

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

LUANA KARLA NOGUEIRA DE SANTANA SOUZA SANTOS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* EM
MARSUPIAIS E ROEDORES SILVESTRES NA MESOREGIÃO SUL
BAIANO**

ILHÉUS – BAHIA

2018

LUANA KARLA NOGUEIRA DE SANTANA SOUZA SANTOS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* EM
MARSUPIAIS E ROEDORES SILVESTRES NA MESOREGIÃO SUL
BAIANO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. George Rego Albuquerque

Co-orientador(a): Dr^a Daniele de Santana Rocha

ILHÉUS – BAHIA

2018

S237 Santos, Luana Karla Nogueira de Santana Souza.
Detecção molecular de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em marsupiais e roedores silvestres na mesoregião sul baiano / Luana Karla Nogueira de Santana Souza Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2018.
58 f. : il. ; anexos.

Orientador: George Rego Albuquerque.
Co-orientadora: Daniele de Santana Rocha.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
Referências: f. 41-50.

1. Animais silvestres. 2. Epidemiologia. 3. Toxoplasmose em animais. 4. Neosporose. I. Título.

CDD 639.9

LUANA KARLA NOGUEIRA DE SANTANA SOUZA SANTOS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* EM
MARSUPIAIS E ROEDORES SILVESTRES NA MESOREGIÃO SUL DA
BAHIA**

Ilhéus – BA, 27/02/2018

George Rego Albuquerque – DSc
UESC/DCAA
(Orientador)

Daniele de Santana Rocha- DSc
UESC/DCAA
(Co-orientadora)

Rodrigo Alves Bezerra - DSc
Faculdade de Ilhéus – CESUPI

Renata Santiago Alberto Carlos - DSc
UESC/DCAA

**ILHÉUS – BA
2018**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à mãe natureza, que em toda sua gentileza, fornece os subsídios necessários à nossa sobrevivência e que a cada dia que passe possamos, nós, seres humanos, entendermos, valorizarmos, retribuindo a gentileza.

A minha família, especialmente meus pais Carlos Humberto Souza Santos e Juilma Cristina Nogueira de Santana Santos pela paciência e apoio nessa jornada. Aos meus irmãos Mardson Felipe e Carlos Matheus pelo companheirismo em todos os momentos. Aos meus avós Juildes, Maria Eulina e Maria Souza por todo o carinho e zelo que acalenta à alma, as minhas tias Virgínia Marilena e Cátia Souza pela amizade e preocupação.

Aos meus seis filhotes, Pichilgas, Guanine, Juninho, Guardião, Bisniniu e Alvo, por serem felinos, por serem amigáveis, por serem minha razão.

Aos meus amigos, Murilo Pitombo, Juliana Almeida, Camilla Nobre, Matheus Saron, Caio Ferraz por além do companheirismo, me ensinarem tanto sobre a vida.

Ao meu orientador Professor Dr. George Rego Albuquerque e a minha co-orientadora Daniele de Santana Rocha pela confiança, oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional e pessoal.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, os quais guardarei na memória com eterna admiração.

Aos amigos e colegas dos laboratórios do hospital veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), especialmente a Pedro Alcântara, Hellen Ferraz, Josiane Rocha, Tatiani Harvey, Luciana Guimarães, Camila Albano, Cassia Matos, Samantha Pellizoni, Philipe Brito, Ana Graziela Deiró, Gideão Galvão. Obrigada por todos os momentos, aprendizado, experiências compartilhadas.

Aos amigos e colegas Haniel Cedraz, Rebeca Dalety, Gabriela Mota, Jessica Freitas, Luciana Lacerda, Aisla Nascimento, Uillians Volkart pela disponibilidade, gentileza e companheirismo.

A equipe do Laboratório de Zoologia dos Vertebrados, que possibilitou que este trabalho fosse realizado. Agradecimento imensurável ao professor Dr. Martin Roberto Del Valle Alvarez e Elson Rios.

A todos os funcionários da UESC pelo companheirismo e palavras de incentivo durante os longos fins de semana.

Agradeço a UESC e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Enfim, agradeço a toda fauna do planeta Terra.

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* EM
PEQUENOS ROEDORES E MARSUPIAIS E ROEDORES NA
MESORREGIÃO SUL BAIANO**

RESUMO

As relações epidemiológicas entre humanos, animais domésticos e animais silvestres são pouco elucidadas, entretanto é de conhecimento que as ações antrópicas causam alterações no meio e acarretam na redução do espaço silvestre, aproximando a vida silvestre ao ambiente humano e aos animais domésticos levando a maiores possibilidades de distribuição de agentes patológicos. Com isso, objetivou-se conhecer a ocorrência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em pequenos mamíferos da mesorregião do Sul da Bahia. Para tal, foram coletados 323 animais de áreas de mata Atlântica e Agroflorestas de cacau (cabruca) situadas nos municípios de Una, Belmonte, Mascote e Ilhéus. Foi feita a extração de DNA a partir dos tecidos coletados cérebro, coração, pulmão, diafragma, fígado, rins e baço de 235 pequenos roedores e 88 marsupiais para análise molecular através da técnica de PCR que resultou em uma presença de DNA dos parasitas em 14 indivíduos, com 4 positivos para *T. gondii* e 10 para *N. caninum*, não houve infecção concomitante. Através da análise estatística não houve diferença entre as infecções e os locais de captura. Esta foi a primeira análise molecular feita em pequenos roedores e marsupiais da Bahia e a positividade encontrada na região pela detecção de DNA desses parasitas sugere que este ambiente está contaminado, principalmente nas áreas próximas a atividades antrópicas.

Palavras-chave: Mamíferos silvestres. Epidemiologia. Neosporose. Toxoplasmose.

**MOLECULAR DETECTION OF *Toxoplasma gondii* AND *Neospora caninum* IN
SMALL RODENTS AND MARSUPIALS IN THE MESORREGIÃO SUL
BAIANO**

ABSTRACT

The epidemiological relationships between humans, domestic animals and wild animals are little elucidated, however it is known that anthropic actions cause changes in the environment and lead to the reduction of wild space, bringing wildlife to the human environment and domestic animals leading to greater possibilities distribution of pathological agents. The objective of this study was to determine the occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in small mammals of the Southern Bahia mesoregion. For this purpose, 323 animals were collected from areas of Atlantic forest and cocoa agro-forestry (cabruca) located in the municipalities of Una, Belmonte, Mascote and Ilhéus. DNA was extracted from the brain, heart, lung, diaphragm, liver, kidney and spleen tissues of 235 small rodents and 88 marsupials for molecular analysis using the PCR technique that resulted in a DNA presence of the parasites in 14 individuals, with 4 positives for *T. gondii* and 10 for *N. caninum*, there was no concomitant infection. Statistical analysis showed no difference between infections and capture sites. This was the first molecular analysis done on small rodents and marsupials from Bahia and the positivity found in the region by DNA detection of these parasites suggests that this environment is contaminated, especially in areas close to anthropic activities

Keywords: Epidemiology. Neosporosis. Toxoplasmosis. Wild mammals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estágios biológicos de <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i>	20
Figura 3	Estágios biológicos de vida de <i>Neospora caninum</i>	22
Figura 4	Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	23
Figura 5	Disposição de armadilhas <i>Sherman</i> e <i>Tomahawk</i> em um ponto de captura.....	29
Figura 6	Armadilha de queda (<i>Pitfall trap</i>)	29
Figura 7	Desenho esquemático da disposição de armadilhas nas áreas de captura.....	30
Figura 8	Amplificação da PCR de <i>Toxoplasma gondii</i> em gel de agarose a 2%	32
Figura 9	Amplificação da PCR de <i>Neospora caninum</i> em gel de agarose a 2%	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Característica de pequenos mamíferos utilizados para detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i> por PCR.....	35
Tabela 2	Relação entre área de captura, ordem de indivíduos capturados e presença de DNA de parasitas.....	36
Tabela 3	Relação entre as espécies capturadas e o sexo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMARF	Coleção de Mamíferos Alexandre Rodrigues Ferreira
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GPS	Sistema de Posicionamento Global
HAI	Hemaglutinação Indireta (HAI)
IFAT	Teste de Imunofluorescência Indireta
ITS1	Espaçador Interno Transcrito
MAT	Teste de Aglutinação Modificada (MAT)
NAT	Teste de Aglutinação <i>Neospora</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
nPCR	Reação em Cadeia pela Polimerase <i>nested</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa – Real time
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrometro
mg	Miligrama
m	Metro
U	Rack Unit
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral.....	15
2.2	Específicos.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Mata Atlântica.....	16
3.2	<i>Toxoplasma gondii</i>	17
3.2.1	Agente etiológico.....	17
3.2.2	Formas infectantes e ciclo biológico.....	18
3.3	<i>Neospora caninum</i>	20
3.3.1	Agente etiológico.....	20
3.3.2	Formas infectantes e ciclo biológico.....	21
3.4	Diagnóstico.....	23
3.5	Importância epidemiológica dos marsupiais e roedores na transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i>	25
4	DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Toxoplasma gondii</i> E <i>Neospora Caninum</i> EM PEQUENOS ROEDORES E MARSUPIAIS NA MESORREGIÃO SUL BAIANO	26
4.1	INTRODUÇÃO	26
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2.1	Protocolo de Eutanásia e CEUA.....	28
4.2.2	Local de estudo.....	28
4.2.3	Coleta de amostras.....	29
4.2.4	Extração de DNA.....	31
4.2.5	Amplificação de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR.....	31
4.2.6	Amplificação de DNA de <i>Neospora caninum</i> por PCR.....	32
4.2.7	Análise estatística.....	33
4.3	RESULTADOS	34

4.4	DISCUSSÃO	37
4.5	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO	
	ANEXO A – Espécies de marsupiais e roedores capturados na mesorregião do Sul da Bahia.....	51
	ANEXO B – Normas da revista de publicação do artigo.....	58

1 INTRODUÇÃO

A atuação antrópica vem alterando o meio ambiente desde os primórdios da humanidade. Os impactos dessas ações acabam por modificar de forma incisiva o equilíbrio da natureza. Ademais, ao aumento da população, o turismo, a poluição, os desmatamentos são fatores que contribuem para ocorrência, emergência e reemergência de doenças (ZANELLA, 2016). Outros fatores que também contribuem são a crescente interdependência dos seres humanos com os animais de produção, de companhia e com animais silvestres (BIDAISEE; MACPHERSON, 2014).

Estudos buscam compreender melhor os fatores que possibilitam a transmissão zoonótica entre humanos, animais silvestres e animais domésticos, para assim, obter mais informações acerca da ocorrência de agentes etiológicos, de seu potencial infeccioso, de sua diversidade e da suscetibilidade dos hospedeiros (KOORIYAMA et al., 2013; MACPHEE; GREENWOOD, 2013; THOMPSON, 2013).

