



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

**OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR
Toxoplasma gondii EM COELHOS DOMÉSTICOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

DÉBORA COSTA VIEGAS DE LIMA

Recife, 2015



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

**OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR
Toxoplasma gondii EM COELHOS DOMÉSTICOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

DÉBORA COSTA VIEGAS DE LIMA

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

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

Recife, 2015

Ficha catalográfica

L732o Lima, Débora Costa Viegas de
Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por
Toxoplasma gondii em coelhos domésticos no Estado de
Pernambuco, Brasil / Débora Costa Viegas de Lima. – Recife,
2015.

72 f. : il.

Orientador(a): Rinaldo Aparecido Mota.

Dissertação (Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife,
2015.

Inclui anexo(s) e referências.

1. Coelho 2. MAT 3. PCR 4. Toxoplasmose 5. Saúde
pública I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador II. Título

CDD 636.089

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

**OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR
Toxoplasma gondii EM COELHOS DOMÉSTICOS NO ESTADO DE
PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação de Mestrado elaborada por

DÉBORA COSTA VIEGAS DE LIMA

Local da defesa: Auditório da PRPPG / UFRPE

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dr^a. Débora Rochelly Alves Ferreira

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof^a. Dra^a. Flaviana Santos Wanderley

Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

Dr. Mauro José Gonçalves Bezerra

Médico Veterinário da Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste - SUDENE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Geraldo José Viegas de Lima Filho e
Cleide de Paula Costa Lima, por terem me dado
tudo, me encorajado e apoiado em todas as minhas
escolhas. Vocês são eternos em meu coração e serão
sempre um exemplo de amor e perseverança para
mim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha família, capacidade, oportunidades e força para nunca desistir dos meus sonhos.

À minha mãe, Cleide, e meu pai, Geraldo, que sempre me incentivaram e me apoiaram durante esta jornada e em todas as outras etapas da minha vida. Agradeço infinitamente por tudo que fizeram e o amor que têm por mim.

À todos os meus tios, tias, primos, primas, avôs (*in memoriam*), avós e ao meu irmão, Pedro, por sermos uma família sempre unida, pelo apoio e ajuda nos momentos em que precisei.

Ao meu namorado, William (finho) por sempre me apoiar, entender meus dias de estresses e dificuldades, pelas caronas, companhia e principalmente por ter me feito sorrir quando mais precisava.

À minha cachorrinha Fannie (*in memoriam*), minha companheira de tantos anos que me ensinou o que é o amor pelos animais e foi de fundamental importância para minha escolha profissional.

Ao professor Rinaldo Mota que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica, pela orientação em todas as etapas da residência médica e do mestrado, pelos conselhos e experiências. Agradeço por ser um real “Professor orientador”.

Aos professores que destinaram parte do tempo para auxiliar em minha pesquisa. Ao professor Wilton Júnior pela co-orientação e ajuda com os cálculos estatísticos; aos professores Andréa Alice, Fernando Leandro e Márcia de Figueiredo pela ajuda com as análises histopatológicas; ao professor Leonildo (Léo) por me ajudar sempre que precisei e pela amizade; ao professor Jean Carlos pelo fornecimento do antígeno para realização das análises sorológicas e apoio durante o projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT) por contribuírem para a minha formação e aos colegas de turma pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e companheiros André Santos, André Mota, Pedro Paulo, Orestes, Giva, Renatinha Pimentinha, Pomys-Pomys, Luana, Érika Samico, Érica Moraes, Marcela, Áurea, Camila, Grasi, Adriano (Índio), Jônatas, Adrienne, Mauro, Débora

Rochelly e a todos os outros da equipe que compõem a minha segunda casa, o Laboratório de Bacterioses/UFRPE. Agradeço pela ajuda e amizade em todas as etapas de realização deste projeto.

Aos amigos da Secretaria de Vigilância em Saúde do Distrito de Fernando de Noronha: Fernando Magalhães, Carlos Diógenes e Eduardo Guelfer; agradeço pelas coletas e ajuda sempre que precisei.

