil. *Vet. Parasitol.* 175, 377-381.
- 375 Pena, H.F.J., Soares, R.M., Amaku, M., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2006. *Toxoplasma*
376 *gondii* infection in cats from São Paulo State, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding,
377 isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res. Vet. Sci.* 81, 58–67.
- 378 Powell, C.C., Lappin, M.R. 2001. Clinical ocular toxoplasmosis in neonatal kittens. *Vet.*
379 *Ophthalmol.* 2, 87-92.
- 380 Rivetti Jr., A.V., Caxito, F.A., Resende, M., Lobato, Z.I.P. 2008. Avaliação sorológica
381 para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da
382 imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens. *Arq. Bras. Med. Vet.*
383 *Zootec.* 60, 1281-1283.
- 384 Silva, J.C.R., Marvulo, M.F.V., Dias, R.A., Ferreira, F., Amaku, M., Adania, C.H.,
385 Neto, J.S.F. 2007. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in
386 captive neotropical felids from Brazil. *Prev. Vet. Med.* 78, 286–295.
- 387 Soares, R.M., Lopes, E.G., Keid, L.B., Sercundes, M.K., Martins, J., Richtzenhain, L.J.
388 2011. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a *hemingnested*-PCR (*hn* PCR-
389 AP 10) based on the *Hammondia heydorni* RAPD fragment AP 10. *Vet. Parasitol.* 175,
390 168-172.
- 391 Sogorb, F., Jamra, L.F., Guimaraes, E.C. 1997. Toxoplasmose em animais de São
392 Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 13, 191-194.

- 393 Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus
394 PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites.
395 Int. J. Parasitol. 36, 841–848.
- 396 Swinger, R.L., Schmidt Jr., K.A., Dubielzig, R.R. 2009. Keratoconjunctivitis associated
397 with *Toxoplasma gondii* in a dog. Vet. Ophthalmol. 12, 56-60.
- 398 Ullmann, L.S., Silva, R.C., Moraes, W., Cubas, Z.S., dos Santos, L.C., Hoffmann, J.L.,
399 Moreira, N., Guimaraes A.M.S., Montaña, P., Langoni, H., Biondo, AW. 2010.
400 Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern
401 Brazil. Vet. Parasitol. 172, 144-146.
- 402 Vallochi, A.L., Muccioli, C., Martins, M.C., Silveira, C., Belfort Jr., R., Rizzo, L.V.
403 2005. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in
404 humans in Brazil. Am. J. Ophthalmol. 139, 350–351.
- 405 Vitaliano, S.M. Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *T. gondii* em
406 animais selvagens do Brasil. 2012. 100 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina
407 Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 408 Wendte, J.M., Gibsona, A.K., Grigg, M.E. 2011. Population genetics of *Toxoplasma*
409 *gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. Vet. Parasitol. 182, 96-
410 111.
- 411 Yu, L., Shen, J., Su, C., Sundermann, C.A. 2012. Genetic characterization of
412 *Toxoplasma gondii* in wildlife from Alabama, USA. Parasitol. Res. DOI
413 10.1007/s00436-012-3187-0.
- 414

Variável	Número de animais		
	Examinados	Positivos	Porcentagem (%)
Espécie			
<i>Puma yagouaroundi</i>	22	9	40,9
<i>Leopardus geoffroyi</i>	22	6	27,3
<i>Leopardus tigrinus</i>	28	8	28,6
<i>Leopardus wiedii</i>	10	6	60,0
<i>Leopardus pardalis</i>	1	1	100,0
<i>Leopardus colocolo</i>	7	1	14,3
Sexo			
Macho	41	20	48,8
Fêmea	15	5	33,3
Idade			
Adulto	52	24	46,2
Jovem	4	1	25,0
Localidade			
Centro Ocidental	2	0	0,0
Centro Oriental	15	6	40,0
Metropolitana	12	6	50,0
Nordeste	4	2	50,0
Noroeste	6	5	83,3
Sudeste	11	3	27,3
Sudoeste	14	2	14,3
Período de depósito			
1999 a 2005	22	9	40,9
2006 a 2010	46	15	32,6

415

416 Tabela 1. Detecção de *Toxoplasma gondii* pela amplificação do ITS-1 em amostras
417 teciduais de pequenos felídeos silvestres neotropicais do Rio Grande do
418 Sul (n=90).

Espécie	Músculo esquelético			Língua			Diafragma			Coração			Cérebro			Humor vítreo			Músculo ocular			Olhos		
	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%
<i>Leopardus colocolo</i>	6	1	16,7	3	1	33,3	2	0	0,0	4	1	25,0	2	1	50,0	2	1	50,0	2	1	50,0	2	1	50,0
<i>Leopardus geoffroyi</i>	21	2	9,5	13	3	23,1	14	0	0,0	14	1	7,1	10	1	10,0	11	1	9,1	11	0	0,0	11	1	9,1
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	0,0	1	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	1	1	100,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0
<i>Leopardus tigrinus</i>	26	4	15,4	16	6	37,5	17	1	5,9	21	2	9,5	12	1	8,3	12	0	0,0	13	1	7,7	12	1	8,3
<i>Leopardus wiedii</i>	8	1	12,5	8	4	50,0	9	1	11,1	10	2	20,0	7	0	0,0	7	0	0,0	7	1	14,3	7	0	0,0
<i>Puma yagouaroundi</i>	21	7	33,3	15	2	13,3	14	1	7,1	14	1	7,1	11	4	36,4	12	0	0,0	11	3	27,3	12	3	25,0
Subtotal	83	15	18,1	56	16	28,6	56	3	5,4	63	7	11,1	43	8	18,6	44	2	4,6	44	6	13,6	44	6	13,6

Tabela 2. Número de amostras examinadas (E) n=433, amostras positivas (P) n=63 e porcentagem de positividade (%) para *Toxoplasma gondii* por tecido e por espécie de pequeno felídeo silvestre neotropical do Rio Grande do Sul.

Isolado ID	Localidade	Marcadores genéticos											Genótipo	ToxoDB Genótipo RFLP	
		SAG1*	SAG2†	Alt. SAG2‡	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	APICO			CS3
RH88 (tipo I)	Referência	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
PTG (tipo II)	Referência	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II		
CTG (tipo III)	Referência	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III		
TgCgCa1 (Cougar)	Referência	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II		
MAS	Referência	u-1	I	II	III	III	III	III	u-1	I	III	I	II		
TgCatBr5	Referência	I	III	III	III	III	III	III	I	I	u-1	I	II		
<i>Lc#72M</i>	Pelotas	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
<i>Lg#24M</i>	Cristal do Sul	u-1	I / III	NA	III	I?	NA	u-1	NA	X?	NA	I	II		
<i>Lt#58Co</i>	Caxias do Sul	I	III	NA	III	I/II	III	NA	NA	I	u-1	NA	NA		
<i>Lt#68Li</i>	Marques de Souza	u-1	I	NA	III	I?	NA	u-1	NA	III	NA	I	NA		
<i>Lt#69Li</i>	Dois Lageados	u-1	I	NA	III	I?	III	u-1	NA	I	III	III?	NA		
<i>Lt#93Co</i>	Morungava	I	I / II	NA	III	I	II	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
<i>Lw#30M</i>	Pântano Grande	NA	I / III	NA	III	NA	NA	u-1	NA	NA	NA	NA	NA		
<i>Lw#31Li</i>	Arroio dos Ratos	u-1	I	II	III	III	II	II	I	I	NA	I	I		
<i>Py#21M</i>	Ijuí	u-1	I / III	II	III	II?	III	u-1	I	I	III	I	I	NOVO atípico	
<i>Py#36M</i>	Gaurama	I	I	I	I	II?	I	I	I	I	NA	I	I	alelo II no BTUB	I
<i>Py#47M</i>	Desconhecida	u-1	I	I	III	II	III	I	NA	I	NA	I	I		
<i>Py#56Ce</i>	Desconhecida	I	III	III	III	I	III	I	III	II / III	u-1	III	I / II?		

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

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

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

NA: Produto não amplificado.

a TgCkBr – (RS): Isolados de galinhas de campo do estado de Rio Grande do Sul genotipados por Dubey et al. (2007).

Tabela 3. Genótipos multilocus e identidade de amostras primárias de pequenos felídeos silvestres brasileiros, obtidos pela PCR-RFLP.

4.3 Artigo 3

Detecção molecular de *Sarcocystis felis*-like em pequenos felídeos silvestres de vida livre do sul do Brasil.

W. A. CAÑÓN-FRANCO¹⁻², F. A. P. ARAÚJO², N. LÓPEZ-OROZCO³, L. B. KEID⁴, M. M. A. JARDIM⁵, C. S. FONTANA⁶, A. U. CHRISTOFF⁷, E. L. COELHO⁷, F. B. PETERS⁷, C. D. ROSA⁸, C. S. CASTILHO⁹, R. M. SOARES¹⁰ e S. M. GENNARI^{10*}

¹ Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Calle 65 26-10, Manizales, Colombia.

² Departamento de Patologia e Clinica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Edifício Biomédicas II, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias Norte 225, Campus da USP, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.