Os animais podem portar vários agentes patológicos e os coccídios são um grupo de protozoários que parasitam células obrigatoriamente. Neste grupo destacam as espécies *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, com ciclos heteroxenos facultativos e que tem os felídeos e os canídeos como hospedeiros definitivos, respectivamente. Ambos agentes provocam importantes enfermidades em animais, causando, principalmente, alterações neurológicas e reprodutivas. E, no caso de *T. gondii*, também há o potencial zoonótico de importância para saúde humana, principalmente para gestante e indivíduos imunocomprometidos.

De acordo com Rendón-Franco e colaboradores (2014) pouco se conhece sobre a dinâmica da infecção parasitária em animais silvestres, deste modo pesquisas epidemiológicas podem dimensionar o problema, posto que a detecção de infecção em animais pode indicar contaminação do ambiente com oocistos.

Roedores e marsupiais apresentam papel importante no ciclo de vida desses agentes, visto que, de acordo com os hábitos predatórios dos seus hospedeiros definitivos, podem ser fonte de infecção para felídeos e canídeos e favorecer a dispersão de oocistos no meio ambiente (GENNARI et al., 2015).

Devido a necessidade de estabelecer mais informações sobre as relações epidemiológicas entre animais silvestres e a importância desses agentes citados para a

saúde pública, objetivou-se pesquisar a prevalência desses agentes em pequenos mamíferos da mesorregião Sul Baiano.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Investigar a presença de DNA de *T. gondii* e *N. caninum* em tecidos de pequenos roedores e marsupiais capturados em áreas de Mata Atlântica e Agroflorestas de cacau (cabruca), localizadas na mesorregião do sul Baiano.

2.2 Específicos

- Realizar técnica molecular Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção de DNA, em tecidos de pequenos roedores silvestres e marsupiais capturados na mesorregião Sul Baiano.

-Produzir novos conhecimentos sobre acerca da infecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em pequenos roedores silvestres e marsupiais na mesorregião Sul da Bahia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é considerada um dos biomas mais heterogêneos do Brasil com fitofisionomia diversa, sendo a segunda maior floresta tropical da América do Sul (RIBEIRO et al., 2009, 2011). É um ecossistema bastante rico em diversidade e endemismo da fauna e da flora, e também um dos mais ameaçados do planeta, considerado um *hotspots* mundial de conservação (MYERS et al., 2000). Sua extensão foi reduzida a 8% do total original, devastada principalmente pela ocupação humana e exploração desenfreada (PINTO et al., 2006).

Esses fragmentos de floresta sofrem os efeitos de uma urbanização sem planejamento incluindo a introdução de espécies domésticas no ecossistema silvestre (SALGADO et al., 2007). No Brasil, o crescimento urbano causou grande degradação de áreas de floresta para a criação de cidades, e, em várias regiões, pequenas ilhas de vegetação permanecem preservadas em meio a grandes centros urbanos, criando um ciclo biológico diferente para os parasitas, com a presença de hospedeiros domésticos e silvestres em abundância (DUBEY et al., 2003; LEHMANN et al., 2003; SILVA et al., 2010; VITALIANO et al., 2010).

A interferência constante da atividade humana promove danos irreversíveis que fomentam a perda ou redução de hábitat de espécies silvestres o que leva à desequilíbrio com diminuição de populações da fauna e da flora, até casos de extinção, e também à seleção de espécies sinantrópicas que pode servir de interseção entre os animais silvestres e os humanos (VITALIANO et al., 2014a).

A região litorânea do Sul da Bahia possui os mais significativos remanescentes de Mata Atlântica em áreas agriculturáveis. O agrossistema Cabruca, intimamente ligada a implantação de cacau na Bahia, é cultura que melhor compatibilizou o desenvolvimento socioeconômico com a conservação ambiental (CPLC, 2013).

A cabruca não deve ser confundida conceitualmente com floresta, é uma área antropizada para gerar serviços, um sistema agrossilviculturais ou agroflorestais, ou seja, possuem dinâmica ecológica mais simples que uma floresta natural, produção consorciada envolvendo componente arbóreo com outro animal e/ou cultivo agrícola de

forma que maximiza a ação compensatória e minimizar a competição entre espécies (CPLC, 2013).

3.2 *Toxoplasma gondii*

3.2.1 Agente etiológico

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, com apenas uma espécie conhecida (DUBEY, 2004). É uma parasita zoonótico de distribuição global que infecta uma grande variedade de animais homeotérmicos, incluindo mamíferos, aves e o ser humano (ROBERT-GANGNEUX et al., 2012; TIDY et al., 2017). É, notavelmente, bem-sucedido pela capacidade de parasitar diversas espécies nos mais variados ecossistemas (BECK et al., 2009). Esse agente é responsável pela toxoplasmose, doença de grande importância para saúde pública por causar risco de morte, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos e fetos em desenvolvimento (DUBEY, 2010).

Este agente foi identificado simultaneamente pelos pesquisadores Nicolle e Manceux, em tecidos de um roedor africano (*Ctenodactylus gundi*) na Tunísia, e por Splendore, em tecidos de um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) no Brasil (NICOLLE; MANCEAUX, 1908; SPLENDORE, 1908). Os cientistas acreditaram, a princípio, que este pertencia ao gênero *Leishmania* e nomearam de *Leishmania gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1908) e só posteriormente caracterizaram como uma nova espécie pertencente ao um novo gênero, *Toxoplasma gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909). O nome proposto baseou-se na morfologia do estágio infectante do protozoário (toxos = arco, plasma = forma) e *gondii* pode ter resultado de um erro ortográfico do nome do hospedeiro original *C. gundi* (DUBEY, 2008).

A princípio suspeitou-se que eram transmitidos por artrópodes, por ter sido encontrado no sangue de alguns hospedeiros, e avaliou-se diversas espécies de artrópodes sem sucesso (CHATTON; BLANC, 1917; FRENKEL; 1970; FRENKEL; DUBEY, 1973). De acordo com Dubey (2009), em 1939, nos Estados Unidos, foi verificada a importância clínica, deste parasita, na identificação de cistos no cérebro de uma recém-nascida devido à transmissão congênita. Posteriormente foi identificada por Hartley e Marshall (1957) a transmissão entre várias espécies de animais. Com o

desenvolvimento da sorologia identificou uma alta prevalência em humano e animais em todo o mundo (FERGUSON, 2009).

Este parasita apresenta grande eficiência, devido a sua propagação a grande variedade de hospedeiros, disseminação mundial e transmissão horizontal (BLADER; KOSHY, 2014).

3.2.2 Formas infectantes e ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*

Apresenta um ciclo biológico complexo, heteroxeno facultativo, como hospedeiro definitivo exclusivamente os felídeos, domésticos e selvagens. E como hospedeiros intermediários uma grande variedade de espécies entre os animais vertebrados, como mamíferos, aves e o ser humano. Os coccídios em geral são unicamente transmitidos por ciclo fecal/oral, porém *T. gondii* também pode ser transmitido por via transplacentária e através do carnivorismo (DUBEY, 2004).

Existem três estágios infectantes deste parasita: os esporozoítos presentes no interior dos oocistos, os taquizoítos na forma livre ou proliferativa, e os bradizoítos (contidos no interior dos cistos teciduais). Todos os estágios são haploides; os taquizoítos e bradizoítos dividem-se assexuadamente, enquanto os esporozoítos são produzidos pela meiose (SIBLEY et al., 2009).

Os oocistos são a forma de resistência ambiental, são formados dentro dos enterócitos no intestino de felídeos, os merozoítos liberados dos esquizontes formam o macrogameta (feminino) e os microgametas (masculino) que possui flagelos. O gameta masculino fertiliza o feminino e a parede dos oocistos já começa a se formar durante a fertilização com formação do zigoto. Quando os oocistos estão maduros rompem a célula, sendo liberados para a luz do lúmen onde permanecem até serem expelidos nas fezes (DUBEY, 2004).

Os oocistos são liberados no ambiente na forma não esporulada (Figura 1C), ou seja, não infectantes, e a esporulação ocorre de 1 a 5 dias fora do corpo dos felídeos, dependendo da temperatura e umidade ambiental (DUBEY et al., 1998). O oocisto tem formato esférico com 10µm X 12µm, ao esporular contém dois esporocistos cada qual com quatro esporozoítos (Figura 1D). A formação de oocisto ocorre, apenas, dentro dos enterócitos do intestino dos felídeos através da reprodução sexual (DUBEY, 2004).

Os taquizoítos (Figura 1A) são a forma invasiva de divisão rápida e disseminação de *T. gondii* (ROBERT-GANGNEUX et al., 2012). Tem formato de meia lua, tamanho $2\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$, e o núcleo posicionado centralmente, invade a célula hospedeira através de penetração ativa da membrana e torna-se envolvido pelo vacúolo parasitóforo, que protege o parasita contra as defesas do hospedeiro, a sua multiplicação é por endodiogenia que se repete até a célula hospedeira se romper. Os taquizoítos que emergem da célula rompida invadem outras células ao redor (DUBEY, 2004; JONES; DUBEY, 2010).

Os bradizoítos são a conversão de taquizoítos para um estágio de divisão lenta que forma cisto tecidual (Figura 1B). Tem formato esferoide nas células cerebrais ou alongado nas células musculares, o tamanho varia de $10\mu\text{m}$ para cistos jovens, que contém apenas dois bradizoítos ou até $100\mu\text{m}$ de diâmetro para os maduros, que contém cerca centenas ou milhares de bradizoítos (ROBERT-GANGNEUX et al., 2012). A parede do cisto consiste em membrana com invaginações e uma camada de material granular denso (FERGUSON, 2004). O cisto tecidual cresce, mas permanece no interior da célula do hospedeiro, os bradizoítos no interior do cisto medem $7\mu\text{m} \times 1,5\mu\text{m}$ e diferente posicionamento do núcleo do taquizoíto.

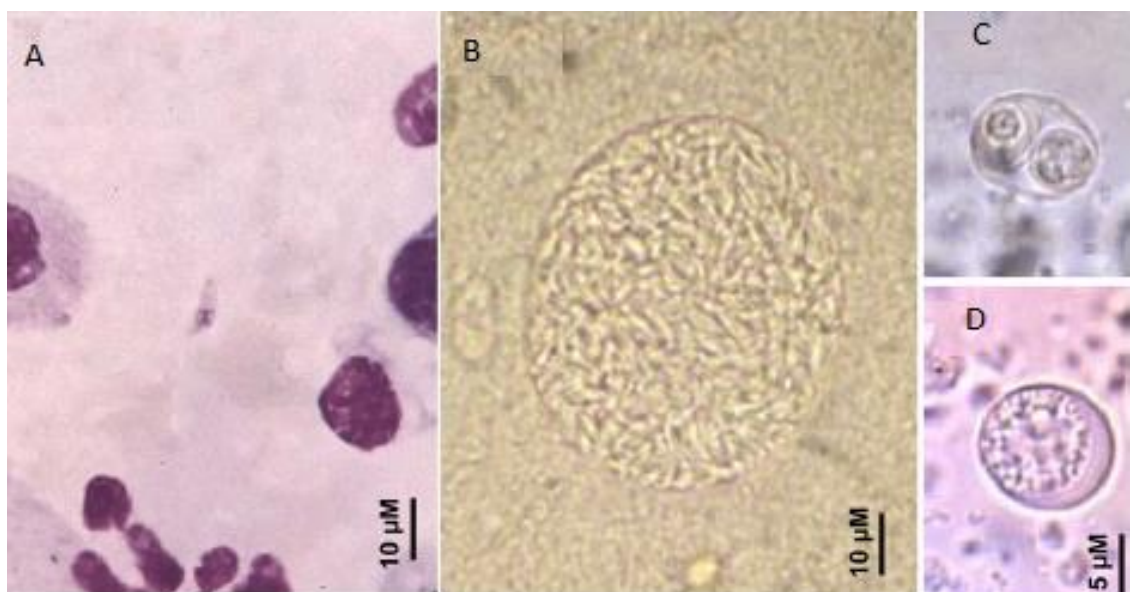


Figura 1. Estágios biológicos de *Toxoplasma gondii*.