Aos membros do Laboratório de Patologia pela ajuda durante a realização das análises histopatológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para este projeto.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela minha formação acadêmica, residência médica e mestrado acadêmico.

A todos os proprietários de coelhos pelo fornecimento das amostras, confiança e boa recepção.

Aos coelhos, principais focos do meu trabalho, pelo sofrimento silencioso e por servirem de base para tantas outras pesquisas de fundamental importância para a saúde pública.

A todos os não mencionados aqui, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Objetivou-se com essa pesquisa detectar a ocorrência de anticorpos IgG contra *T. gondii* em coelhos, identificar os fatores de risco associados à infecção por *T. gondii* e detectar o DNA de *T. gondii* em órgãos de coelhos. Foram coletadas amostras de sangue de 150 coelhos e fragmentos de cérebro, coração e diafragma de 54 coelhos no estado de Pernambuco. Os dados obtidos em questionários foram submetidos à análise dos fatores de risco. As amostras de soro foram submetidas a teste sorológico (MAT) e as amostras de tecido aos exames molecular (PCR) e histopatológico. Foi evidenciada a presença de anticorpos contra *T. gondii* em 6,7% (10/150) dos coelhos e DNA de *T. gondii* em 9,25% (5/54). Na histopatologia foram detectadas lesões teciduais associadas a *T. gondii* caracterizadas principalmente por granuloma, infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de degeneração e necrose em cérebro e coração. Este é o primeiro estudo sobre a detecção de *Toxoplasma gondii* em coelhos naturalmente infectados na região Nordeste do Brasil. Os fatores de risco identificados foram: alimentação a base de vegetais crus (*Odds ratio*: 39,00) e contato entre gatos e coelhos (*Odds ratio*: 52,00); sendo esta detecção relevante na implementação de medidas preventivas eficazes contra a Toxoplasmose e sua prevalência nessas e em outras espécies. A detecção de *T. gondii* em coelhos demonstra a importância do risco da infecção e manutenção deste agente nesses animais e no ambiente, sendo um risco para a Saúde Pública.

Palavras-chave: Coelho, MAT, PCR, Toxoplasmose, Saúde Pública.

ABSTRACT

This research aimed to detect the occurrence of IgG antibodies against *T. gondii* in rabbits, identify risk factors associated with *T. gondii* infection and detect *T. gondii* DNA in rabbit organs. Blood samples from 150 rabbits and tissue fragments (brain, heart and diaphragm) from 54 rabbits were collected in the state of Pernambuco. Data obtained in questionnaires were submitted to analysis of risk factors. The serum samples were submitted to serological test (MAT) and the tissue samples to molecular (PCR) and histopathology tests. Results indicated the presence of antibodies against *T. gondii* in 6.7% (10/150) of the rabbits and *T. gondii* DNA in 9.25% (5/54). On histopathology were detected lesions associated with *T. gondii* mainly characterized by granuloma, mononuclear cell infiltrates, areas of degeneration and necrosis in brain and heart. This is the first study of *Toxoplasma gondii* detection in naturally infected rabbits in northeastern. The identified risk factors were: feeding based on raw vegetables (*Odds ratio*: 39.00) and contact between cats and rabbits (*Odds ratio*: 52.00); being this detection relevant to the implementation of effective preventive measures against toxoplasmosis and its prevalence in these and in other species. The detection of *T. gondii* in rabbits demonstrates the importance of the infection risk and maintenance of this agent in these animals and in the environment, being a public health risk.