⁵ Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Rua Dr. Salvador França 1427, CEP 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶ Museu de Ciência e Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁷ Departamento de Biologia, Museu de Ciência Naturais, Universidade Luterana do Brasil, Av. Farroupilha 8001, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brasil.

⁸ Museu de Ciências Naturais, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Campus Sede, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil.

⁹ Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 321 Trav. 14, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brasil.

¹⁰ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87 Cidade Universitária, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência para autor.

William Alberto Cañón-Franco

Calle 65 26-10, Manizales, Colombia

Tel.: + 57 6 8781500; fax: + 57 6 8781501.

E-mail: william.canon@ucaldas.edu.co

RESUMO

Na relação presa/predador, os carnívoros silvestres participam na transmissão de *Sarcocystis* spp.; embora abundantes em regiões neotropicais, ainda é pouco conhecido o papel destes hospedeiros no ciclo silvestre deste parasita. Neste estudo, 13 de 90 (14,4%) pequenos felídeos silvestres de vida livre do Rio Grande do Sul, Brasil foram positivos para *Sarcocystis* spp. pela amplificação do locus ITS-1 rDNA, DNA do parasita foi detectado em 51 dos 433 tecidos examinados, sendo estes: musculatura esquelética (22/83), língua (13/56), diafragma (6/56), cérebro (1/43), coração (1/63), musculatura ocular (6/44) e globo ocular (2/44), nenhuma das 44 amostras de humor vítreo foi positiva. Assim mesmo, descreve-se a primeira detecção molecular de *S. felis*-like em 18 amostras teciduais de *Puma yagouaroundi* (5/22), *Leopardus colocolo* (2/7), *L. geoffroyi* (5/22), *L. tigrinus* (4/28), *L. wiedii* (2/10) e *L. pardalis* (0/1), com uma identidade de 97,6% respeito a isolados previamente descritos de *S. felis*.

Palavras chave

Brasil, felino silvestre, neotropical spotted cat, *Sarcocystis felis*, detecção molecular, museus.

INTRODUÇÃO

Vários hospedeiros intermediários (HI) estão relacionados no ciclo de vida de *Sarcocystis* spp. entre estes mamíferos, aves, répteis e peixes (Prakas e Butkauskas, 2012) e para muitas espécies de *Sarcocystis* o HD (hospedeiro definitivo) é ainda desconhecido (Tenter, 1995; Dolezel *et al.*, 1999). Até hoje, nos felídeos silvestres duas espécies são consideradas, *Sarcocystis hirsuta* que tem os bovídeos e a lebre comum europeia como HI (Dubey *et al.*, 1989) e *Sarcocystis felis*, que tem os felinos domésticos e silvestres (*Acinonyx jubatus*, *Puma concolor*, *Lynx rufus*, *Panthera leo*) como HI e possui HD ainda desconhecido (Anderson *et al.*, 1992). Além desses a participação dos felídeos silvestres na transmissibilidade de outras espécies de *Sarcocystis* não é descartada (Atkinson *et al.*, 1993).

São poucos os registros de estádios de vida livre do parasita. Esporocistos *Sarcocystis*-like foram identificados nas fezes de *L. rufus* e *P. concolor* (Dubey, 1982) e em macrófagos da lâmina própria do intestino delgado de leões juvenis (Kinsel *et al.*, 1998). Entretanto a presença de cistos tissulares ou “sarcocistos” é mais frequente, e já foi reportada na América do Norte em puma e bobcat (Kluge, 1967; Greiner *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1992) e na África em chitas e leões (Briggs *et al.*, 1993; Kinsel *et al.*, 1998).

Um caso atípico foi documentado no *Lynx canadensis*, esquizontes de *S. neurona*-like foram identificados no cérebro, negativos na imunohistoquímica a *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, manifestando letargia e anorexia. No entanto a etiologia poderia estar relacionada com uma espécie antigênicamente semelhante a *S. neurona* (Forest *et al.*, 2000). Sinais similares aos apresentados neste felino silvestre também foram

relatados num gato doméstico acometido pelo *Sarcocystis* spp. com ataxia, dor espinhal e anisocoria (Bisby *et al.*, 2010). Em gatos domésticos, *S. felis* foi associado a hipertrofia cardiomiopática e linfossarcoma, mas nenhum caso ainda foi descrito acometendo os felídeos silvestres (Elsheikha *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstram que pequenos felídeos silvestres são biologicamente importantes como predadores na cadeia alimentar. Oito espécies destes felídeos circulam na região neotropical: jaguatirica *Leopardus pardalis*, gato maracajá *L. wiedii*, gato-do-mato pequeno *L. tigrinus*, gato-do-mato grande *L. geoffroyi*, gato-palheiro *L. colocolo*, jaguarundi *Puma yagouaroundi*, e duas espécies endêmicas: *Leopardus guigna* (kodkod) do Chile e *L. jacobita* (gato andino) da cordilheira dos Andes (Oliveira *et al.*, 2006; Silva-Rodríguez *et al.*, 2007).

As pesquisas feitas na América do Norte e no Continente Africano são ainda insuficientes para estabelecer a epidemiologia da sarcocistose nos felídeos silvestres e, na América do Sul, esta é totalmente desconhecida. O presente estudo avalia, por métodos moleculares, a presença do *Sarcocystis* spp. em seis diferentes espécies de pequenos felídeos neotropicais brasileiros, no intuito de incrementar o conhecimento da amplitude de hospedeiros deste parasita.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras analisadas

A pesquisa molecular de coccídios da subfamília Sarcocystidae foi realizada em amostras teciduais de 90 pequenos felídeos silvestres neotropicais mortos em atropelamentos, depositados em cinco coleções biológicas do estado de Rio Grande do

Sul, Brasil no período 1999 a 2010. Quando disponíveis, foram registradas as variáveis: procedência do animal, data de depósito na coleção, espécie, sexo e idade (ver Tabela 1). A idade dos animais foi considerada pelo desgaste da dentição e tamanho corporal (Palacios, 2007; Bertrand e Morisot, 2012).

Fragments de órgãos foram coletados dos animais necropsiados e um total de 433 tecidos entre musculatura esquelética do quadríceps femoral (83), língua (56), diafragma (56), coração (63), cérebro (43), musculatura ocular (44), olhos (44) e humor vítreo (44) extraído por punção da câmara posterior do olho, foram obtidos.

Extração de DNA

Dependendo da disponibilidade do órgão, 1 grama de tecido foi macerado em TE pH 8,0 (Tris HCl 10mM, EDTA 1 mM) na proporção 1:4, duas alíquotas de 200µL do macerado final foram obtidas no intuito de aumentar a chance de detecção (Muradian *et al.*, 2012). Seguido de extração enzimática com proteinase K e purificação com fenol-clorofórmio 1:1 (Pena *et al.*, 2006). O DNA foi precipitado com etanol 70%, ressuspenso em TE buffer pH 8,0 (30µL) e estocado até a execução da reação em cadeia da polimerase (PCR) a -20°C.

Detecção molecular

A PCR para amplificação do espaçador interno transcrito ITS-1, comum para coccídios Sarcocystidae (Soares *et al.*, 2011) foi realizada com os primers externos JS4 (senso; 5'-CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C-3') e CT2c (antisenso; 5'-CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC-3') dirigidos aos genes 18S e 5,8S rRNA, seguida da *nested*-PCR (*n*-PCR-ITS-1) com os primers internos JS4b (senso; 5'-AGT CGT AAC AAG

GTT TCC GTA GG-3') e CT2b (anti-senso; 5'-TTG CGC GAG CCA AGA CAT C-3') que flanqueiam a sequência completa do ITS-1.

As condições do ciclo da PCR foram de 94°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 40s a 94°C, 30 s. a 56°C e 30 s. a 72°C (Slapeta *et al.*, 2002). Cada 25µL da reação contendo 0,15µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) platinum high fidelity (Invitrogen); 2,5µL de tampão de reação 10x (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 0,5µL da mistura de dNTPs (10mM); 1,5µL de cada primer *sensu* e *anti-sensu* (10pM) e 2,5µL da amostra de DNA. Na *n*-PCR-ITS-1 usaram-se quantidades iguais da mistura com a substituição dos primers. Controles positivos de *T. gondii* (RH) e *N. caninum* (NC1) foram incluídos. Os amplicons obtidos na *n*-PCR-ITS-1 foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio, com um tamanho de banda esperado de ~500pb para a subfamília Toxoplasmatinae e ~1000pb para a subfamília Sarcocystinae (Muradian *et al.*, 2012).

Posteriormente, os produtos da *n*-PCR-ITS-1 foram purificados com ExoSAP-IT Affymetrix USB[®] seguindo as instruções do fabricante e sequenciados com os primers internos, utilizando BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456) e o software Sequencing Analysis 5.3.1 no Base Caller KB. A sequência contig obtida a partir do sequenciamento dos primers senso e anti-senso foi determinada com auxílio do software Codoncode Aligner. Finalmente, as sequências derivadas da *n*-PCR-ITS-1 foram submetidas na busca BLASTn, a fim de identificar a espécie do parasita, importadas e editadas no software BioEdit.