Imagem microscópica de taquizoíto em amostra corada com Giemsa de fluido de lavagem broncoalveolar (A) (aumento X500), um cisto tecidual do cérebro de camundongo infectado (B) (aumento x500), oocisto não esporulado (C) e esporulado (D) (aumento X1000).

Fonte: Robert-Gangneux et al., 2012.

A transmissão pode ocorrer de modo horizontal e/ou vertical. Horizontalmente, através da via fecal/oral, pode ocorrer a infecção por ingestão de oocistos presentes no solo, água e alimentos contaminados, pela ingestão de carne malcozida ou crua e pelo carnivorismo mediante a ingestão da presa infectada. A transmissão vertical dá-se por via transplacentária (FIGURA 2) (JONES; DUBEY, 2010). Também pode ocorrer, em menor frequência, a transmissão de taquizoítos através de transfusão de sangue e transplante de órgãos (DUBEY, 2008, 2010).

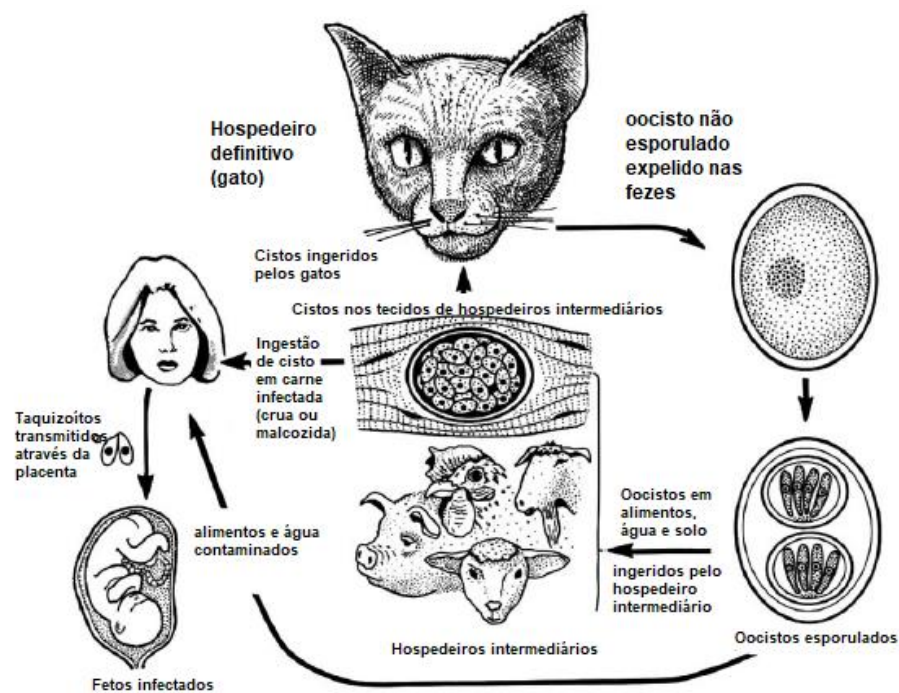


Figura 2. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.

Fonte: Adaptado de Dubey, 2004.

3.3 *Neospora caninum*

3.3.1 Agente etiológico

Neospora caninum é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Dentro do gênero *Neospora* foram identificadas duas espécies a *N. caninum*, na qual o hospedeiro definitivo é o cão (DUBEY, 1999) e a *N. hughesi* proposta por Marsh e colaboradores (1998) ser um parasita de equinos, mas com hospedeiro definitivo ainda não identificado. Pode infectar várias espécies de mamíferos e é a causa mais comum de aborto em bovinos pelo mundo (DUBEY, 1999).

Foi primeiramente reconhecido em 1984 em cães na Noruega (BJERKAS et al., 1984) e descrito como um novo gênero e nova espécie *N. caninum* por Dubey e colaboradores (1988).

N. caninum compartilha várias características morfológicas e biológicas semelhantes com *T. gondii* (DUBEY et al., 2002, 2007; DUBEY; SCHARES, 2011), no entanto, possuem algumas diferenças pontuais: *N. caninum* é o agente responsável pela Neosporose, doença primária de bovinos e cães e os hospedeiros definitivos desses parasitas são os canídeos, enquanto que o *T. gondii* causa a Toxoplasmose, doença principalmente de humanos, ovelhas e cabras e os felídeos são os hospedeiros definitivos deste agente (DUBEY et al., 2007).

Não há provas conclusivas sobre a capacidade zoonótica deste parasita. Em um estudo experimental realizado em um feto de macaco rhesus (*Macaca mulatta*) imunocomprometido confirmou-se a infecção por *N. caninum* o que conflagrou a preocupação com sua capacidade zoonótica (BARR et al., 2010), outros estudos já foram detectaram, em humanos, níveis baixos da presença de anticorpos anti-*N. caninum* (TRANAS et al., 1999; INNES et al., 2001; LOBATO et al., 2006; BARRATT et al., 2010), contudo, ainda não houve detecção molecular do parasita em tecidos humanos.

3.3.2 Formas infectantes e ciclo biológico *Neospora caninum*

O ciclo biológico se caracteriza como complexo, heteroxeno, facultativo, que envolve os canídeos como hospedeiros definitivos onde a replicação sexual ocorre e uma variedade de hospedeiros intermediários, nos quais ocorre a replicação assexuada (DUBEY; LINDSAY, 2006; DUBEY, et al., 2007). Os animais que até o momento foram confirmados como hospedeiro definitivo foram todos do gênero *Canis* incluindo os cães domésticos (*Canis familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), lobo cinza (*Canis lupus lupus*) e dingos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010). Os bovinos são os hospedeiros intermediários mais comuns, contudo já foram relatadas várias infecções em outros mamíferos vertebrados, como búfalos, pequenos ruminantes, galinhas de vida livre, carnívoros, que podem atuar na transmissão do agente no ciclo doméstico e silvestre (GONDIM, 2006; COSTA et al., 2008; ALMERÍA, 2013).

Similar ao *T. gondii*, possui 3 formas infectantes: esporozoítos, em oocistos esporulados, taquizoítos e bradizoítos (no interior dos cistos teciduais).

Os taquizoítos (Figura 3A) e os cistos teciduais (Figura 3B) são encontrados nos hospedeiros intermediários e ocorrem intracelularmente (DUBEY et al., 2002). Os taquizoítos tem aproximadamente $6\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ e os cistos teciduais, de formato oval chega até $107\mu\text{m}$ pode ser encontrado principalmente no cérebro ou na musculatura (DUBEY, 2004). Os oocistos (Figura 3C e D) são excretados nas fezes dos canídeos e esporulam no ambiente em até 24 horas. Pouco se sabe sobre a sobrevivência do oocisto no ambiente, assume-se que seja similar ao de *T. gondii* (DUBEY, 2004).

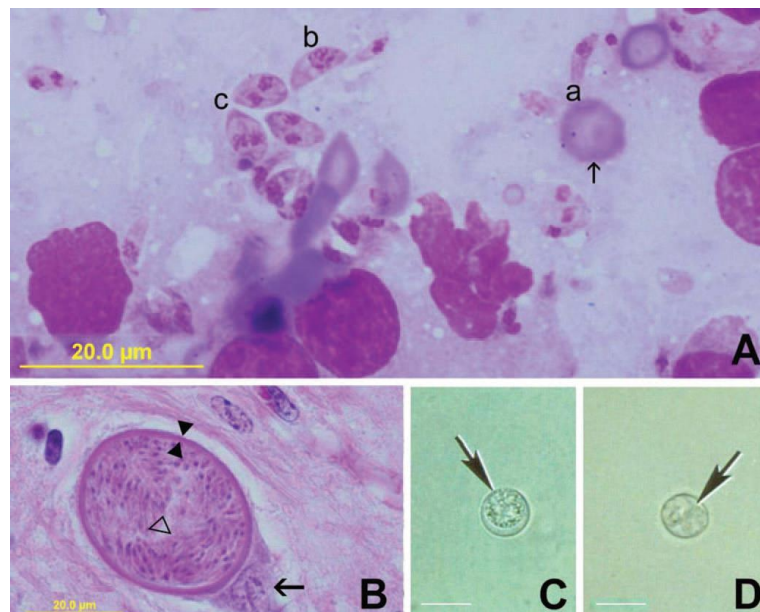


Figura 3. Estágios biológicos de *Neospora caninum*.

(A) Esfregaço por impressão de fígado de rato infectado retratando vários taquizoítos. Nota-se que os taquizoítos tem diferentes dimensões, dependendo do seu estágio de divisão: (a) taquizoíto delgado, (b) um taquizoíto após a divisão, e (c) três taquizoítos divididos em comparação com o tamanho de um glóbulo vermelho (seta). (B) Corte histológico de um cisto tecidual dentro de um neurônio na medula espinal de um bezerro congenitamente infectado (hemoxilina e eosina). Nota-se uma parede fina (ponta oposta da seta) cercado o bradizoíto delgado (triângulo aberto). O núcleo da célula do hospedeiro (seta) é cortado no ângulo. (C) oocisto não esporulado com massa central sem divisão nas fezes de cão (sem coloração) Barra $10\mu\text{m}$. (D) oocisto esporulado (seta) com dois esporocistos internos (sem coloração) Barra $10\mu\text{m}$.

Fonte: Dubey et al., 2007.

Todos os estágios estão envolvidos na transmissão do agente e provavelmente os carnívoros se infectem pela ingestão de tecidos contendo cistos teciduais e os herbívoros

pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados. A infecção transplacentária pode ocorrer quando taquizoítos são transmitidos da mãe para o feto durante a gestação (FIGURA 4) (DUBEY et al., 2007).