Keywords: Rabbit, MAT, PCR, Toxoplasmosis, Public Health.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	JUSTIFICATIVA	3
3	OBJETIVOS	4
3.1	Geral	4
3.2	Específicos	4
4	REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1	Cunicultura	5
4.2	Toxoplasmose	6
4.3	Diagnóstico da Toxoplasmose	11
4.3.1	Diagnóstico sorológico	11
4.3.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	13
4.3.3	Exame Histopatológico	14
4.4	Prevenção e Controle	15
5	REFERÊNCIAS	16
6	ARTIGO	25
	Ocorrência de <i>Toxoplasma gondii</i> em coelhos domésticos na região Nordeste do Brasil	
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
8	ANEXOS	46
8.1	ANEXO A – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE	46
8.2	ANEXO B – Normas para submissão ao periódico ACTA Tropica	47
8.3	ANEXO C - Questionário para Coleta de Amostras de Campo	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* 7

Figura 2 Ciclo de *T. gondii* em felídeos 8

Capítulo 1:

Figura 1 Amostras de tecido de coelhos positivos para *Toxoplasma gondii*. Lâminas coradas através de Hematoxilina-Eosina (HE). 34

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1:

Tabela 1	Amostras biológicas coletadas de coelhos de acordo com o município e propriedades de origem no Estado de Pernambuco, Brasil.	29
Tabela 2	Coelhos positivos para <i>T. gondii</i> no estado de Pernambuco, Brasil.	32
Tabela 3	Distribuição da frequência de anticorpos de <i>T. gondii</i> em coelhos por município no estado de Pernambuco.	32
Tabela 4	Análise univariada dos fatores associados à infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em coelhos.	35
Tabela 5	Regressão logística dos fatores de risco associados à infecção pelo <i>T. gondii</i> em coelhos no estado de Pernambuco.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DT	Teste do Corante de Sabin-Feldman Modificado
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
F.A.	Frequência Absoluta
F.R.	Frequência Relativa
HE	Hematoxilina-Eosina
I.C.	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHAT	Teste de Hemaglutinação Indireta
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MAT	Teste de Aglutinação Modificado
N	Número total
N°	Número
<i>O. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
O.R.	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Pós-Infecção
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

A cunicultura é o ramo da zootecnia que corresponde à criação comercial do coelho doméstico, podendo esta ser direcionada para a produção de carne, pele ou pelos e seus subprodutos, para genética e melhoramento genético, venda de matrizes e reprodutores, animais de laboratórios ou de companhia (FERREIRA et al., 2012). A criação de coelhos tem sua importância social na atualidade devido à facilidade de criação, podendo ser realizada em pequenas propriedades, entretanto ainda é um ramo muito escasso no cenário nacional com poucos incentivos e pesquisas na área (SOUZA et al., 2007; RODRIGUES, 2007).

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Esse protozoário pode ser encontrado em praticamente todos os mamíferos e aves, tendo como hospedeiros definitivos os felídeos (DUBEY, 1988).

O estado higiênico-sanitário inadequado de uma criação de coelhos tem uma influência notável sobre a incidência e gravidade de certas enfermidades (RODRIGUES, 2007). A infecção de coelhos por *Toxoplasma gondii* se dá através de alimentos contaminados com oocistos do parasito, infecção transplacentária e convívio desses animais com gatos domésticos infectados com *T. gondii* (QUINTON 2005; MOORE, 2005; DUBEY, 1988). Liu et al. (2006) relataram a infecção por via sexual nesta espécie em um estudo realizado na China.

A toxoplasmose em coelhos geralmente ocorre de forma assintomática, porém a infecção latente pode ocasionar uma doença crônica com sintomas nervosos, sinais de paralisia de membros, miosite e adenite, além desses ainda podem ser observadas febre, convulsão e morte em poucos dias (QUINTON, 2005; MOORE, 2005).

O consumo da carne de coelho infectada por *T. gondii* demonstra um grande risco à saúde pública, sendo esta transmissão já relatada no México por Alvarado-Esquivel et al. (2011) e Figueroa-Castillo et al. (2006), na Espanha por Almeria et al. (2004) e no Egito por Harfoush & Tahaon (2010).