Análise estatística

Para esta amostragem por conveniência, o teste de chi-quadrado com um nível de significância $p < 0,05$ foi realizado para estabelecer possíveis diferenças entre as variáveis espécie, sexo, idade, procedência e ano de depósito na coleção. Os dados coletados foram analisados no software IBM SPSS Statistics19.

Aspetos éticos

A presente pesquisa está amparada pelo comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, segundo o estabelecido na Instrução Normativa Federal nº154 do 01 de março de 2007 e na normativa do IBAMA no. 119 de 11 de outubro 2006 para o aproveitamento científico de animais atropelados.

RESULTADOS

Detecção de Sarcocystis spp.

Neste estudo, 13 dos 90 felídeos silvestres (14,4%) foram positivos para *Sarcocystis* spp. pela amplificação do ITS-1 rDNA, com maior proporção de indivíduos positivos no período de 2006 - 2010 (7/13). Entretanto, esta quantidade não diferiu da obtida no período anterior ($p > 0,05$). Outros 18 felídeos foram caracterizados como *S. felis*-like ($n=18$), e concentraram-se principalmente nas áreas Sudoeste e Centro Oriental (44,1%) do estado de Rio Grande do Sul, entretanto a procedência não apresentou associação ($p=0,293$) com o encontro de felídeos positivos (Tabela 1).

Das seis espécies de pequenos felídeos neotropicais brasileiros estudadas, o *Leopardus wiedii* apresentou a maior percentagem de positividade, e do único indivíduo de *L. pardalis* nenhuma das amostras teciduais foi positiva para *Sarcocystis* (Tabela 1). O teste chi-quadrado não demonstrou associação estatística entre a positividade ao *Sarcocystis* e a

espécie felina ($p=0,247$).

Uma maior proporção de machos adultos (10/31) do que fêmeas adultas positivas (3/31) foi registrada no presente estudo, entretanto não houve associação entre positividade para *Sarcocystis* e sexo ($p=0,836$), com uma frequência de 34,2% (14/41) e 26,7% (4/15) para machos e fêmeas respectivamente, como também para a idade ($p=0,682$), adultos e jovens apresentaram distribuições similares (Tabela 1).

DNA de *Sarcocystis* spp. foi detectado em 11,8% (51/433) dos tecidos processados, principalmente na musculatura esquelética do quadríceps femoral (22/83 $p<0,000$) e língua (13/56 $p<0,000$) e em menor proporção no diafragma (6/56), coração (1/63), cérebro (1/43), musculatura ocular (6/44) e olho (2/44), nenhuma amplificação foi observada nas 44 amostras de humor vítreo (Tabela 2).

Caracterização molecular do Sarcocystis spp.

A região ITS-1 rDNA foi parcialmente sequenciada em todas as 18 amostras teciduais, sendo 13 de músculo esquelético, 3 de língua, uma de musculatura ocular e uma de diafragma.

O alinhamento das sequências produzidas e a análise BLASTn no GenBankTM, levou ao encontro dos clones 1453b e 1454 de *Sarcocystis felis*, número de acesso **AY190081** e **AY190082** como sequências de maior grau de identidade. O sequenciamento parcial do ITS-1 rDNA das amostras brasileiras de *S. felis*-like foram depositadas no GenBankTM com os números de acessos **KC160197** a **KC160214**.

Em todas as sequencias, exceto a da amostra *Lg88m*, o *screenshot* dos cromatogramas apresentou sítios heterogêneos a partir do nucleotídeo 360 (tomando como referência a sequencia AY190081), impedindo a solução total destas sequencias.

As amostras *Lg88m* e *Lc76m* tiveram sequencias de 792 e 565 nucleotídeos respectivamente, com uma identidade de 97,6 e 97,3% para cada um dos clones referência. Nas restantes 16 amostras um segmento de 211 nucleotídeos foi idêntico entre todas as amostras, diferindo em um nucleotídeo da sequencia AY190081 e em dois nucleotídeos da sequencia AY19002, com 99,0 e 99,5% de identidade, respectivamente, conforme a Tabela 3.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível a identificação molecular do *Sarcocystis felis*-like pela amplificação do locus ITS-1 rDNA em amostras teciduais de pequenos felídeos silvestres neotropicais. Em 34,4% (31/90) dos felídeos o DNA do parasita foi encontrado em pelo menos um dos tecidos avaliados. Resultados similares foram descritos pela análise histopatológica em *L. rufus* (bobcat) com 42,6% de ocorrência (Anderson *et al.*, 1992) e inferior a frequência observada em *P. concolor coryi* (78,6%) e *P. concolor stanleyana* (100%) todos encontrados em animais dos Estados Unidos (Greiner *et al.*, 1989).

As sequências obtidas das amostras de pequenos felídeos silvestres não são idênticas às de *S. felis* já conhecidas em felinos domésticos (Gillis *et al.*, 2003). Entretanto, a elevada similaridade entre elas permite classificar as sequencias oriundas de felídeos silvestres como de organismos estreitamente relacionados a *S. felis*.

A maioria das sequências ITS-1 apresentaram sítios heterogêneos o que pode ser explicado pela amplificação simultânea de pelo menos dois loci ligeiramente diferentes entre si. Neste caso, dois ou mais segmentos similares, ambos com sítio de ancoragem para os primers são amplificados, a reação de sequenciamento acaba produzindo cromatogramas com sítios heterogêneos.

No caso das sequências de *Sarcocystis* obtidas dos felídeos silvestres analisados, os sítios heterogêneos foram detectados a partir da posição 360, indicando que duas ou mais cópias estavam sendo amplificadas até aquela posição. Este fenômeno, ocorrência de cópias de locus ribossomais ligeiramente diferentes no genoma é amplamente descrito em parasitas apicomplexos (Le Blancq *et al.*, 1997; Bisby *et al.*, 2010; Oryan *et al.*, 2011). No caso do *Sarcocystis felis*, duas cópias de ITS-1 (depositadas no Genbank como clones 1443b e 1454) co-existem no mesmo genoma (Gillis *et al.*, 2003)

O produto amplificado pela n-PCR-ITS-1 permitiu registrar pela primeira vez a presença de *S. felis*-like em amostras teciduais de pequenos felídeos silvestres neotropicais de vida livre do Brasil. Embora pouco conhecido, *S. felis* está presente nos felídeos silvestres (Greiner *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1992; Dubey *et al.*, 1992; Briggs *et al.*, 1993; Kinsel *et al.*, 1998), mas os estudos morfológicos e moleculares ainda não esclarecem o verdadeiro papel destes carnívoros no ciclo parasitário. Odening (1998) sugere que estudos da epidemiologia da infecção por *Sarcocystis* devem focalizar espécies de animais silvestres que agem como HI e predadores, no intuito de ampliar o conhecimento dos mecanismos de infecção, ciclo de vida e relações parasito-hospedeiro.

Pequenos felídeos silvestres alimentam-se de roedores, marsupiais, aves, lagartos e excepcionalmente de espécies de maior tamanho (Reis *et al.*, 2006). Entretanto estes hábitos podem mudar e, na ausência de outros felídeos, o *L. tigrinus*, o *L. wiedii* e o *L. pardalis* ocupam o topo da pirâmide alimentar (Oliveira-Santos *et al.*, 2012), o que incrementa a chance de predação/competição com outros carnívoros (Goulart *et al.*, 2009) e assim o risco de infecção parasitária. Excetuando-se o *L. pardalis*, todas as cinco espécies de pequenos felídeos tiveram positividade para *S. felis*-like. Contudo, nenhuma associação estatística foi constatada no presente estudo entre a espécie de felino neotropical e a frequência de *Sarcocystis* ($p=0,247$), indicando susceptibilidade semelhante entre as espécies estudadas.

Animais adultos são mais susceptíveis à infecção devido ao carnivorismo (Afonso *et al.*, 2007). Proporções equivalentes entre machos e fêmeas de puma (81,9 e 85,7%) (Greiner *et al.*, 1989) e bobcat (53,0 e 47,0%) (Anderson *et al.*, 1992) foram também observadas nos Estados Unidos.

Sarcocystis distribui-se por diversos órgãos e tecidos e em felinos domésticos os sarcocistos são mais comuns na musculatura esquelética e cardíaca (Hill *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1988; Gillis *et al.*, 2003; Elsheikha *et al.*, 2006). No presente estudo a detecção molecular de *Sarcocystis* foi significativamente maior no quadríceps femoral (26,5%) fato também observado em chitas (*Acinonyx jubatus*) (Briggs *et al.*, 1993), leões (Kinsel *et al.*, 1998) e pumas (Greiner *et al.*, 1989).

Anderson *et al.* (1992) analisaram 28 línguas de *L. rufus* e todas foram positivas para *Sarcocystis* ($p < 0,005$), superando a detecção obtida em músculo cardíaco (8/26), diafragma (10/27), intestino (1/10) e músculo esquelético (1/4), sendo considerada por estes autores como tecido indicador da presença de sarcocistos. No presente estudo a língua foi o segundo tecido em positividade (23,2%). Adicionalmente, também foi possível a detecção do *Sarcocystis* em amostras de 1,6% dos tecidos cardíacos (1/63) e 10,7% dos diafragmas (6/56). Em *P. concolor* Greiner *et al.* (1989) também encontraram 19,0% de positividade no músculo cardíaco e 16,0% no diafragma.