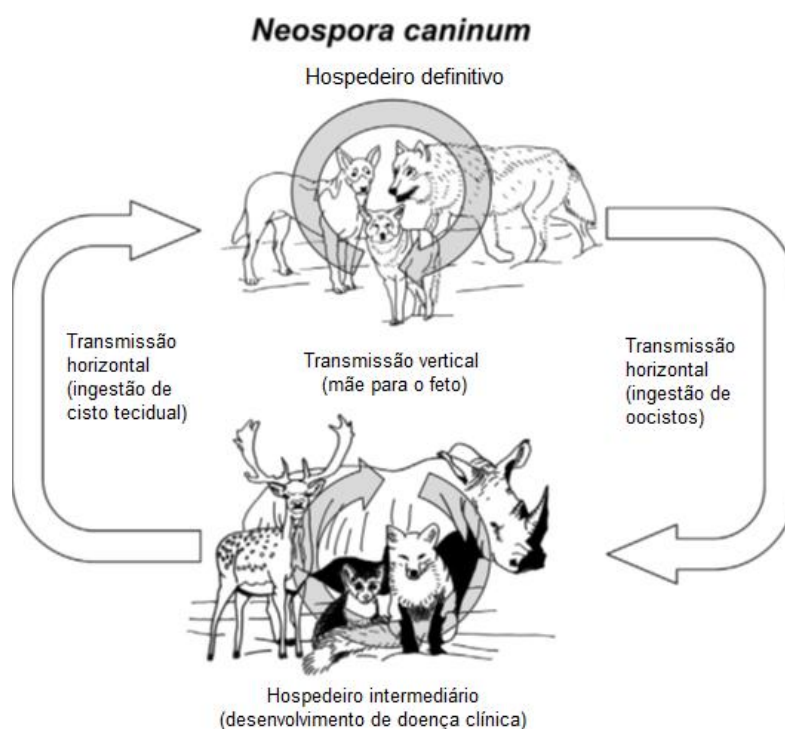


Figura 4. Ciclo biológico de *Neospora caninum*.

Fonte: Adaptado de Donahoe et al., 2015.

3.4 Diagnóstico

O diagnóstico de *T. gondii* e *N. caninum* em espécies de animais não domésticos apresenta uma grande variedade de técnicas com diferentes níveis de sucesso, entre as quais estão uso de técnicas sorológicas, técnicas histológicas, moleculares e de isolamento do parasita através ensaio biológico e cultura celular.

Para Hill; Dubey (2002) exames coproparasitológico para detecção de oocistos podem ser realizados nas fezes de felídeos (*T. gondii*) ou canídeos (*N. caninum*), porém não é considerada uma técnica muito prática para utilização em inquéritos epidemiológicos, sendo as técnicas sorológicas mais eficientes para detecção da infecção parasitária. Contudo, a técnica sorológica, o isolamento biológico pode apresentar algumas dificuldades logísticas e laboratoriais, como a detecção ser de modo indireto, a dificuldade de apresentar boa quantidade/ viabilidade do agente e o tempo necessário de espera para o desenvolvimento do agente na cultura celular (CONRAD et

al., 1993; KIM et al., 2000; GONDIM et al., 2006; JAKUBEK et al., 2012; ALMERÍA, 2013)

Nesta perspectiva os métodos moleculares apresentam-se como uma opção para a detecção do agente de diferentes substratos, sangue, tecidos, por exemplo. Entre os métodos para detecção de DNA, o mais utilizado é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), esta é uma técnica eficiente que permite à amplificação enzimática do DNA (LEFEVRE-PETTAZZONI et al., 2006). Para alcançar alta sensibilidade, vários genes alvo são geralmente utilizados para a detecção de *T. gondii* em amostras biológicas, incluindo o gene B1, o elemento de repetição de 529 pb e as sequências do espaçador interno transcrito (ITS1) ou do rDNA 18S (JONES et al., 2000; FAHALLI et al., 2014). Com *N. caninum*, este teste também tem alta sensibilidade e especificidade para a detecção de DNA, que pode ser aplicada em amostras de tecido ou sangue e outros fluídos corporais. Os marcadores mais comuns são o gene Nc5 e o ITS1 (DUBEY; SCHARES, 2006).

3.5 Importância epidemiológica dos marsupiais e roedores na transmissão de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*

Vários estudos realizados detectaram a presença destes parasitas em mamíferos de diferentes ordens, em carnívoros, artiodactyla, perissodactyla, rodentia, marsupialia, aves entre outros. Porém, ainda são necessários mais estudos para a compreensão do papel destes animais no ciclo silvestre desses parasitas (DUBEY, 2010).

Em roedores, estudos sorológicos e moleculares detectaram anticorpos/DNA *N. caninum* em *Mus musculus* (FERROGLIO et al., 2007; JENKINS et al., 2007; BARRATT et al., 2008; THOMASSON et al., 2011; MENDINA-ESPARZA et al., 2013), *Rattus norvegicus* (HUANG et al., 2004; FERROGLIO et al., 2007; JENKINS et al., 2007; MENDINA-ESPARZA et al., 2013), *Apodemus sylvaticus* (FERROGLIO et al., 2007; THOMASSON et al., 2011), *Micromys minutus* (MEERBURG et al., 2012), *Microtus arvalis* (FUEHRER et al., 2010), *Arvicola terrestris* (FUEHRER et al., 2010), *Spermophilus variegates* (MEDINA-ESPARZA et al., 2013), e *Hydrochaeris hydrochaeris* (YAI et al., 2008; TRUPPEL et al., 2010; VALADAS et al., 2010).

Os roedores servem como hospedeiros, vetores ou reservatórios de muitos parasitas patogênicos e mantém a transmissão de ciclos biológicos desses agentes em diferentes ambientes o que causa doença em animais, e grandes perdas econômicas para setor de pecuária. Os ratos também foram tidos como hospedeiro intermediário para *N. caninum* e *T. gondii* (MEERBURG et al., 2012; ROBERT-GANGNEUX, et al., 2012).

Foi demonstrado em estudos que 16% de ratos, em ambientes próximos a fazenda, foram positivos para infecção natural com *N. caninum* (HUANG et al., 2004). Em outro estudo 77% de ratos domésticos (*Mus musculus*) e 50% de rato marrom (*Rattus norvegicus*) foram positivos para ensaio com PCR (MEDINA-ESPARZA et al., 2013).

Em marsupiais, relatos de infecção natural são raros, identificados em três espécies comprovadas por presença de anticorpos anti-*N. caninum* e presença de DNA do mesmo: *Didelphis marsupialis* (YAI et al., 2003), *Macropus fuliginosus ocydromus* (MAYBERRY et al., 2014) e *Macropus parma*, criado em cativeiro (CRONSTEDT-FELL et al., 2012). Este último foi relatado como caso de neosporose em marsupial, o único caso dessa doença vista em marsupial.

No Brasil, alguns estudos identificaram a presença de DNA de *T. gondii* em *Necromys lasiurus*, *Trichomys aperioides* (FOURNIER et al., 2014), entre os marsupiais *Didelphis albiventris* (FORNAZARI et al., 2011; FOURNIER et al., 2014), *Didelphis aurita* (PENA et al., 2011).

Devido a atividade predatória de felídeos e canídeos aos pequenos mamíferos, os roedores e marsupiais desempenham um papel importante no ciclo de vida de agentes parasitários, sendo responsáveis pela transmissão do parasita aos seus hospedeiros definitivos, (MÜLLER; HOWARD, 2016). Estudos de hábito alimentar de gatos selvagens sugerem que os roedores compreendem cerca de dois terços das presas consumidas, no entanto isso pode variar de acordo com a estação do ano, abundância de roedores, espécies de felinos, e da disponibilidade de outras presas (RENDÓN-FRANCO et al., 2014). Animais de vida livre, podem ser utilizados como sentinelas ambientais para *T. gondii*, já que eles são expostos, sem nenhuma proteção, a todas as formas infectantes do parasita (MURADIAN et al., 2012).

4 DETECÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* em MARSUPIAIS E ROEDORES SILVESTRES NA MESOREGIÃO SUL BAIANO

4.1 INTRODUÇÃO

As relações ecológicas, decorridas na natureza, visam o equilíbrio de ecossistemas, contudo podem apresentar-se positiva ou negativamente entre os indivíduos que os compõem (MORAES et al., 2010).

Alguns protozoários do filo Apicomplexa apresentam relevância para a saúde pública por exibir caráter zoonótico e/ou causar grandes perdas econômicas para pecuária (SHIRLEY et al., 2007; BECK et al., 2009). *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* são espécies pertencentes a este Filo, com morfologia semelhante, mas biologicamente apresentam algumas diferenças, essencialmente quanto ao hospedeiro definitivo, onde *N. caninum* utilizam os canídeos e *T. gondii* os felídeos. Ambos os parasitos são responsáveis por enfermidades neurológicas e reprodutivas aos seus hospedeiros (LAGONI et al., 2012; CAMILO et al., 2015).

Estes coccídios parasitam, como hospedeiro intermediários, uma grande variedade de animais homeotérmicos, sendo possível infectar tantos os animais domésticos quanto os silvestres (MCALLISTER et al., 1998; GONDIM et al., 2004; DUBEY; SCHARES, 2011).

Os estágios infectantes de ambos os parasitas são os esporozoítos presentes nos oocistos esporulados, o que caracteriza a forma com resistência ambiental; os taquizoítos, forma celular com rápido metabolismo; e os bradizoítos forma de metabolismo lento, contidos no cisto tecidual (DUBEY, 2006). As diferenças entre esses estágios em ambos os parasitas são bastante sutis podendo ser observada na sua ultraestrutura (LINDSAY et al., 1999). Animais carnívoros infectam-se ao ingerir carne contaminada, devido aos hábitos predatórios ou hábitos detritívoros, e entre os animais herbívoros a transmissão ocorre pela ingestão de oocistos presentes na vegetação ou em alimentos, solo e água contaminados (CRAEYE et al., 2011; REZENDE-GONDIM et al., 2017).

A principal fonte de infecção para os hospedeiros definitivos é através das suas presas (roedores e pequenos mamíferos) que podem conter cistos teciduais. Essas presas

contribuem na disseminação da infecção entre animais domésticos carnívoros e onívoros, como também, para os animais silvestres (MACHACOVÁ et al., 2016). De acordo com Epstein e colaboradores (1997), os pequenos roedores e os marsupiais são bons indicadores ambientais devido ao ciclo de vida curto, populações numerosas em todos os biomas, modificados ou não, e ademais por serem presas para animais carnívoros.

As interferências constantes das atividades humana no meio ambiente promovem danos difíceis de serem recuperados o que fomenta a perda ou redução de hábitat de espécies silvestres o que leva ao desequilíbrio, com diminuição de populações da fauna e da flora, até casos de extinção, e também à seleção de espécies sinantrópicas que podem servir de interseção entre os animais silvestres e os humanos (VITALIANO, 2014a). Essa aproximação dos humanos, animais domésticos com os animais silvestres possibilita maior permuta de patógenos entre eles.

Técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) são ferramentas de monitoração de populações parasitárias importantes para ensaios experimentais promovendo parâmetros de estudo sobre a distribuição ambiental desses agentes o que possibilita melhor entendimento sobre as semelhanças na biologia básica e padrões da doença e via de transmissão dos parasitos (BECK et al., 2009).