Beverley et al. (1954) relataram, em um estudo em pacientes humanos na Inglaterra, uma maior frequência de soroprevalência para toxoplasmose em caçadores, criadores e manipuladores de coelhos do que inclusive médicos veterinários e trabalhadores de matadouros, já Ishikawa et al. (1990) relataram um caso de

linfadenite toxoplásmica em humano transmitida através de um coelho. Neste seguimento, Mecca et al. (2011) detectaram a presença de 1,35% (1/74) de *Toxoplasma gondii* em carnes de coelho para consumo no Brasil, demonstrando a importância desse animal na cadeia epidemiológica da transmissão desse parasita.

O diagnóstico de toxoplasmose em coelhos pode ser realizado por meio de técnicas que evidenciam a presença do parasito como a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), por técnicas que demonstram a presença de anticorpos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e pela impressão de esfregaços de órgãos em lâminas para detecção de cistos teciduais (DINIZ 2006; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; QUINTON, 2005; ALBUQUERQUE et al., 2002).

A cunicultura no Brasil ainda é uma atividade pouco difundida, principalmente na Região Nordeste, onde as criações geralmente são de subsistência, com pouco ou nenhum incentivo por parte dos órgãos públicos e mercado consumidor (RODRIGUES, 2007). No Estado de Pernambuco, em especial, existem poucos dados referentes ao número de criações, origem e quantidade de animais nos plantéis, sendo necessária a realização de estudos sobre a sanidade desses animais para implementar medidas que contribuam com o desenvolvimento desta atividade no Estado.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença de grande preocupação para a saúde pública e pesquisas nesta área são realizadas desde aspectos da ciência básica até estratégias de controle e prevenção nos animais e homem.

Esta enfermidade é indicada como uma das causas principais de prejuízos econômicos às criações comerciais de animais com casos de abortos, crias fracas e baixa fertilidade. Além disso, pouco se sabe sobre a real gravidade desta enfermidade e ocorrência nas criações de coelhos.

A cunicultura no Brasil, principalmente na Região Nordeste, possui um perfil ainda atrasado em relação a outros países no que diz respeito à tecnificação e sanidade das criações, onde são registrados surtos de doenças que representam risco para os animais e para o homem.

O estudo da infecção por *Toxoplasma gondii* em coelhos é relevante para evitar perdas econômicas provocadas por este agente, além do risco à saúde pública pelo consumo de carne infectada. Além disso, ainda há poucos estudos na literatura nacional sobre esta enfermidade, principalmente sobre os aspectos epidemiológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Diagnosticar a infecção natural por *Toxoplasma gondii* em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) no Estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil.

3.2 Específicos

- Detectar a ocorrência de anticorpos IgG contra *T. gondii* em coelhos naturalmente infectados através do Teste de Aglutinação Modificada (MAT)
- Identificar os fatores de risco associados à infecção por *T. gondii* em coelhos naturalmente infectados
- Detectar a presença do DNA de *T. gondii* em órgãos (cérebro, coração e diafragma) de coelhos naturalmente infectados coletados ao abate por meio da Reação em Cadeia Polimerase (PCR)
- Contribuir com dados epidemiológicos sobre a ocorrência da Toxoplasmose em coelhos na Região estudada.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Cunicultura

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é classificado como um mamífero da Ordem dos Lagomorfos, Família dos Leporídeos e Gênero *Oryctolagus* (RODRIGUES, 2007). Essa espécie é nativa da Península Ibérica e já tem sido encontrada em todo o mundo (ALMERÍA et al., 2004).

Entre as aptidões relacionadas à criação de coelhos podem ser citadas a exploração de carne e pele, utilização em laboratório para culturas de tecidos, testes de toxicidade, experiências oftalmológicas, produção de anticorpos, bem como para a confecção de peças de vestuário (OKERMAN, 1994).