Recentemente, esquizontes e merozoítos de *S. neurona* foram identificados na retina de uma nutria marinha, *Enhydra lutris kenyonii*, associados a um quadro de retinocoroidite (Dubey e Thomas, 2011). No presente estudo, outra espécie de *Sarcocystis*, *S. felis-like* foi encontrado em dois dos 44 olhos examinados e na musculatura ocular (6/44). Estes indivíduos apresentaram positividade para o mesmo agente na língua e musculatura esquelética. Todas as 44 amostras de humor vítreo foram negativas.

Provavelmente existe uma fonte de infecção comum para *Sarcocystis*, que superpõe geograficamente a população dos felídeos silvestres. A presença do parasita não foi associada com a distribuição geográfica ($p = 0,46$) do bobcat da Flórida (Anderson *et al.*, 1992). No Rio Grande do Sul manteve-se o mesmo padrão, a frequência de animais positivos dentro das mesorregiões foi variável (16,7 a 100%), porém em nenhuma região a diferença foi significativa ($p = 0,293$). Entretanto, quantidades maiores de indivíduos positivos concentraram-se nas regiões Metropolitana, Sudeste e Sudoeste abrangendo ambos os biomas do Estado, com características bio-ecológicas distintas. O Pampa caracteriza-se por uma topografia plana e vegetação gramínea-lenhosa e a Mata

Atlântica que engloba cadeias de montanhas, vales e planícies compostas por vegetação de floresta.

CONCLUSÃO

Sarcocystis felis-like circula amplamente entre as populações de pequenos felídeos silvestres neotropicais de vida livre da região sul do país. A amplificação do ITS-1 pelos primers JS4b e CT2b permitiu detectar o DNA do parasita em vários tecidos e órgãos, sendo significativamente maior o encontro do parasita em músculo esquelético.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às instituições que permitiram a utilização de amostras dos animais sob sua responsabilidade como: Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular (UFRGS), Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB), Museu de Ciências Naturais da Universidade de Caxias do Sul (UCS) e Museu de Ciências da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). WAC-F agradece à CAPES pela bolsa de estudos (PEC-PG) e SMG e RMS ao CNPq pela bolsa de pesquisa. Este estudo foi financiado com recursos da FAPESP (processo número 2010/52308-0).

REFERÊNCIAS

- Afonso, E., Thulliez, P., Pontier, D., Gilot-Fromont, E.** (2007). Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. *Parasitology* 134, 1963-1971.
- Anderson, A.J., Greiner, E.C., Atkinson, C.T., Roelke, M.E.** (1992). *Sarcocysts* in the Florida Bobcat (*Felis rufus floridanus*). *Journal of Wildlife Disease* 28, 116-120.
- Atkinson, C.T., Wright, S.D., Telford, Jr. S.R., McLaughlin, G.S., Forrester, D.J., Roelke, M.E., McCown, J.W.** (1993). Morphology, prevalence, and distribution of *Sarcocystis* spp. in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Florida. *Journal of Wildlife Disease* 29, 73-84.
- Bertrand, A-S. and Morisot, A.** (2012). Neotropical spotted cat species discrimination using morphometrics. *Natureza e Conservação* 10, 40-44.
- Bisby, T.M., Holman, P.J., Pitoc, G.A., Packer, R.A., Thompson, C.A., Raskin, R.E.** (2010). *Sarcocystis* spp. encephalomyelitis in a cat. *Veterinary Clinical Pathology* 39, 105-112.
- Briggs, M.B., Leathers, C.W. and Foreyt, W.J.** (1993). *Sarcocystis felis* in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Journal of the Helminthological Society of Washington* 60, 227-229.
- Dolezel, D., Koudela, B., Jirků, M., Hypsa, V., Oborník, M., Votýpka, J., Modrý, D., Slapeta, J.R., Lukes, J.** (1999). Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. *International Journal for Parasitology* 29, 795-798.
- Dubey, J.P., Hamir, A.N., Kirkpaterik, C.E., Todd, K.S., Rupprecht, C.E.** (1992). *Sarcocystis felis* spp. n. (Protozoa: Sarcocystidae) from the bobcat (*Felis rufus*). *Journal of the Helminthological Society of Washington* 59, 227-229.

- Dubey, J.P., Speer, C.A. and Charleston, W.A.G.** (1989). Ultrastructural differentiation between sarcocysts of *Sarcocystis hirsute* and *Sarcocystis hominis*. *Veterinary Parasitology* 34, 153-157.
- Dubey, J.P. and Thomas, N.J.** (2011). *Sarcocystis neurona* retinochoroiditis in a sea otter (*Enhydra lutris kenyoni*). *Veterinary Parasitology* 183, 156-159.
- Dubey, J.P.** (1982). *Sarcocystis* and other coccidia in foxes and other wild carnivores from Montana. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181, 1270-1271.
- Edwards, J.F., Ficken, M.D., Luttgen, P.J., Frey, M.S.** (1988). Disseminated sarcocystosis in a cat with lymphosarcoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193, 831-832.
- Elsheikha, H.M., Kennedy, F.A., Murphy, A.J, Soliman, M., Mansfield, L.S.** (2006). Sarcocystosis of *Sarcocystis felis* in cats. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 36, 1073-1088.
- Forest, T.W., Abou-Madi, N., Summers, B.A., Tornquist, S.J., Cooper, B.J.** (2000). *Sarcocystis neurona*-like encephalitis in a Canada lynx (*Felis lynx canadensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31, 383-387.
- Gillis, K.D., MacKay, R.J., Yowell, C.A., Levy, J.K., Greiner, E.C., Dame, J.B., Cheadle, M.A., Hernandez, J., Massey, E.T.** (2003). Naturally occurring *Sarcocystis* infection in domestic cats (*Felis catus*). *International Journal for Parasitology* 33, 877-883.
- Goulart, F.V.B., Graipel, M.E., Tortato, M.A., Ghizoni-Jr, I.R., Oliveira-Santos, L.G.R., Cáceres, N.C.** (2009). Ecology of the ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Southern Brazil. *Neotropical Biology and Conservation* 4, 137-143.

- Greiner, E.C., Roeike, M.E., Atkinson, C.T., Dubey, J.P., Wright, S.D.** (1989). *Sarcocystis* spp. in muscles of free-ranging Florida panthers and cougars (*Felis concolor*). *Journal of Wildlife Disease* 25, 623-628.
- Hill, J.E., Chapman, W.L. and Prestwood, A.K.** (1988). Intramuscular *Sarcocystis* species in two cats and a dog. *The Journal of Parasitology* 74, 724-727.
- Kinsel, M.J., Briggs, M.B., Venzke, K., Forge, O., Murnane, R.D.** (1998). Gastric spiral bacteria and intramuscular *Sarcocysts* in African lions from Namibia. *Journal of Wildlife Disease* 34, 317-324.
- Kluge, J.P.** (1967). Trichinosis and sarcosporidiosis in a puma. *Bulletin of the Wildlife Disease Association* 3, 110-111.
- Le Blancq, S.M., Khramtsov, N.V., Zamani, F., Upton, S.J., Wu, T.W.** (1997). Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 90, 463-478.
- Muradian, V., Ferreira, L.R., Lopes, E.G., Esmerini, P.O., Pena, H.F.J., Soares, R.M., Gennari, S.M.** (2012). A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *International Journal for Parasitology* 98, 128-134.
- Odening, K.** 1998. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). *Systematic Parasitology* 41, 209-233.
- Oliveira, T.G., Tortato, M.A., Kasper, C.B., Marques, R.V., Marques, M.C., Cassar, K.** (2006). The quest for little known cats of the Americas Project wild cats of Brazil. *Wild Cat News* 2, 12-19.
- Oliveira-Santos, L.G.R., Graipel, M.E., Tortato, M.A., Zucco, C.A., Cáceres, N.C., Goulart, F.V.B.** (2012). Abundance changes and activity flexibility of the oncilla,

Leopardus tigrinus (Carnivora: Felidae), appear to reflect avoidance of conflict. *Zoologia* 29, 115-120.

Oryan, A., Sharifiyazdi, H., Khordadmehr, M., Lark, S. (2011). Characterization of *Sarcocystis fusiformis* based on sequencing and PCR-RFLP in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Iran. *Parasitology Research* 109, 1563-1570.

Palacios, R. (2007). *Biología, guía: Guía de campo para la identificación de carnívoros cordilleranos*, 1ª ed. C&O gráfica, Córdoba, Argentina.

Pena, H.F.J., Soares, R.M., Amaku, M., Dubey, J.P., Gennari, S.M. (2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Research in Veterinary Science* 81, 58-67.

Prakas, P. and Butkauskas, D. (2012). Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. *Ekologija* 58, 45-58.

Reis, N.R., dos., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., de. (2006). *Mamíferos do Brasil*. Edifurb, Londrina, Brasil.