Após a contextualização supracitada e de acordo com Thompson e colaboradores (2013) é necessário entender melhor os fatores que possibilitam a transmissão de infecções entre humanos e animais silvestres e quais deles podem levar a surto epidemiológicos. Devido à escassez de informações frente a grande biodiversidade presente na natureza objetivou-se investigar a presença de DNA de *T. gondii* e *N. caninum* em tecidos de pequenos roedores e marsupiais capturados em áreas de Mata Atlântica e Agroflorestas de cacau (cabruca), localizadas em cidades da mesorregião do sul Baiano.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Protocolo de eutanásia e CEUA

Os procedimentos para coletas dos exemplares foram realizados de acordo como Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em animais seguindo os princípios éticos do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013).

A coleta foi autorizada através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número 17131-4 e, pelo Conselho de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz - CEUA – UESC (Processo N° 003/2013). Os indivíduos coletados foram taxidermizados, tombados e depositados na Coleção de Mamíferos Alexandre Rodrigues Ferreira (CMARF-UESC).

4.2.2 Local de estudo

A pesquisa foi realizada entre os anos de 2015 a 2017 e foram capturados 323 animais entre pequenos roedores e marsupiais em 15 áreas florestais distribuídas em quatro municípios da região Sul do Estado da Bahia. Foram seis áreas de Mata Atlântica nos municípios de Una: uma Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN) Nova Angélica (15°14'59.0"S 39°04'41.0"W), Fazenda Cariri (15°09'57.8"S 39°13'10.1"W), Fazenda Faraó (15°20'53.0"S 39°02'43.5"W), Fazenda Colônia de Una (15°14'53.1"S 39°09'34.3"W), Fazenda Juerana (15°12'35.9"S 39°08'37.4"W) e Fazenda Nasha (15°16'54.5"S 39°10'54.2"W); três áreas em Mascote: Fazenda Juazeiro (15°42'53.6"S 39°21'52.6"W), Fazenda Sempre Viva (15°43'40.9"S 39°22'56.7"W) e Fazenda Lagoa Pequena (15°48'01.9"S 39°30'23.8"W); e duas áreas no município de Belmonte: Fazenda Boca do córrego (15°54'03.0"S 39°13'40.4"W) e Fazenda Ouro Verde (15°53'40.4"S 39°14'19.2"W).

Ademais, também foram realizadas amostragens em áreas de agroflorestas de cacau (Cabruca) localizadas na zona rural da cidade de Ilhéus: Fazenda Açude (14°45'04.0"S 39°11'51.2"W), Fazenda Camboa (14°38'15.8"S 39°12'02.3"W), Fazenda Feliz Vitória (14°42'11.2"S 39°15'34.8"W) e no interior do campus da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (14°47'39.0"S 39°10'20.7"W). Todas as áreas foram georreferenciadas com o Sistema de Posicionamento Global (GPS).

4.2.3 Coleta de amostras

Para a coleta dos animais foram utilizadas armadilhas de captura viva, modelos *Sherman*, *Tomahawk* (Figura 5) e armadilhas de queda *Pitfall* (Figura 6), colocadas em transectos e dispostas no solo e no sub-bosque (entre 1,5 e 2m), contendo iscas compostas de mistura de fubá, banana, creme de amendoim e óleo de fígado de bacalhau. As áreas foram divididas em três parcelas, em cada parcela foi estabelecido duas linhas de 100m, com distância entre estas de 30m. Cada linha continha seis estações separadas por 20m de distância, e em cada estação foi disposto uma armadilha *Sherman* e uma *Tomahawk*, em alturas diferentes, totalizando 24 armadilhas por parcela e 72 no total (Figura 7).



Figura 5. Disposição de armadilhas *Sherman* e *Tomahawk* em um ponto de captura (A) Indivíduo da espécie *Marmosa murina* capturado em armadilha *Tomahawk* sub-bosque (B).
Fonte: (A) Brito Junior, 2017; (B) Arquivo pessoal



Figura 6. Armadilha de queda (*Pitfall trap*).
Fonte: Brito Junior, 2017.

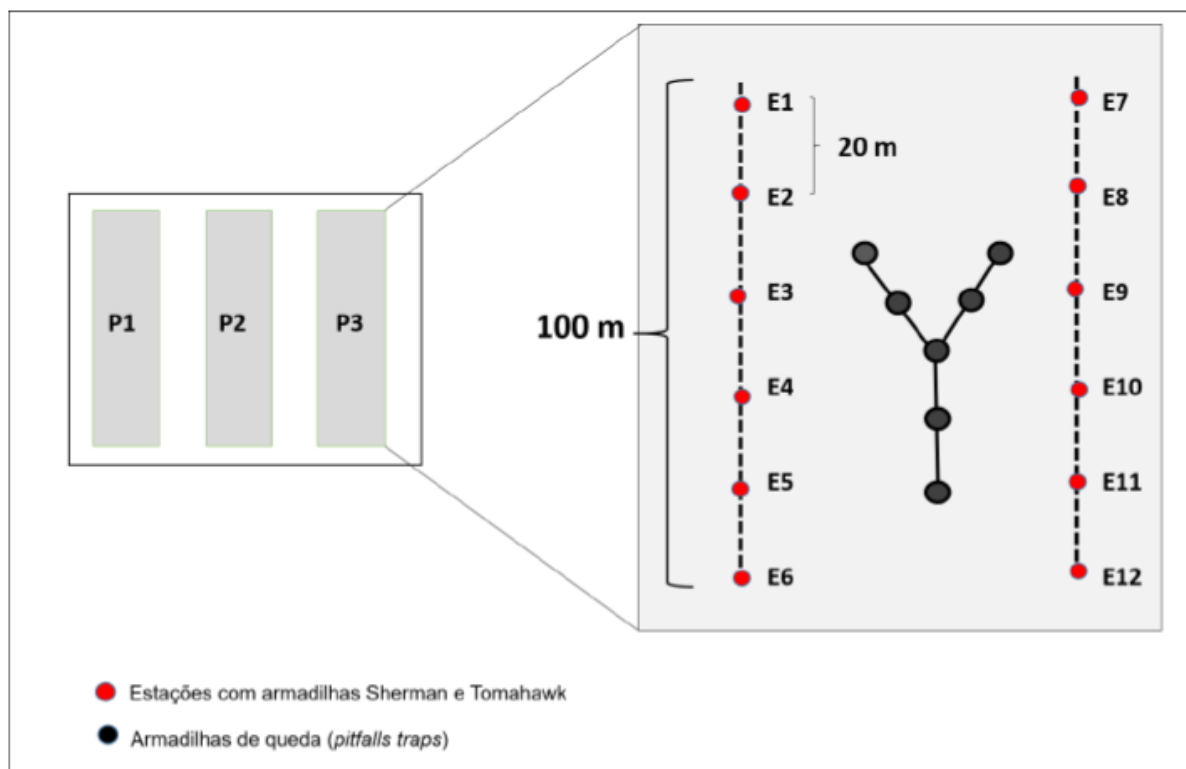


Figura 7. Desenho esquemático da disposição de armadilhas nas áreas de captura.
 Fonte: Brito Júnior, 2017.

As armadilhas permaneceram ativas por dez noites consecutivas nas cidades de Una, Belmonte e em Ilhéus e por 3 dias consecutivos no município de Mascote. Os pequenos mamíferos capturados foram identificados quanto a espécie, sexo e idade. A eutanásia foi realizada por administração de Cloridrato Xilazina, na dose de 10mg/kg e Cloridrato de Quetamina, na dose de 100mg/kg, como descrito no Manual de Trabalho de campo da Fundação Oswaldo Cruz (LEMOS; D' ANDREA, 2014).

A coleta de fêmeas gestantes e lactantes, como também, de animais jovens foi evitada e quando estes, por ventura, eram capturados, foram marcados com um brinco e libertados nos locais de sua captura.

Durante a taxidermia dos espécimes eutanasiados foram coletados de cada animal seus órgãos (cérebro, coração, diafragma, pulmão, fígado, baço e rins) esses foram acondicionados em micro tubos plásticos e congelados.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Parasitologia Veterinária na (UESC), onde foram acondicionados em freezer -20°C . Os indivíduos coletados

foram tombados e depositados na Coleção de Mamíferos Alexandre Rodrigues Ferreira (CMARF-UDESC).

4.2.4 Extração de DNA

Previamente a extração do DNA os tecidos foram reunidos, formando *pools* de 25mg como sugerido no manual do kit comercial de extração. Cada *pool* contendo um fragmento de cérebro, coração, diafragma, pulmão, fígado, baço e rins, esses foram macerados, com auxílio de um cadinho e um pistilo, e embebidos em nitrogênio líquido. E, em seguida foi utilizado o Kit de extração de DNA *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen®).

4.2.5 Amplificação de DNA de *Toxoplasma gondii* por PCR

A amplificação de DNA de *T. gondii* foi realizada utilizando os *primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) (HOMAN et al., 2000), que resultou em um fragmento com 529 bp (Genbank N0 AFI46527). O volume total da reação foi 25µL contendo 1X tampão de PCR Tris HCl (pH 8,0), 2mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 0,10µM cada *primer* (forward e reverse), 0.5U Taq DNA polimerase Platinum®, 1.5µL de DNA extraído e para completar o volume água destilada. A reação foi feita em 37 ciclos, que ocorreram nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguindo de 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 2% sob luz violeta, corados com SYBR® Safe e foto documentados (Figura 8).

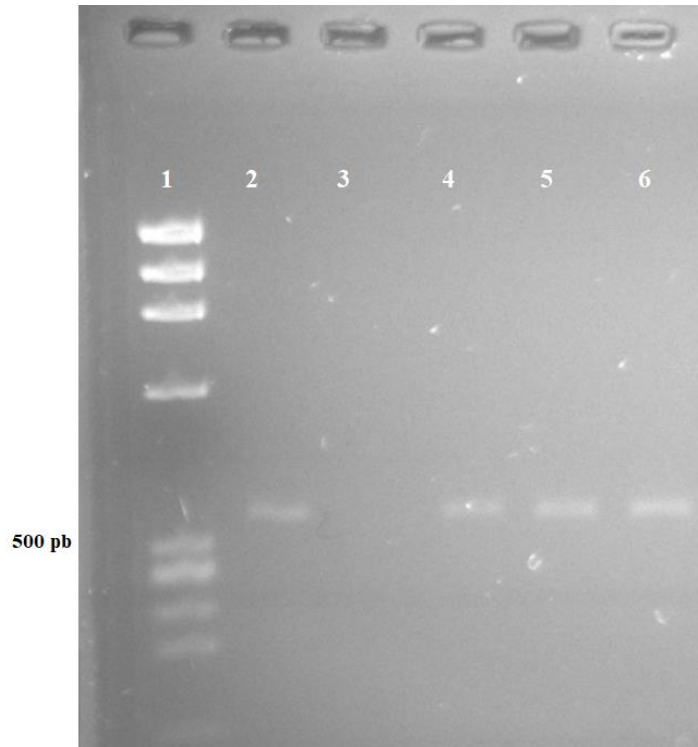


Figura 8. Amplificação da PCR de *Toxoplasma gondii* em gel de agarose a 2%. 1 Marcador 1kb Plus; 2 Controle positivo (cepa RH); 3 Controle negativo; 4, 5 e 6 Amostras positivas.