A criação de coelhos vem se tornando destaque em muitos países, principalmente na Europa, pela alta capacidade de produção de carne em curto espaço de tempo (SOUZA et al., 2007). Segundo Brum-Junior (2012), o coelho é capaz de converter alimentos de baixa qualidade em proteína de origem animal de qualidade devido ao seu ceco funcional, tornando-se uma alternativa para a população de baixa renda, uma vez que pode ser criada com dietas a base de forrageiras.

Segundo Machado & Ferreira (2002), a cunicultura é uma atividade pouco difundida no Brasil, mas está em constante crescimento devido a excelente qualidade da carne, facilidades de manejo e alimentação, alta prolificidade, dentre outras. Ferreira et al. (2012) descrevem que o grande desafio consiste em superar os hábitos culturais brasileiros, resistente ao consumo de carnes diferenciadas, somado a pouca oferta de carne de coelho, elevando o custo de produção e a restrição de mercado.

A cunicultura possui seu papel no desenvolvimento social nacional, pois é uma atividade que necessita de pouco espaço físico e a mão-de-obra utilizada geralmente é familiar, diminuindo o custo de produção. Em razão da qualidade nutricional, a carne atinge preços vantajosos no mercado consumidor, mas a cadeia de produção ainda não está bem estruturada, havendo sazonalidade e escassez de abatedouros especializados (SOUZA et al., 2007; RODRIGUES, 2007).

A questão da sazonalidade no Brasil é de grande importância, pois se deve considerar as diferenças entre as épocas do ano de acordo com cada região, em destaque à Região Nordeste que apresenta climas caracterizados por temperaturas elevadas, em especial o clima semi-árido, o que torna muito importante o estudo de medidas

adaptativas para amenizar tal problema nesta Região afim de promover um maior conforto aos animais (MACHADO & FERREIRA, 2002).

Em condições fisiológicas normais, sem gasto de energia, o coelho mantém sua temperatura corporal em torno de 38,5°C. Caso a temperatura ambiente se eleve, o consumo de ração diminui sempre na ordem de 1 a 2% para cada grau acima de 27 a 28°C (BARBOSA et al., 1992; ROCA, 1998). Alguns autores descrevem que a zona de conforto para uma criação de coelhos seria entre 15 e 20°C (MULLER, 1982), 13 e 20°C (DUARTE & CARVALHO, 1979) e 14 a 24°C (ROCA, 1998).

Segundo Roca (1998) as altas temperaturas também podem acarretar problemas de ordem reprodutiva como a saída precoce dos láparos dos ninhos, alteração da espermatogênese nos machos e nas mudas de pêlo, enterite nos reprodutores, decréscimo da fertilidade e fecundidade das matrizes, morte embrionária, déficit de crescimento e diminuição do ganho de peso.

A Região Nordeste do Brasil apresenta atrasos no desenvolvimento da cunicultura, onde a quase totalidade das criações são de caráter rústico e de subsistência, não havendo incentivos por parte dos órgãos públicos e mercado consumidor (RODRIGUES, 2007). No Estado de Pernambuco pouco se sabe dos dados referentes à totalidade das criações, origem e quantidade de animais nos plantéis.

O estado higiênico-sanitário de uma criação de coelhos tem sua influência sobre a incidência e gravidade de certas enfermidades como parasitoses, problemas respiratórios e de ordem alimentar (RODRIGUES, 2007). Entre as mais importantes doenças que podem acometer esses animais está a toxoplasmose (AHMMED et al., 2011).

4.2 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eimeriorina, Família Toxoplasmatidae, Gênero Toxoplasma (DUBEY, 1988), sendo este único agente responsável pela toxoplasmose em todos os hospedeiros (SPRINGER, 1997).

É um parasito intracelular que acomete a maioria das espécies de aves e mamíferos, tendo como hospedeiros definitivos os felídeos. Nestes, a infecção é muitas vezes assintomática, porém em outras espécies e nos humanos podem ocorrer sinais

clínicos como febre, quadros neurológicos, oftálmicos e problemas de ordem reprodutiva como má formação fetal e abortos, sendo esta uma das doenças mais difundidas no mundo (MITSUKA et al., 1998; ELMORE et al., 2010; DARABUS et al., 2011; BOBIC et al., 2012).