Silva-Rodríguez, E.A., Ortega-Solís, G.R., Jiménez, J.E. (2007). Human attitudes toward wild felids in a human-dominated landscape of Southern Chile. *CAT News* 46, 19-21.

Slapeta, J.P., Koudela, B., Votypka, J., Modrý, D., Horejs, R., Lukes, J. (2002). Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *The Veterinary Journal* 163, 147-154.

Soares, R.M., Lopes, E.G., Keid, L.B., Sercundes, M.K., Martins, J., Richtzenhain, L.J. (2011). Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a hemingnested-PCR (hn

PCR-AP 10) based on the *Hammondia heydorni* RAPD fragment AP 10. *Veterinary Parasitology* 175, 168-172.

Tenter, A.M. (1995). Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology* 25, 1331-1330.

Tabela 1 - Amostras positivas para *Sarcocystis* spp. pela amplificação do gene ITS-1 em tecidos de pequenos felídeos silvestres neotropicais do Rio Grande do Sul.

Variável	Número de Examinados (n = 90)	Número de Positivos (%)	Nível de Significância (p<0,05)
ESPÉCIE			0,247
<i>Puma yagouaroundi</i>	22	6 (27,3)	
<i>Leopardus geoffroyi</i>	22	8 (36,4)	
<i>Leopardus tigrinus</i>	28	7 (25,0)	
<i>Leopardus wiedii</i>	10	6 (60,0)	
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0 (0,0)	
<i>Leopardus colocolo</i>	7	4 (57,1)	
SEXO			0,836
Macho	41	14 (34,2)	
Fêmea	15	4 (26,7)	
Sem dado disponível	34	13 (38,2)	
IDADE			0,682
Adulto	52	15 (28,9)	
Jovem	4	1 (25,0)	
Sem dado disponível	34	15 (44,1)	
PROCEDÊNCIA DO ANIMAL			0,293
Sem dado disponível	26	5 (19,2)	
Centro Ocidental	2	2 (100)	
Centro Oriental	15	4 (26,7)	
Metropolitana	12	6 (50,0)	
Nordeste	4	1 (25,0)	
Noroeste	6	1 (16,7)	
Sudeste	11	6 (54,5)	
Sudoeste	14	6 (42,9)	
PERÍODO DE DEPÓSITO			0,778
1999 a 2005	22	6 (27,3)	
2006 a 2010	46	19 (41,3)	
Sem dado disponível	22	6 (27,3)	

n = número de animais.

Tabela 2. Número de amostras examinadas (E), amostras positivas (P) e porcentagem de positividade (%) para *Sarcocystis* spp. por tecido e por espécie de pequeno felídeo silvestre neotropical do Rio Grande do Sul.

Espécie	Músculo			Língua			Diafragma			Coração			Cérebro			Humor vítreo			Musculatura Ocular			Olhos		
	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%	E	P	%
<i>Puma yagouaroundi</i>	21	4	0,0	15	2	13,3	14	1	7,1	14	0	0,0	11	0	0,0	12	0	0,0	11	0	0,0	12	0	0,0
<i>Leopardus geoffroyi</i>	21	5	23,8	13	3	23,1	14	2	14,3	14	1	7,1	10	0	0,0	11	0	0,0	11	3	27,3	11	2	18,2
<i>Leopardus tigrinus</i>	26	7	26,9	16	2	12,5	17	1	5,9	21	0	0,0	12	1	8,3	12	0	0,0	13	1	7,7	12	0	0,0
<i>Leopardus wiedii</i>	8	3	37,5	8	5	62,5	9	2	22,2	10	0	0,0	7	0	0,0	7	0	0,0	7	1	14,3	7	2	28,6
<i>Leopardus pardalis</i>	1	0	0,0	1	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	1	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0
<i>Leopardus colocolo</i>	6	3	50,0	3	1	33,3	2	0	0,0	4	0	0,0	2	0	0,0	2	0	0,0	2	1	50,0	2	0	0,0
Total	83	22	26,5	56	13	23,3	56	6	10,7	63	1	1,6	43	1	2,3	44	0	0,0	44	6	13,6	44	2	4,6

Tabela 3. Múltiplo alinhamento das sequências de *Sarcocystis felis*-like pela amplificação do gene ITS-1 em amostras teciduais de pequenos felídeos silvestres neotropicais do Rio Grande do Sul.

Espécie	Tecido	Identidade da Amostra	Numero de Acesso GenBank ^{MT}	Longitude da Sequência (nucleotídeos)	% identidade com o clone	
					1453b (AY190081)	1454 (AY190082)
<i>Puma yagouaroundi</i>	Músculo esquelético	Py75m	KC160200	211	97,1	96,6
	Músculo esquelético	Py83m	KC160201	211	97,1	96,6
	Músculo esquelético	Py35m	KC160198	211	97,1	96,6
	Língua	Py20li	KC160197	211	98,1	97,6
	Língua	Py55li	KC160199	211	96,6	96,2
<i>Leopardus geoffroyi</i>	Músculo esquelético	Lg80m	KC160206	211	97,1	96,6
	Músculo esquelético	Lg70m	KC160204	211	97,6	97,1
	Músculo esquelético	Lg88m	KC160214	792	96,4	96,7
	Língua	Lg71li	KC160205	211	98,1	97,6
	Músculo ocular	Lg67mOi	KC160203	211	97,6	97,1
<i>Leopardus tigrinus</i>	Músculo esquelético	Lt19m	KC160207	211	97,1	96,6
	Músculo esquelético	Lt48m	KC160208	211	97,1	96,6
	Músculo esquelético	Lt89m	KC160210	211	98,1	97,6
	Músculo esquelético	Lt84m	KC160209	211	98,5	98,1
<i>Leopardus wiedii</i>	Músculo esquelético	Lw12m	KC160211	211	98,1	97,6
	Diafragma	Lw73d	KC160212	211	97,6	97,1
<i>Leopardus colocolo</i>	Músculo esquelético	Lc82m	KC160202	211	97,1	96,6
	Músculo esquelético	Lc76m	KC160213	565	96,1	96,6

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As coleções zoológicas depositadas em museus brasileiros representam bancos genéticos importantes, nos quais os acervos de tecidos são imprescindíveis na pesquisa de agentes circulantes em animais silvestres, sem prejuízo das populações de espécies particularmente vulneráveis ou em perigo de extinção. Pela primeira vez no Brasil, esta utilidade foi avaliada no estudo de dois importantes agentes protozoários, *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp., em seis espécies de felídeos neotropicais, com uma frequência de 34,4%, para cada um destes coccídios.

Pequenos e grandes felídeos silvestres constituem o topo da cadeia alimentar de um ecossistema, interagindo com diferentes níveis biológicos. As relações presa / predador são elo chave na dinâmica de várias das doenças parasitárias em especial de coccídios da família Sarcocystidae. Formas assexuadas destes parasitas podem estar infectando diversas espécies de hospedeiros. A detecção pela amplificação do ITS-1 comprovou a circulação de *T. gondii* e *Sarcocystis* spp., no ciclo silvestre, levantando a questão das potenciais fontes de infecção para estes hospedeiros, provenientes seja de espécies silvestres, domésticas ou ainda por contaminação hídrica.

Considera-se este estudo o primeiro encontro de DNA de *Toxoplasma gondii* em pequenos felídeos silvestres neotropicais de vida livre, embora tenha sido previamente descrito sorológica e molecularmente em algumas espécies destes felídeos em cativeiro, a procedência das amostras de este estudo tem valor fundamental, por serem animais de vida livre e de animais que somente estão presentes em regiões neotropicais.

No tocante à estrutura genética populacional do *Toxoplasma*, vale salientar que as amostras primárias teciduais coletadas de vários órgãos, não permitiram uma melhor sensibilidade dos procedimentos moleculares empregados. As condições de procedência e armazenamento tiveram, provavelmente, interferência na degradação do DNA genômico. No entanto, o material analisado possibilitou a caracterização de novos genótipos, ainda não descritos, em especial o tipo I, vinculado até hoje com a apresentação da toxoplasmose ocular na região de Erechim no Rio Grande do Sul, tida como um genótipo de alta patogenicidade para humanos.

O carnivorismo possui uma estreita relação na transmissão do *Sarcocystis* spp., porém poucos estudos tem avaliado o papel dos predadores. Assim como no *T. gondii*, uma frequência baixa de indivíduos foi observada pela detecção molecular baseada com amostras teciduais primárias destes animais. Contudo, em duas amostras foi possível

estabelecer uma identidade elevada entre as sequências previamente descritas de *S. felis* em felídeos do hemisfério norte e as aqui obtidas.

Como já foi descrito por vários autores, a qualidade e quantidade do DNA alvo são fundamentais no que diz respeito ao desempenho dos procedimentos moleculares. Entretanto alguns tecidos demonstraram maior utilidade diagnóstica para os agentes estudados, como musculatura esquelética do quadríceps femoral e língua. Cabe mencionar que estes tecidos podem ser facilmente obtidos durante os procedimentos de taxidermia realizados no momento de tomar os espécimens que ingressam nas coleções biológicas, sem prejuízo da carcaça, pele ou ossos, conformando um banco de material biológico útil em futuras pesquisas de agentes infecciosos.