Fonte: Arquivo pessoal

4.2.6 Amplificação de DNA de *Neospora caninum* por PCR

A amplificação de DNA de *N. caninum* será realizada utilizando os *primers* Np21 (CCCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC) e Np6 (CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT) (YAMAGE et al., 1996), que resultou em um fragmento com 329 bp (Genbank N0 AH012052). O volume total da reação foi 25 μ L contendo 1X tampão de PCR Tris HCl (pH 8,0), 2mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs (2,5mM), 0,15 μ M cada *primer* (forward e reverse), 5U Taq DNA polimerase Platinum®, 5,0 μ L de DNA extraído e para completar o volume água destilada. A reação foi feita em 37 ciclos, que ocorreram nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguindo de 1 ciclo final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose a 2% sob luz violeta, corados com SYBR® Safe e foto documentados (Figura 9).

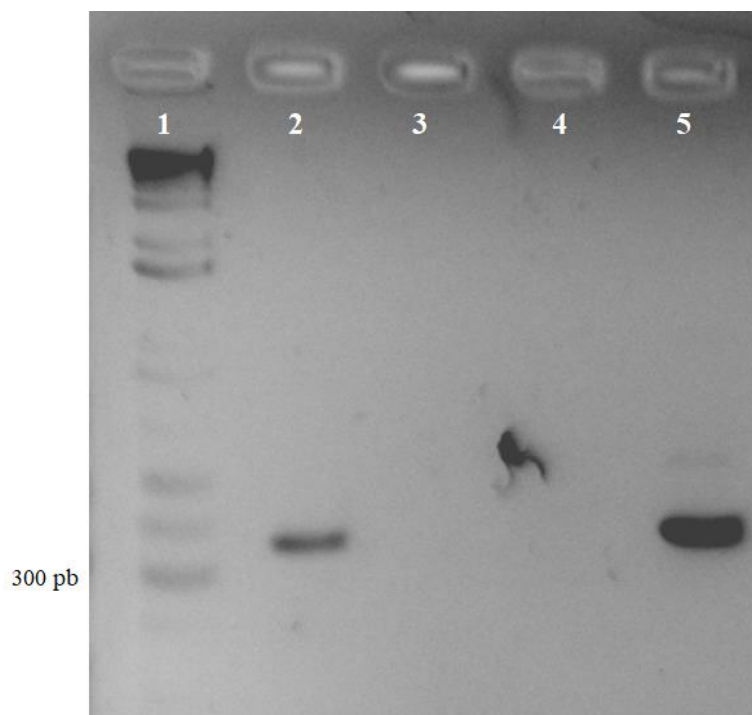


Figura 9. Amplificação da PCR de *Neospora caninum* em gel de agarose a 2%. 1 Marcador 1kb Plus; 2 Controle positivo (NC-Bahia); 3 Controle Negativo; 4 Amostra negativa; 5 Amostra positiva.

Fonte: Arquivo pessoal

4.2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas da associação do resultado molecular com as variáveis sexo e áreas de captura (cabruca e mata), foram calculadas pelo teste Exato de Fisher com intervalos de confiança de 95% utilizando o software Epi Info™ 7.2.0.1 (Center for Diseases Control and Prevention, USA).

4.3 RESULTADOS

Neste estudo foram capturados 18 gêneros de pequenos mamíferos: 13 pertencentes ao grupo de pequenos roedores e 6 pertencentes ao grupo de marsupiais. O que totalizou, respectivamente, a captura de 235 (72,75%) e 88 (27,24%). Não foi possível identificar a espécie de 3 gêneros de roedores.

Das áreas estudadas, a região de Ilhéus foi a que apresentou maior número de animais capturados 47,36% (153/323), seguida da região de Una 30,95% (100/323), da região de Belmonte 15,17% (49/323) e, por fim, da região de Mascote 6,50% (21/323) (Tabela 1).

Dentre os fragmentos estudados, as áreas de Mata Atlântica totalizaram a captura de 52,63% (170/323) de animais, o que foi mais frequente do que o número de animais capturados na região de Cabruca 43,36% (153/323). Contudo, a região de Cabruca teve maior frequência de capturas de roedores 54,89% (129/235) do que nas capturas realizada nas áreas de Mata Atlântica 45,10% (106/235). Já os marsupiais foram mais frequentes nas áreas de Mata Atlântica 72,72% (64/88) do que nas áreas de Cabruca 27,27% (24/88) (Tabela 2).

Do total de animais capturados 39,93% (129/323) foram fêmeas e 60,06% (194/323) foram machos. Dentre os roedores 60% (141/235) foram do sexo masculino e 40% (94/235) foram do sexo feminino. Entre os marsupiais foram capturados 60,22% (53/88) de machos e 39,77% (35/88) de fêmeas (Tabela 3).

A detecção molecular dos agentes etiológicos estudados resultou no total de 4,33% (14 de 323) de animais positivos para a presença de DNA dos agentes *T. gondii* e *N. caninum* encontrados nos tecidos desses indivíduos. Não foi encontrado em nenhum tecido analisado a presença de ambos parasitas concomitantemente.

A análise realizada para a identificação de DNA de *Toxoplasma gondii* em tecidos detectou em 1,24% (4/323) dos animais a presença de DNA do agente. Entre os 4 animais positivos, 3 eram roedores machos das espécies: *Hylaeamys laticeps*, *Oligoryzomys nigripes* e *Thaptomys nigrita*; e 1 marsupial macho da espécie *Marmosa demerarae*.

Tabela 1. Característica de pequenos mamíferos utilizados para detecção de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* por PCR.

Espécies	Localização				Número examinados	Número positivos
	Belmonte	Ilhéus	Mascote	Una		
Pequenos Roedores						
<i>Akodon cursor</i>	1	26	1	-	28	-
<i>Blarinomys breviceps</i>	-	-	-	1	1	-
<i>Calomys sp.</i>	-	-	2	-	2	-
<i>Cerradomys subflavus</i>	-	-	1	-	1	-
<i>Euryoryzomys sp.</i>	1	3	-	-	4	-
<i>Guerlinguetus sp.</i>	2	-	-	-	2	-
<i>Hylaeamys laticeps</i>	26	67	1	45	139	9
<i>Nectomys squamipes</i>	-	4	-	-	4	-
<i>Necomys lasiurus</i>	-	1	1	1	3	-
<i>Oecomys catharinae</i>	1	-	-	3	4	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	-	8	1	3	12	1
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	2	14	2	3	21	-
<i>Thaptomys nigrita</i>	3	6	-	5	14	2
Total	36	129	9	61	235	12
Marsupiais						
<i>Didelphis aurita</i>	-	2	1	5	8	-
<i>Gracilinanus agilis</i>	2	-	3	-	5	-
<i>Marmosa demerarae</i>	-	-	-	9	9	1
<i>Marmosa murina</i>	6	19	4	19	48	-
<i>Marmosops incanus</i>	1	-	4	-	5	-
<i>Monodelphis americana</i>	4	3	-	6	13	1
Total	13	24	12	39	88	2

Já na análise realizada para identificação de DNA de *Neospora caninum* em tecidos detectou em 10 de 323 animais (3,09%) a presença de DNA desse agente, destas amostras 9 foram roedores e 1 de marsupial. Entre os roedores foram 4 machos da espécie *Hylaeamys laticeps* positivos e 5 fêmeas, sendo que 4 eram da espécie *Hylaeamys laticeps* e 1 da espécie *Thaptomys nigrita*. Em marsupiais foi detectado em um macho da espécie *Monodelphis americana* (Tabela 1).

Em relação a presença de DNA dos parasitas avaliados e as áreas onde os animais positivos foram capturados, 64,28% (9/14) foram animais de áreas de Cabruca, enquanto

35,71% (5/14) foram de áreas de Mata Atlântica. Dentre os positivos para *T. gondii* 50% foram de animais providos de áreas de Cabruca. E, dentre os positivos para *N. caninum* 70% foram providos de áreas de Cabruca.

Tabela 2. Relação entre área de captura, ordem de indivíduos capturados e presença de DNA de parasitas.

Ordem \ Área de captura	Mata Atlântica	Cabruca
Roedores	106/235 1 + DNA <i>T. gondii</i> 2 + DNA <i>N. caninum</i>	129/235 2 + DNA <i>T. gondii</i> 7 + DNA <i>N. caninum</i>
Marsupiais	64/88 1+ DNA <i>T. gondii</i> 1+ DNA <i>N. caninum</i>	24/88
Total	170/323	153/323

Nota: Nota: (+) - amostra positiva para DNA do parasito. pvalor para *T. gondii*=0,99 e *N. caninum*=0,25

Tabela 3. Relação entre as espécies capturadas e o sexo.

Roedores	Fêmea	Macho
<i>Akodon cursor</i>	11	17
<i>Blarinomys breviceps</i>	-	1
<i>Calomys</i> sp.	1	1
<i>Cerradomys subflavus</i>	1	-
<i>Euryoryzomys</i> sp.	2	2
<i>Guerlinguetus</i> sp.	-	2
<i>Hylaeamys laticeps</i>	56	83
<i>Necomys lasiurus</i>	-	3
<i>Nectomys squamipes</i>	-	4
<i>Oecomys catharinae</i>	2	2
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3	9
<i>Rhipidomys mastacalis</i>	12	9
<i>Thaptomys nigrita</i>	6	8
Total	94	141
Marsupiais	Fêmea	Macho
<i>Didelphis aurita</i>	5	3
<i>Gracilinanus agilis</i>	1	4
<i>Marmosa demerarae</i>	4	5
<i>Marmosa murina</i>	18	30
<i>Marmosops incanus</i>	3	2
<i>Monodelphis americana</i>	4	9
Total	35	53

Nota: pvalor *T.gondii*=0,25 e *N. caninum*=0,33

Não houve diferença estatística entre a infecção, a área de captura e o sexo dos animais.

4.4 DISCUSSÃO

Esse foi o primeiro estudo de detecção molecular que avaliou a presença, de ambos protozoários, *T. gondii* e *N. caninum* em pequenos roedores e marsupiais realizado na mesorregião Sul Baiano. E a presença destes protozoários no ambiente silvestres reafirma a capacidade adaptativa desses agentes em diferentes ambientes e espécies hospedeiras.

Nesse estudo foi encontrado a prevalência de 4,33% da presença desses agentes etiológicos entre a população amostral. Durante a pesquisa foi possível observar a presença de cães e gatos ao redor e dentro dos fragmentos de mata estudados, visto que estes são, respectivamente, os hospedeiros definitivos de *N. caninum* e *T. gondii*, fator primordial para a reprodução sexuada que resulta na formação de oocistos, estágio contaminante ambiental destes agentes, é um fato relevante para a manutenção do ciclo silvestre. (HILL et al., 2001; DUBEY, 2002; DONAHOE et al., 2015).