Toxoplasma gondii foi inicialmente identificado por Nicolle & Manceaux (1908) em um roedor silvestre (*Ctenodactylus gundi*) na Tunísia e por Splendore (1908) em um coelho no Brasil. O primeiro isolamento do parasito viável em um animal foi realizado por Sabin & Olitsky (1937) e o primeiro isolamento em humanos foi feito por Wolf et al. (1939). Sabin (1941) comprovou pela primeira vez que este protozoário infecta humanos e animais e Frenkel & Friedlander (1951) descreveram a patogenia da toxoplasmose.

T. gondii possui três estágios infectantes: os taquizoítos (tachos = rápido), os bradizoítos (bradys = lento) e os oocistos; possui um ciclo de vida heterógeno (Figura 1). Os felídeos liberam os oocistos no ambiente após a ingestão de qualquer uma das três formas infectantes de *T. gondii* (Figura 2) (DUBEY, 1988). O período pré-patente e a frequência de oocistos liberados irão variar de acordo com o estágio de *T. gondii* ingerido (DUBEY, 2005). O período pré-patente é de 3 a 10 dias após a ingestão de cistos teciduais e mais de 18 dias após a ingestão de oocistos (DUBEY, 2001).

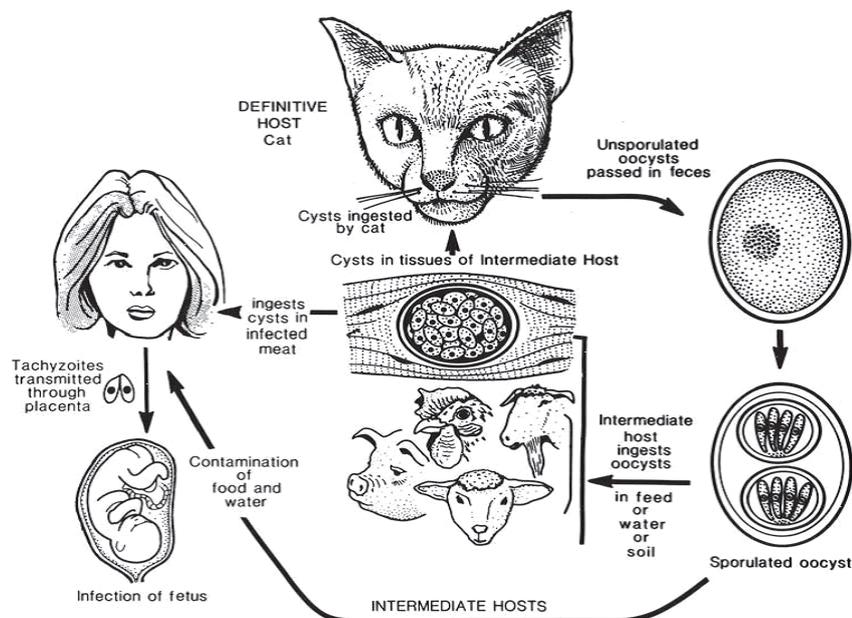


Figura 1: Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Fonte: Dubey, 1988.