A presença de felídeos silvestres em ambientes urbanos e peri-urbanos no Brasil é frequente e a possibilidade de troca de agentes na interfase animais silvestres – domésticos e o homem é grande. Os resultados desta pesquisa demonstram que no Rio Grande do Sul, genótipos atípicos potencialmente virulentos de *T. gondii* podem estar circulando amplamente nesta interfase, assim como *S. felis*-like.

REFERÊNCIAS

- ABEL, J.; et al. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. **Parasitology**, London, v. 132, n. 2, p. 187-92, 2006.
- ANDERSON, A. J.; et al. *Sarcocysts* in the Florida Bobcat (*Felis rufus floridanus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 28, n. 1, p. 116-120, 1992.
- ANDRÉ; M. R.; et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 1007-1009, 2010.
- ATKINSON, C. T.; et al. Morphology; prevalence; and distribution of *Sarcocystis* spp. in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 29, n. 1, p. 73-84, 1993.
- BARTA, J.R.; et al. The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 3, p. 726-727, 2005.
- BASSO, W.; et al. Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* – experimental infection of putative definitive and intermediate host species. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 178, p. 223-234, 2011.
- BISBY, T. M.; et al. *Sarcocystis* spp. encephalomyelitis in a cat. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 39, n. 1, p. 105-112, 2010.
- BRIGGS, M. B.; LEATHERS, C. W.; FOREYT, W. J. *Sarcocystis felis* in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Journal of the Helminthological Society of Washington**, Lawrence, v. 60, p. 227-229, 1993.
- CHEADLE, M. A.; SPENCER, J. A.; BLAGBURN, B. L. Seroprevalences of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in nondomestic felids from Southern Africa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 30, n. 2, p. 248-251, 1999.
- CHRISTIE, E.; DUBEY, J. P.; PAPPAS, P. W. Prevalence of *Sarcocystis* infection and other intestinal parasitisms in cats from a humane shelter in Ohio. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 168, n. 5, p. 421-422, 1976.
- DIESING, L.; et al. *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. **Parasitology Research**, Berlin, v. 75, p. 114-117, 1988.
- DOLEZEL, D.; et al. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 795-798, 1999.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in cats. **Feline Practice**, Santa Barbara, v. 16, n. 4, p. 12-45, 1986.

- DUBEY, J. P.; et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 182–188, 2007.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, p. 1019-1024, 1998b.
- DUBEY, J. P. *Sarcocystis* and other coccidia in foxes and other wild carnivores from Montana. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 181, n. 11, p. 1270-1271, 1982.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd ed. Boca Raton; Florida: CRC Press, 2010. 313 p.
- DUBEY, J. P.; et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 192, n. 9, p. 1269-1285, 1988.
- DUBEY, J. P.; et al. *Sarcocystis felis* spp. n. (Protozoa: Sarcocystidae) from the bobcat (*Felis rufus*). **Journal of the Helminthological Society of Washington**, Lawrence, v. 59, p. 227-229, 1992.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 807-819, 2003.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, S.; LIPSCOMB, T. P. Neosporosis in cats. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 27, p. 335-339, 1990.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 90-108, 2011.
- DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; CHARLESTON, W. A. G. Ultrastructural differentiation between sarcocysts of *Sarcocystis hirsute* and *Sarcocystis hominis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 34, n. 1-2, p. 153-157, 1989.
- DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L.; UPTON, S. J. **Coccidia (Eimeridae) of Canidae and Felidae**, 2000. Disponível em: <<http://biology.unm.edu/biology/coccidia/carniv1.html>>. Acesso em: 30 jan. 2013.
- EDWARDS, J. F.; et al. Disseminated sarcocystosis in a cat with lymphosarcoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 193, n. 7, p. 831-832, 1988.
- ELSHEIKHA, H. M.; et al. Sarcocystosis of *Sarcocystis felis* in cats. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, Cairo, v. 36, n. 3, p. 1073-1088, 2006.
- FAYER, R. *Sarcocystis* spp. in human infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, n. 4, p. 894-902, 2004.
- FERROGLIO, E.; et al. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya; East Africa. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, p. 43-49, 2003.

- FOREST, T. W.; et al. *Sarcocystis neurona*-like encephalitis in a Canada lynx (*Felis lynx canadensis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 31, n. 3, p. 383-387, 2000.
- FRENKEL, J. K. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 63, n. 4, p. 611-628, 1977.
- FRENKEL, J. K.; SMITH, D. D. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. **Parasitology Research**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 384-389, 2003.
- GENBANK Statistics. Bethesda: National Center Biothechnology Information, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 1 jan. 2013.
- GHIMIRE, T. R. Redescription of genera of family Eimeriidae Minchin; 1903. **International Journal of Life Science**, Kathmandu, v. 4, p. 26-47, 2010.
- GILLIS, K. D.; et al. Naturally occurring *Sarcocystis* infection in domestic cats (*Felis catus*). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, p. 877-883, 2003.
- GONDIM, L. F. P.; et al. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 6, p. 1361-1365, 2004.
- GREINER, E. C.; et al. *Sarcocystis* spp. In muscles of free-ranging Florida panthers and cougars (*Felis concolor*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 25, n. 4, p. 623-628, 1989.
- GUTIÉRREZ-EXPÓSITO, D.; et al. Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 19-28, 2012.
- HILL, J. E.; CHAPMAN, W. L.; CRESTWOOD, A. K. Intramuscular *Sarcocystis* spp. in two cats and a dog. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 74, n. 4, p. 724-727, 1988.
- JOG, M. M.; WATVE, M. G. Sarcocystosis of chital-dhole: conditions for evolutionary stability of a predator parasite mutualism. **BMC Ecology**, London, v. 5, n. 3, p. 1-4, 2005.
- KING, J. S.; et al. Implications of wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in Australia. **The Veterinary Journal**, London, v. 188, n. 1, p. 24-33, 2011.
- KINSEL, M. J.; et al. Gastric spiral bacteria and intramuscular *Sarcocysts* in African lions from Namibia. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 34, n. 2, p. 317-324, 1998.
- KIRKPATRICK, C. E.; et al. *Sarcocystis* spp. in muscles of domestic cats. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 23, p. 88-90, 1986.
- KLUGE, J. P. Trichinosis and sarcosporidiosis in a puma. **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, Ames, v. 3, p. 110-111, 1967.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; BRAUND, K. G. *Sarcocystis* spp. and sarcocystosis. **BAM**, London, v. 5, n. 3, p. 249-254, 1995.

LLOYD-SMITH, J. O.; et al. Epidemic dynamics at the human-animal interface. **Science**, v. 326, p. 1362-1367, 2010.

MASON, R. W. The discovery of *Besnoitia wallacei* in Australia and the identification of a free-living intermediate host. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, Berlin, v. 61, n. 2, p. 173-178, 1980.

MEHLHORN, H.; et al. Another African disease in Central Europa: Besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, n. 4, p.861-868, 2009.

MILLÁN, J.; et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca; Balearic Islands; Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, p. 323-326, 2009.

MILLÁN, J.; et al. Large-scale serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in free-living carnivores in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 241-245, 2012.

MITREA, I. L.; IONIȚĂ, M.; ENĂCHESCU, V. Isosporosis in cats and dogs: etio-epidemiological and clinical features. **Bulletin USAMV-CN**, Cluj-Napoca, v. 63, n. 1-2, p. 343-347, 2006.

MODRÝ, D.; VOTÝPKA, J.; SVOBODOVÁ, M. Note on the taxonomy of *Frenkelia microti* (Findlay & Middleton; 1934) (Apicomplexa: Sarcocystidae). **Systematic Parasitology**, Dordrecht, v. 58, n. 3, p. 185-187, 2004.

MOHAMMED, O. B.; et al. *Hammondia heydorni* from the Arabian mountain gazelle and red fox in Saudi Arabia. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 3, p. 535-9, 2003.

MONTEIRO, R. M.; et al. Differential diagnosis of oocysts of *Hammondia*-like organisms of dogs and cats by PCR-RFLP analysis of 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p. 235-238, 2008.

MURADIAN, V.; et al. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 98, p. 128-134, 2012.

ODENING, K. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester; 1882 (Protista; Sporozoa; Coccidia). **Systematic Parasitology**, Dordrecht, v. 41, p. 209-233, 1998.

PENA, H. F.; et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PENA, H. F. J.; OGASSAWARA, S.; SINHORINI, I. L. Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of São Paulo; Brazil; and experimental transmission to humans. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 6, p. 1459-1465, 2001.