Adicionalmente, apenas com a reprodução sexuada, há combinação de gametas possibilitando uma variedade genética que pode produzir linhagens mais virulentas desses parasitos, contudo, faz-se necessário estudos posteriores para avaliar as linhagens presentes nos indivíduos estudados.

Áreas de Cabruca, ambiente de cultura de cacau em meio à Mata Atlântica, recebe um maior contato com as atividades dos seres humanos. Essa área teve maior quantidade de animais positivos 64,28% (9/14) para um dos parasitas, dentre os positivos para *T. gondii* 50% (2/4) foram capturados nas áreas de Cabruca e dentre os positivos para *N. caninum* 70% foram de áreas de Cabruca, o que pode ser justificada por este ambiente ser mais antropizado, (BIDAISEE; MACPHERSON, 2014; ZANELLA, 2016), porém não apresentou diferença estatística. A ausência de significância pode estar relacionada ao pequeno número de animais positivos.

Previamente, foi realizado um estudo sorológico para *T. gondii* na mesma região com prevalência de 4,65% de roedores e 15,71% de marsupiais positivos para anticorpos anti-*T.gondii* em uma amostra de 242 animais (BRITO JUNIOR, 2017) o que demonstra uma baixa positividade nesta região.

Alguns trabalhos realizados em outros países utilizando técnicas de detecção molecular mostram diferentes resultados. Machacová e colaboradores (2016) detectou

a presença de DNA de *T. gondii* em 0,7% de pequenos mamíferos, enquanto que não foi evidenciado presença de DNA de *N. caninum* em nenhuma amostra. No estudo de Meeburg et al. (2012) detectaram a presença de DNA de *T. gondii* e *N. caninum* em, respectivamente, 4% e 12,4% dos animais avaliados. Contudo, neste último estudo foram avaliados animais coletados próximos a área com fazendas, similar a maioria das áreas avaliadas neste estudo.

Essa probabilidade de maior presença dos patógenos em áreas próximas de criações de animais ou áreas urbanas corrobora a literatura que menciona o papel dos roedores selvagens e domésticos como elementos importantes do ciclo silvestre desses patógenos que provavelmente se infectam através de oocistos liberados no ambiente por canídeos ou felídeos que se infectaram ao comer carcaça, resto de aborto ou as próprias presas (KIJLSTRA et al., 2008).

Sabe-se, também que os roedores são cosmopolitas e adaptam-se a áreas urbanas, rurais e silvestres (MARSHALL et al., 2004; HUGHES et al., 2006). Também já foi mencionado que a destruição de regiões florestais para a prática de atividades humanas aumenta o risco de transmissão para animais domésticos e humanos (VITALIANO et al., 2014b).

Animais com hábitos terrestres ficam mais suscetíveis à infecção por oocistos presentes no solo ou em água contaminada (KIJLSTRA et al., 2008). De acordo com De Thoisy e colaboradores (2003) os mamíferos terrestres são mais expostos aos parasitas do que aqueles com hábitos arborícolas. Neste estudo as espécies de roedores que apresentaram DNA para *T. gondii* e *N. caninum* são de hábito terrestre. Já a infecção nos marsupiais pode ocorrer devido aos seus hábitos alimentares, dieta principalmente onívora, facilitando a infecção por via oral (FERRARONI; MARZOCHI, 1980). Os roedores infectados com *T.gondii* ou *N. caninum* são considerados importantes na epidemiologia da infecção, pois podem servir como reservatórios de infecção para suínos, cães e principalmente para felinos domésticos e silvestres (DUBEY; FRENKEL, 1998).

Infecções concomitantes não foram detectadas neste estudo diferente do estudo de Meeburg et al., 2012 com 1,2% de detecção de ambos agentes. Com relação à co-infecção desses agentes etiológicos, Hughes e colaboradores (2006) avaliaram a taxa de

frequência de infecção de *T. gondii* e *N. caninum* em um mesmo indivíduo. Foram testadas 2 espécies de roedores, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, com ocorrência de 2% (2/100). Este estudo sugere que a co-infecção pode ser um evento aleatório, sem evidências conclusivas de associação específica.

4.5 CONCLUSÕES

Foram detectados os parasitas *N. caninum* e *T. gondii* em pequenos roedores e marsupiais em áreas de Mata Atlântica e Cabruca com a ocorrência de 3,09% e 1,24%, respectivamente. Os indivíduos provenientes das áreas de Cabruca apresentaram maior positividade para ambos agentes etiológicos do que aqueles providos das áreas de Mata Atlântica. Não foi encontrado infecção concomitante dos dois parasitas. Também não foi obtido relação entre o sexo e a infecção. É necessário estudos posteriores para identificar e caracterizar as cepas presentes neste ambiente e, assim, compreender melhor o ciclo silvestre desses agentes nessa região.

REFERÊNCIAS

- ALMERÍA, S. *Neospora caninum* and wildlife. International Scholarly Research Notices: **Parasitology**, v. 2031, p. 1-23, 2013.
- BARR, B. C. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v. 71, p. 236–242, 1994.
- BARRATT, J. et al. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, p. 228–233, 2008.
- BARRATT, J. L. et al. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology**, v. 23, p. 95–836, 2010.
- BECK, H. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 175-189, 2009.
- BIDAISEE, S.; MACPHERSON, C. N. L. et al. Zoonoses and health: a review of the literature. *Journal of Parasitology Research*, 2014
- BJERKAS, I. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, p. 271–274, 1984.
- BLADER, I. J.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii* Development of its Replicative Niche: in its Host cell and Beyond. **Journal American Society for Microbiology**, v. 13, p. 965-976, 2014.
- BONVICINO, C. R. et al. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa-OPAS/OMS, 2008.
- BRITO JUNIOR, P. A. Ocorrência DE *Toxoplasma gondii* em marsupiais e roedores silvestres na região Sul da Bahia. [Dissertação]. Ilhéus– Universidade Estadual de Santa Cruz, 2017.
- CAMILO, G. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 2, p. 263-265, 2015.
- CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais**. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária. 2013. 66p.

CHATTON, E.; BLANC, G. Notes et reflexions sur le toxoplasme and le toxoplasmose du gondi. (*Toxoplasma gondii* Ch. Nicolle et Manceaux 1909). **Les archives de l'Institut Pasteur Tunis**, v. 10, p. 1–41, 1917.

CONRAD, P.A. et al. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. **Parasitology** v. 106, n. 3, p. 239–249, 1993.

COSTA, K.S. et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.157-159, 2008.

CRONSTEDT-FELL et al. Neosporosis in a captive Parma wallaby (*Macropus parma*). **Journal Comparative Pathology**, v.146, p. 274–277, 2012.

CPLC. Comissão do Plano da Lavoura Cacaueira. **Manual do cacau Cabruca – Sistema Agrossilvicultural Tropical**. Ilhéus: Secretaria de Agricultura da Bahia. 2013. p. 4-8.

DE CRAEYE, S. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae? **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 64-69, 2011.

DE THOISY, B. et al. Ecologic Correlates of *Toxoplasma gondii* Exposure in Free-ranging Neotropical Mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 2, p. 456–459, abr. 2003.

DONAHOE, S. L. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and wildlife**, v.4, p. 216-238, 2015.

DUBEY, J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 192, p. 1269–1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.

DUBEY, J. P. et al. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **International Journal Parasitology**, v. 29, p. 1709–1711, 1999.

DUBEY, J. P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal Parasitology**, v. 32, p. 929–946, 2002.

DUBEY, J. P. Tachyzoite induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **Journal of Parasitology**, v. 88, n.4, p. 713-717, 2002.

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

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

DUBEY, J.P. Comparative infectivity of oocysts and bradizoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2006.

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

DUBEY, J. P. et al. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323–367, 2007.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

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

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

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

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, Toxoplasmosis and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 22, p. 645-671, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 90-108, 2011.

EPSTEIN, P. R. et al. Biodiversity and Infectious emerging diseases: Integrating health and ecosystem monitoring. In: Grifo F., Rosenthal J. (Eds.). **Biodiversity and Human Health**. Island Press., p. 60-86, 1997.

FALLAHI S. et al. Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. **Parasitology International**, v.63, p. 63:37–41, 2014.

FERGUSON, D. J. Use of molecular and ultrastructural to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **International Journal Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 347-360.

FERGUSON, D. J. P. Identification of fecal transmission of *Toxoplasma gondii*: Small Science large characters. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 871-875, 2009.

FERRARONI, J. J.; MARZOCHI, M. C. A. Prevalência da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em animais domésticos, silvestres e grupamentos humanos da Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 1-2, p. 99-109, 1980.

FERROGLIO, E. et al. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 346-349, 2007.

FOURNIER, G. F. S. R. et al. *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from forest fragments of the municipality of Natal, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.23, n. 4, p. 501-508, 2014.

FRENKEL, J. K. et al. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893–896, 1970.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 59, n. 3, 1973.

FUEHRER, H. P. et al. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). **Parasitology Research**, v. 107, p. 469–473, 2010.

HUGHES, J. M. et al. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, p. 29-36, 2006.

GENNARI, S. M. et al. *Toxoplasma gondii* antibodies in wild rodents and marsupials from the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 379–382, set. 2015.

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

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 6, p. 247-252, 2006.

HARTLEY, W. J.; MARSHALL, S. C. 1957. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal

mortality. N. Z. **Veterinary Journal**, v. 5, p. 119–124, 1957.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002.

HILL, D. et al. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples of experimentally infected dogs using the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Parasitology**, v. 87, n.2, p. 395-398, 2001.

HOMAN, W. L. et al. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnosis and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 69-75, 2000.

HUANG, C. C. 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Res.**, v. 35, p. 283–290, 2004.

HUGHES, J.M. et al. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, 29–36, p. 2006.

INNES, E.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. **Trends Parasitology**, v.18, p. 497–504, 2002.

JENKINS, M. C. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 161-165, 2007.

JONES, C. D. et al. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. **Investigation Ophthalmology Visual Science**, v. 41, p. 41:634–44, 2000.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.

JAKUBEK, E. B. et al. Potential application of serological tests on fluids from carcasses: detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Sarcoptes scabiei* in red foxes (*Vulpes vulpes*), **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, article 13, 2012.

KIJLSTRA, A. et al. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183-190, 2008.

KIM, J.H. et al. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in **Korean Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 147–154, 2000.

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

KOORIYAMA, T. et al. Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. **Primates**, v. 54, 89–98, 2013.

LAGONI, H. et al. Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* from dogs with neurological disorders. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 365-368, 2012.

LEFEVRE-PETTAZZONI, M. et al. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. **European Journal Clinic Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 687-693, 2006.

LEHMANN, T. et al. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 2, p. 135–141, jul. 2003.

LEMOS, E. R. S.; D'ANDREA, P. S. Trabalho de campo com Animais: procedimentos, riscos e biossegurança. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. 180p.

LINDSAY, D. S. et al. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1521-1523, 1999.

LIU, Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vectors**, v. 292, n. 8, p. 1-14, 2015.

LOBATO, J. S. D. A. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical Vaccine Immunology**, v.13, p. 84–89, 2006.

MACHACOVA, T. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild small mammals: Seroprevalence, DNA detection and genotyping. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 88-90, 2016.