- PENA, H. F. J.; et al. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, p. 58-67, 2006.
- PRAKAS, P.; BUTKAUSKAS, D. Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. **Ekologija**, Taskent, v. 58, n. 1, p. 45-58, 2012.
- PRAKAS, P.; et al. Identification of *Sarcocystis columbae* in wood pigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. **Veterinay Medicine and Zootechnics**, Lithuanian, v. 55, n. 77, p. 33-39, 2011.
- RYAN, M. J.; WYAND, D. S.; NIELSEN, S. W. A *Hammondia*-like coccidian with a mink-muskrat life cycle. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 18, p. 29-35, 1982.
- SAITO, M.; et al. *Sarcocystis sui hominis* detected for the first time from pigs in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 60, n. 3, p. 307-309, 1998.
- SCHARES, G.; et al. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, n. 1, p. 44-52, 2002.
- SCHARES, G.; et al. *Hammondia*-like parasite from the European fox (*Vulpes vulpes*) forms biologically viable tissue cysts in cell culture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, p. 229–234, 2003.
- SCHRENZEL, M. D.; et al. Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, p. 635-647, 2005.
- SCOTCH, M.; ODOFIN, L.; RABINOWITZ, P. Linkages between animal and human health sentinel data. **BMC Veterinary Research**, London, v. 5, p. 1-9, 2009.
- SEAL, U. S.; ARMSTRONG, D. **Comments on the executive summary and recommendations**: Report of the diseases risk workshop. Omaha, Nebraska, USA: International Union for Conservation of Nature/Conservation Breeding Specialist Group, 2000.
- SEDLÁK, K.; BÁRTOVA, E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 136, p. 223-231, 2006.
- SILVA, M. S. A.; et al. Detection of *Hammondia heydorni* and related coccidia (*Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*) in goats slaughtered in Bahia; Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 156–159, 2009.
- SLAPETA, J. P.; et al. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, London, v. 163, p. 147-154, 2002.

- SOARES, R. M.; et al. Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), a South American canid, as a definitive host for *Hammondia heydorni*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, p. 46–50, 2009.
- SOARES, R. M.; et al. Identification of *Hammondia heydorni* oocysts by a hemingnested-PCR (*hnPCR*-AP 10) based on the *Hammondia heydorni* RAPD fragment AP 10. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 168-172, 2011.
- SOBRINO, R.; et al. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, p. 190-197, 2008.
- SPENCER, J. A.; HIGGINBOTHAM, M. J.; BLAGBURN, B. L. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. **Journal of Zoo and Wildlife Diseases**, Ames, v. 34, n. 3, p. 246-249, 2003.
- SREEKUMAR, C.; et al. *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 107, n. 1-2, p. 65-71, 2004.
- 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**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 841-848, 2006.
- TENTER, A. M. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1331-1330, 1995.
- TENTER, A. M.; et al. The conceptual basis for a new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 595–616, 2002.
- VITALIANO, S. N. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em animais selvagens do Brasil**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ZAHER, H.; YOUNG, P. S. As coleções zoológicas brasileiras: panorama e desafios. Biodiversidade. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, p. 24-26, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A- Distribuição de amostras de tecidos coletadas em espécimes de felídeos neotropicais depositados nas coleções biológicas do Rio Grande do Sul.

(continua)

Nº	Espécie	Procedência	Me	D	Co	Li	Ce	Olho	Hv	M Ocul.
1	Py	Santana do Livramento	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Lt	Caxias do Sul	X	X	X	X	X	X	X	X
3	Lt	Cachoeira do Sul	X	X	X					
4	Lg	BR 153	X	X	X	X	X	X	X	X
5	Py	Pinheiro Machado	X			X	X	X	X	X
6	Lt	SD	X		X	X	X	X	X	X
7	Lt	SD	X		X					
8	Lp	SD	X			X	X			
9	Lc	SD	X		X	X	X			
10	Py	Pelotas	X	X	X	X	X	X	X	X
11	Lg	Dom Pedrito		X						
12	Lw	São Fco. de Paula	X	X	X					
13	Lt	BR 201	X			X	X	X	X	X
14	Lt	RS 389 Km 73	X		X					
15	Py	SD	X	X	X					
16	Lt	SD		X	X					
17	Lt	SD	X							
18	Py	Canudos do Vale	X	X		X				
19	Lt	Canudos do Vale	X	X	X	X	X	X	X	X
20	Py	Bagé	X	X	X	X	X	X	X	X
21	Py	Ijuí	X	X	X	X	X	X	X	X
22	Lg	Pelotas	X	X	X	X		X	X	X
23	Lw	Nova Araçá	X	X	X					
24	Lg	Cristal do Sul	X							
25	Lg	SD	X	X	X	X	X	X	X	X
26	Lg	Itaqui	X	X	X	X				
27	Lg	Arroio Grande	X	X	X	X	X	X	X	X
28	Lw	Taquará	X	X	X	X	X	X	X	X
29	Lt	Ibarama	X	X	X	X	X	X	X	X
30	Lw	Pantano Grande	X		X	X	X	X	X	X
31	Lw	Arroio dos Ratos	X	X	X	X	X			
33	Lt	Dois Irmãos	X	X	X	X	X	X	X	X
35	Py	Cerrito Alegre	X	X	X	X				
36	Py	Gaurama	X							

(continuação)

37	Lg	Alegrete	X	X	X	X	X		
38	Lt	Machadinho	X	X	X	X			
39	Py	Taquará	X	X	X	X	X	X	X
40	Lt	SD			X	X	X	X	X
41	Lg	Arroio Grande	X		X				
42	Lt	POA	X	X	X	X			
43	Lt	Pantano Grande	X	X	X	X			
44	Lg	SD	X	X	X	X	X	X	X
45	Py	Santa Cruz do Sul	X	X	X	X	X		
46	Lt	SD	X	X	X	X	X		
47	Py	SD	X	X	X	X	X		
48	Lt	Lageado	X		X				
49	Py	Santa Cruz do Sul	X	X	X	X	X	X	X
50	Lg	Chuí	X	X	X	X	X	X	X
51	Lc	BR 290			X	X	X	X	X
52	Lt	Maquiné	X	X	X	X	X	X	X
53	Lw	Barão do Triunfo		X	X	X	X	X	X
54	Lw	Lageado		X	X	X	X	X	X
55	Py	Triunfo			X	X	X	X	X
56	Py	SD	X			X	X	X	X
57	Py	SD	X	X	X	X	X	X	X
58	Lt	Caxias do Sul	X	X	X	X	X		
60	Lt	SD	X	X					
61	Lw	Caçapava do Sul	X	X	X	X	X	X	X
62	Lg	Bagé	X	X	X	X	X	X	X
63	Py	SD	X	X	X				
64	Lc	SD	X	X	X				
65	Lg	SD	X	X	X	X			
66	Py	Caxias do Sul	X	X	X	X	X	X	X
67	Lg	Dom Pedrito	X	X	X	X	X	X	X
68	Lt	Marques de Souza	X	X	X	X	X	X	X
69	Lt	Dois Lajeados	X	X	X	X	X	X	X
70	Lg	Gravataí	X	X	X	X	X	X	X
71	Lg	BR 290	X	X	X	X	X		X
72	Lc	Pelotas	X	X	X	X	X	X	X
73	Lw	Jaguari	X	X	X	X			
74	Lc	Dom Pedrito	X						
75	Py	Bagé	X						

(conclusão)

76	Lc	Dom Pedrito	X						
77	Lt	Itapuá	X						
78	Py	Entre Rios do Sul	X						
79	Lt	São José Missões	X						
80	Lg	Tabai	X						
81	Lg	BR 290	X						
82	Lc	São Sepe	X						
83	Py	Caçapava do Sul	X						
84	Lt	Cerro Largo	X						
85	Lg	Barra do Quaraí	X						
86	Lg	Caçapava do Sul	X						
87	Lg	Rosário do Sul	X						
88	Lg	Bagé	X						
89	Lt	SC	X						
90	Lt	Triunfo	X	X	X		X	X	X
91	Lw	RS 709 Km 4	X	X	X	X	X	X	X
92	Py	Rosário do Sul	X				X	X	
93	Lt	Morungava	X	X	X	X	X	X	X
94	Pc	SD	X						

Lc: *L. colocolo*; **Lg:** *L. geoffroyi*; **Lp:** *L. pardalis*; **Lt:** *L. tigrinus*; **Lw:** *L. wiedii*; **Py:** *P. yagouaroundi*; **Me:** musculatura esquelética; **D:** diafragma; **Co:** coração; **Li:** língua; **Ce:** cérebro; **Od:** olho direito; **Hv Od:** humor vítreo olho direito; **M Od:** musculo olho direito; **Oi:** olho esquerdo; **Hv Oe:** humor vítreo olho esquerdo; **M Oe:** musculo olho esquerdo. SD – sem dados.

Observação: Foram excluídos da amostragem os animais de número **32** (*Leopardus tigrinus* macho coletado na FZB) e **34** (*Leopardus pardalis* macho coletado na FZB) por serem os únicos indivíduos em cativeiro e apresentar resultados negativos, e o **59** (*Puma concolor* fêmea coletado na UCS) por ser um único exemplar desta espécie, não ser um pequeno felídeo e suas amostras foram negativas neste estudo.

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

Apêndice B- Distribuição de amostras positivas na n-PCR-ITS-1 para a família Sarcocystidae detectados em felídeos neotropicais do Rio Grande do Sul.

(continua)

Nº	Espécie	Procedência	Sexo	Idade	Ano	Tecido	Sarcocystinae	<i>Toxoplasma</i>
4	Lg	BR 153	SD	A	2008	D	X	
7	Lt	SD	M	SD	SD	M	X	
8	Lp	SD	M	A	SD	Ce		X
12	Lw	São Fco. de Paula	M	SD	2007	M	X	
19	Lt	Canudos do Vale	M	A	2006	M	X	
						Li	X	X
20	Py	Bagé	M	A	2001	Od		X
						Li	X	
21	Py	Ijuí	M	A	2005	Od		X
						M Oe		X
						M		X
						Ce		X
22	Lg	Pelotas	M	A	SD	M Oe	X	
						Li	X	
23	Lw	Nova Araçá	SD	A	2001	D		X
24	Lg	Cristal do Sul	SD	A	SD	M		X
25	Lg	SD	M	A	SD	Li		X
						M		X
28	Lw	Taquará	SD	A	2004	Li	X	
						Co		X
						D	X	
30	Lw	Pantano Grande	M	A	2000	Li		X
						M		X
31	Lw	Arroio dos Ratos	M	A	2005	Li	X	X
						Co		X
35	Py	Cerrito Alegre	SD	A	SD	M	X	
						D	X	
36	Py	Gaurama	SD	SD	2000	M		X
2	Lt	Porto Alegre	F	J	2008	Li		X
45	Py	Santa Cruz do Sul	M	A	2006	M		X
						Li		X
47	Py	SD	F	A	2008	D		X
						Ce		X
						M		X
48	Lt	Lageado	F	SD	2002	M	X	
52	Lt	Maquiné	M	A	2002	Li		X
						M		X
						Ce		X

(continuação)

54	Lw	Lageado	F	A	2004	M Oe	X	
						Li	X	X
55	Py	Triunfo	F	J	2002	Li	X	
56	Py	SD	M	J	SD	Od		X
						M Od		X
						M Oe		X
						Li		X
						Ce		X
						M		X
57	Py	SD	M	A	SD	M Oe		X
						Co		X
						Ce		X
58	Lt	Caxias do Sul	M	A	2007	Co		X
						M		X
						D		X
61	Lw	Caçapava do Sul	M	A	2010	M Od		X
						M Oe		X
						M	X	
						Li	X	X
63	Py	SD	M	SD	SD	M	X	X
67	Lg	Dom Pedrito	M	A	2010	Od		X
						Hv Od		X
						Hv Oe		X
						M Oe	X	
						Li	X	
						Ce		X
68	Lt	Marques de Souza	F	A	2010	Oe		X
						M Oe		X
						Li		X
						M		X
69	Lt	Dois Lajeados	M	A	2010	Li		X
70	Lg	Gravataí	M	A	2010	Od	X	
						M Od	X	
						M Oe	X	
						M	X	
						Li		X
						Ce	X	

(conclusão)

71	Lg	BR 290	M	A	2010	Od	X	
						Oe	X	
						M Od	X	
						M Oe	X	
						Co		X
						M	X	
						D	X	
						Li	X	
72	Lc	Pelotas	F	A	2010	Oe		X
						Hv Oe		X
						M Od		X
						M Oe		X
						Li	X	X
						Ce		X
						M		X
						Co		X
73	Lw	Jaguari	M	A	2010	Li	X	
						M	X	
						D	X	
74	Lc	Dom Pedrito	SD	SD	2007	M	X	
75	Py	Bagé	SD	SD	SD	M	X	
76	Lc	Dom Pedrito	SD	SD	SD	M	X	
77	Lt	Porto Alegre	SD	SD	2008	M	X	
78	Py	Entre Rios do Sul	SD	SD	2008	M		X
79	Lt	São José das Missões	SD	SD	2008	M		X
80	Lg	Tabai	SD	SD	2008	M	X	
82	Lc	São Sepe	M	SD	2008	M	X	
83	Py	Caçapava do Sul	SD	SD	2009	M	X	
84	Lt	Cerro Largo	SD	SD	2009	M	X	
86	Lg	Caçapava do Sul	SD	SD	2009	M	X	
88	Lg	Bagé	SD	SD	2008	M	X	
89	Lt		M	SD	2007	M	X	
93	Lt	Morungava RS 020	M	A	2008	M Od	X	
						M Oe		
						M	X	
						Ce	X	
						Li	X	X
						D	X	
						Co		X

Fonte: Cañón-Franco, W. A. (2013).

ANEXO A- Certificado de procedência do material biológico coletado em museus do Rio Grande do Sul.



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
Reconhecida pela Portaria Ministerial nº 681 de 07/12/89 - DOU de 11/12/89
COMUNIDADE EVANGÉLICA LUTERANA SÃO PAULO

Museu de Ciências Naturais
Material em empréstimo da coleção científica

Nome do aluno: WILLIAM ALBERTO CANARI Telefone: 93951350
(51)

Nº acadêmico: 00184266

Disciplina:

Horário:

Professor(a):

Escola: UFRGS

Data de retirada: 23/07/2010

Data de devolução: / /

Descrição do material retirado:

MCNU	ESPECIE	LOCALIDADE	DATA
880	LEOPARDUS COLOCLO	DOM PEDRITO- RS	17/10/2007
1022	PUMA YAGOUARUNDI	BAGÉ - RS	
1023	LEOPARDUS COLOCLO	DOM PEDRITO - RS	
1381	LEOPARDUS TIGRINUS	ITAPUÁ - RS	08/03/08
1562	PUMA YAGOUARUNDI	ENTRE RIOS - RS	07/2008
1686	LEOPARDUS TIGRINUS	SÃO JOSÉ DAS MISSOES	06/12/2008
1563	LEOPARDUS GEOFFROY	TABAS - RS	06/2008
1661	LEOPARDUS GEOFFROY	BR-290	25/03/2008
1894	LEOPARDUS COLOCLO	SÃO SEPE-RS	04/2008
1938	PUMA YAGOUARUNDI	CAÇAPAVA DO SUL - RS	20/06/2009
2167	LEOPARDUS TIGRINUS	CERRO LARGO - RS	2009
2207	LEOPARDUS GEOFFROY	BARRA DO QUARAÍ - RS	30/1/2008
2303	LEOPARDUS GEOFFROY	CAÇAPAVA DO SUL - RS	04/2008
2365	LEOPARDUS GEOFFROY	ROSEARIO DO SUL - RS	31/ 07/2007
1015	LEOPARDUS GEOFFROY	BAGÉ - RS	24/3/2008

EDUARDO COELHO

Professor ou responsável técnico

FUNDAÇÃO
ZOO^{RS}
BOTÂNICA

Porto Alegre, 20 de abril de 2010

Comunico a quem possa interessar que o material (amostras congeladas de tecidos de felinos) transportado pelo aluno de doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS William Alberto Cañón-Franco é proveniente do acervo da coleção de mamíferos do Museu de Ciências Naturais-FZB e faz parte de um projeto que está sendo desenvolvido pelo aluno em parceria com a Universidade de São Paulo- USP para fins de pesquisa científica.


Biol.Dra. Márcia M. A. Jardim
CRB: 17090-03
Curadora da Coleção de Mamíferos
Setor de Mastozoologia/FZB
masto@fzb.rs.gov.br
r. 2056



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
MUSEU DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

GUIA DE REMESSA / INVOICE OF SPECIMENS
Setor de Ornitologia, Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS
Av. Ipiranga 6681/Caixa Postal 1429
91619-900, Porto Alegre, Brasil
Fone (51) 3320-3500 ramal 4415 Fax (51) 3320-3903
Email: carla@puccrs.br

Invoice Nº 02/2010

Data (date): 22 de julho de 2010 (22nd July 2010)

Para/To: Dra. Solange Maria Gennari (A/C
Doutorando William Cannon)
Instituição/Institution: Universidade de São
Paulo – USP Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Endereço/Address: Av. Prof. Orlando Marques de
Paiva, 87 Cidade Universitária, SP CEP. 05508-
000

Enviado por (Authorized by): Dra. Carla
Suertegaray Fontana (Curador / Curator)
Modo de envio (Mode of shipment): Em mãos
Nº de pacotes (Number of packages): 1
Período de empréstimo (Length of loan):
PERMANENTE
Material enviado como (Category): DOAÇÃO
(DONATION)

Tipo: TECIDOS

Código	Nome científico	Sexo	Data de coleta	Local de coleta	Amostra
MCP 1766	L. geoffroyi		2003	Triunfo RS	Ce, Mu, Co
MCP 1767	P. yagouaroundi	M		BR 392 - Santana do Livramento RS	Ce, Mu, Co
MCP 1768	P. yagouaroundi	F	24/01/2007	Peletas RS	Ce, Mu, Co
MCP 1775	L. wiedii	M	30/02/2010	Capapava do Sul RS	Mu, Co, Ce
MCP 1765	Carla agnes	F	15/03/2010	BR 296 Km 423, São Gabriel RS	Mu, Co, Pu
MCP 1775	L. wiedii	M	03/09/2010	Capapava do Sul, RS	Mu, Co, Pu

Please send publications citing these specimens.

In case of returning specimens and/or in all correspondence, please cite Invoice number.
Retain in 100% ethanol unless noted otherwise.

Recebido em boas condições, exceto onde indicado. Received in good condition excepted as
noted: _____ Data (Date): _____

Favor assinar uma cópia e devolver – Please sign and return one copy.