MACPHEE, R. D. E.; GREENWOOD, A. D. 2013. Infectious disease, endangerment, and extinction. **International Journal Evolutionary Biology**, p. 1–9, 2013.

MARSHALL, P. A et al. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. **Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 39–42, 2004.

MARSH, A.E., et al. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol*, v. 84, n. 05, p. 983-991, 1998.

MCALLISTER, M. M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal Parasitology**, v. 28, 1473–1478, 1998.

MAYBERRY, C. Reproductive implications of exposure to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in western grey kangaroos (*Macropus fuliginosus ocydromus*). **Journal Wild. Disease**, v. 50, 364–368, 2014.

MEDINA-ESPARZA, L. et al., Frequency of infection by *Neospora caninum* in wild rodents associated with diary farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 11-14, 2013.

MEERBURG, B. G. et al. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. **Veterinary Parasitology**, v. 184, p. 317-320, 2012.

MÜLLER, U. B.; HOWARD, J. C. The impact of *Toxoplasma gondii* on the mammalian genome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 19–25, 2016.

MURADIAN, V. et al. A Survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Infection in Urban Rodents from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 128–134, 2012.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection á corp de Leishman (ou organisms voisins) du gondii. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academic des Sciences**, v. 147, p. 763–766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gundi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academic des Sciences**, v. 148, p. 369–372, 1909.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia. In:_____. REIS, N. R. et al. Mamíferos do Brasil. 2ª ed. Londrina, 2011. Cap. 12, p. 358-414.

PENA, H. F. J. et al. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 377-381, 2011.

PINTO, L. P. et al. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um hotspot mundial. **Biologia da Conservação: essências. RiMa, São Carlos, Brasil**, p. 69-96, 2006.

RENDÓN-FRANCO, E. et al. Toxoplasmosis seroprevalence in wild small rodents, potentially preys of ocelots in north-eastern México. **Parasite**, v. 21, 2014.

REZENDE-GONDIM, M. M. et al., In contrast to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* tachyzoites did not sustain multiplication *in vitro* at increased incubation temperatures. *Veterinary Parasitology*, v. 234, p. 19-24, 2017.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 42, p. 1141-1153, 2009.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: A shrinking biodiversity hotspot. F.E. Zachos Habel. **Biodiversity Hotspots Springer**, 2011.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. **Journals American Society for Microbiology**, p. 264-296, 2012.

ROSSI, R. V.; BIANCONI, G. V. Ordem Didelphimorphia. In:_____. REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. 2ª ed. Londrina, 2011. Cap. 1, p. 31-60.

SALGADO, A. C. et al. Percepção dos funcionários residentes no Parque Estadual Alberto Löfgren sobre o conceito de posse responsável. **IF Série Registros**, v. 31, p. 107-111, 2007.

SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453–61, 2014.

SHIRLEY, M.W. et al. Challenges in the successful control of the avian coccidia. **Vaccine**, v. 25, p. 5540–5547, 2007.

SIBLEY, L. D. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, S. P. Anticorpos IgG anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas no estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 5, p. 443-446, 2010.

SPLENDRE, A. Um novo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche de'une malattia Che ricorda in molti punti Il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. **Revista da Sociedade de Ciências de São Paulo**, v. 3, p. 109–112, 1908.

TIDY, A. Seroepidemiology and risk assessment of *Toxoplasma gondii* infection in captive wild birds and mammals in two zoos in the North of Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 235, p. 47-52, 2017.

TRANAS, J. et al. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinic Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, p. 765–767, 1999.

THOMASSON, D. et al. Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. **Parasitology**, v. 138, p. 1117–1123, 2011.

THOMPSON, R. C. A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 1079–1088, 2013.

TRUPPEL, J. H. et al. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. *Parasitology International*, v. 59, p. 376–379, 2010.

VALADAS, S. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Sarcocystis neurona*, and *Neospora caninum* in capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, from Sao Paulo State, **Brazilian Journal Parasitology**, v. 96, p. 521–524, 2010.

VITALIANO, S. N. et al. Experimental infection of Crested Caracara (*Caracara plancus*) with *Toxoplasma gondii* simulating natural conditions. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 71-75, 2010.

VITALIANO, S. N. et al. Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. **Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 45, p. 197–9, 2014a.

VITALIANO, S. N. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian Wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 276-283, 2014b.

WAPENAAR, W. et al., “Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle,”. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 166–173, 2007.

YAI, L. E. O. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 870-871, 2003.

YAI, L.E. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Sao Paulo State, *Brazilian Journal Parasitology*, v. 94, p. 766, 2008.

YAMAGE, M. et al. *Neospora caninum*: Specific Oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of Experimentally infected nude mice by the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Parasitology*, v.82, n.2, p. 272-279, 1996.

YAN, C. et al. Impacto f environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and vectors**, v.137, n. 9, p. 1-7, 2016.

ZANELLA, J. R. C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para a saúde e produção animal. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.51, n. 5, p. 510-519, 2016.

ANEXO A – Espécies de roedores e marsupiais capturados na região Sul da Bahia. 2015-2017.

1 MARSUPIAIS



Figura 1 – *Didelphis aurita*. Fonte: Rossi e Bianconi (2011).



Figura 2 – *Gracilinanus agilis*. Fonte: Brito Junior (2017).



Figura 3 – *Marmosa murina*. Fonte: Rossi e Bianconi (2011).



Figura 4 – *Marmosops incanus*. Fonte: Estavillo (2012).

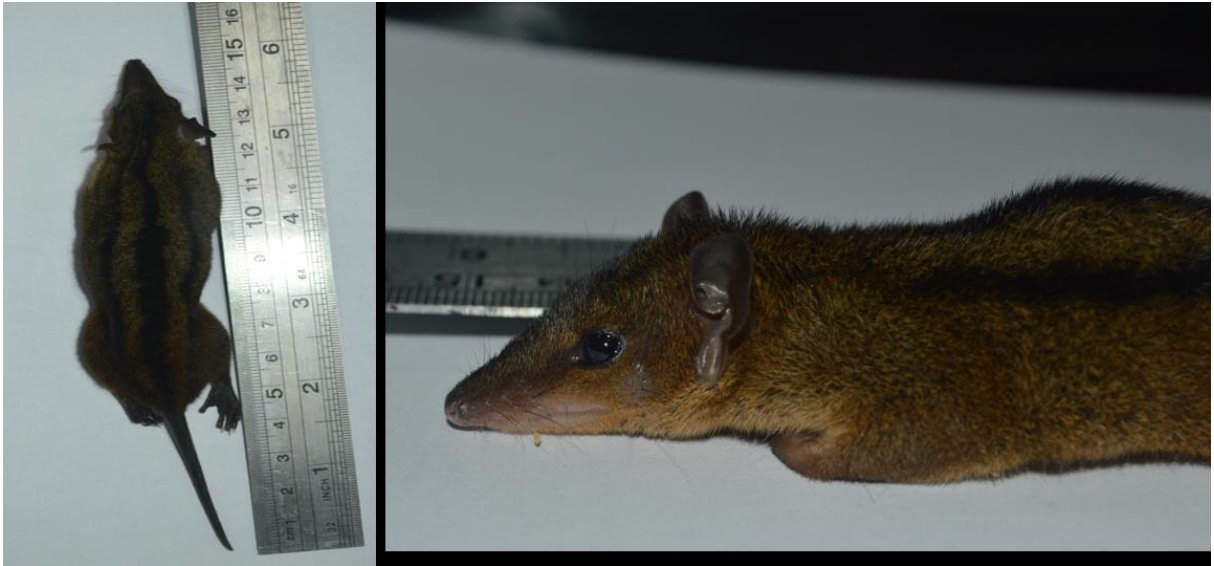


Figura 5 – *Monodelphis americana*. Fonte: Brito Junior (2017).

2 ROEDORES



Figura 6 – *Akodon cursor*. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 7 – *Blarinomys breviceps*. Fonte: Brito Junior (2017).



Figura 8 – *Cerradomys subflavus*. Fonte: Bonvicino e colaboradores (2008).

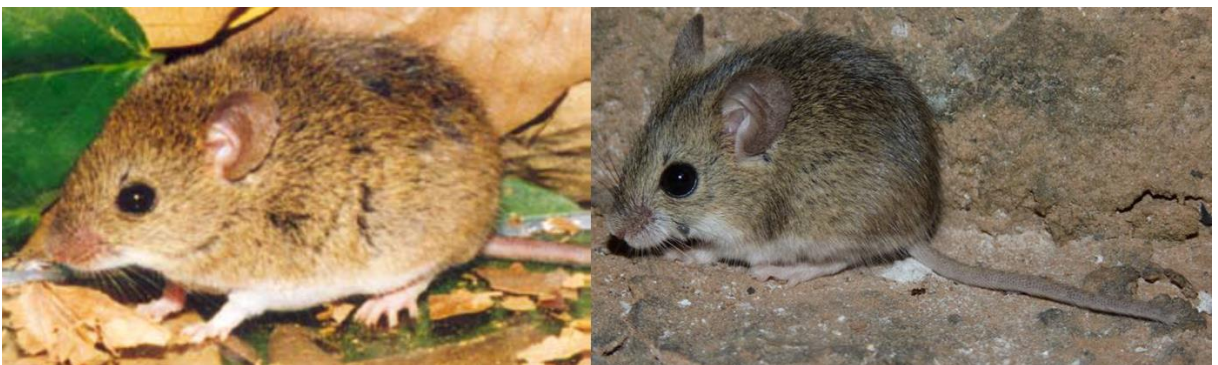


Figura 9 – *Calomys spp.* Fonte: Bonvicino e colaboradores (2008).



Figura 10 – *Euryoryzomys russatus*. Fonte: Oliveira e Bonvicino (2011).



Figura 11 – *Guerlinguetus ingrami*. Fonte: A, B – Brito Júnior (2017); C- Bonvicino e colaboradores (2008).



Figura 12 – *Hylaeamys laticeps*. Fonte: Brito Junior (2017).



Figura 13 – *Nectomys squamipes*. Fonte: Bonvicino e colaboradores (2008).



Figura 14 – *Necromys lasiurus*. Fonte: Oliveira e Bonvicino (2011).



Figura 15 - *Oecomys catherinae*. Fonte: Bonvicino e colaboradores (2008).



Figura 16- *Oligoryzomys* sp. Fonte: Oliveira e Bonvicino (2011).



Figura 17 - *Rhipidomys* sp. Fonte: Oliveira e Bonvicino (2011).



Figura 18 - *Thaptomys nigrita*. Fonte: Oliveira e Bonvicino (2011).

ANEXO B – Normas de publicação artigo da revista *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*

- Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral.
- Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.
- Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente.
- Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte “Times New Roman”, tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas.
- Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões (ou combinação destes três últimos), Agradecimentos (facultativo) e Referências Bibliográficas.
- O título e o subtítulo (se houver) não devem exceder 18 palavras.
- “Abstract” e Resumo devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas.
- As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).
- A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras "a", "b", "c", etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>