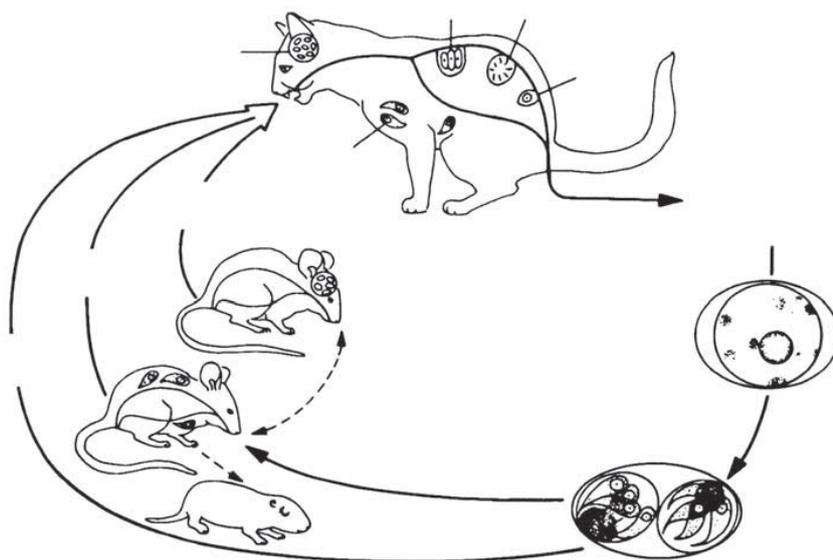


Figura 2: Ciclo de *T. gondii* em felídeos. Fonte: Dubey, 1988.

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais bem estudados no mundo devido à sua importância médica e veterinária (DUBEY, 1988). Esse parasita pode acometer vários órgãos e estruturas como gânglios linfáticos do hospedeiro, olhos, sistema nervoso central, fígado e coração (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011), embora essa enfermidade ocorra de forma assintomática na maioria dos casos humanos infectados após o nascimento (DUBEY & JONES, 2008).

Estudos sorológicos indicam que mais de 80% das infecções primárias por *T. gondii* em humanos são de caráter assintomático, devido à efetividade do sistema imunológico, podendo o grau dessa enfermidade variar nos indivíduos imunossuprimidos (LUFT & REMINGTON, 1992).

Acredita-se que uma vez infectados, os seres humanos permanecem nessa condição por toda a vida de forma assintomática, a menos que um caso de imunossupressão ocorra e o organismo reative a infecção (DUBEY & JONES, 2008).

A infecção por *Toxoplasma gondii* é frequente em humanos e em várias espécies de animais de sangue quente, incluindo os coelhos domésticos (DUBEY, 1988; PATTON et al., 2000).

A infecção nos coelhos por *T. gondii* ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos do parasito ou através da infecção transplacentária (DUBEY, 1988; MOORE, 2005; QUINTON, 2005). A transmissão via sêmen já foi comprovada em coelhos em estudo experimental por Liu et al. (2006) na China.

A toxoplasmose em coelhos ocorre geralmente de forma assintomática. Porém, a infecção latente pode ocasionar uma doença crônica com sinais nervosos, paralisia do membro pélvico em "*posição de foca*", além de miosite e adenite (QUINTON, 2005). Segundo Moore (2005), os principais sinais clínicos nesses animais são febre, convulsão, paralisia de membros e morte em poucos dias. Além desses, a presença de sinais como anorexia, letargia, descarga nasolacrimal e respiratória, tremores, andar descoordenado e diarreia já foram relatados nessa espécie (HAZIROGLU et al., 2003). Casos de aborto e óbito também foram relatados em estudos experimentais em coelhas gestantes por Engracia-Filho (2001).

Dubey et al. (1992) relataram três casos de toxoplasmose em coelhos domésticos, onde os animais vieram a óbito após a doença aguda caracterizada por sinais de febre, letargia e diarreia em um animal e ausência de sinais clínicos em outros dois.

As espécies de coelhos selvagens já foram indicadas como mais sensíveis à infecção por *Toxoplasma gondii* que as espécies domésticas, sendo na maioria dos casos de caráter fatal como demonstram estudos realizados por Gustafsson et al. (1997a,b) em Lebres-da-Montanha (*Lepus timidus*) e por Frolich et al. (2003) em Lebres-comuns (*Lepus europaeus*). Entretanto, Smith & Frankel (1995) relataram uma baixa frequência de animais soropositivos (2/12) para anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em Coelhos-da-Flórida (*Sylvilagus floridanus*) em amostras coletadas entre os anos de 1974 e 1987 nos Estados Unidos, já Hejlicek et al. (1997) detectaram índice ainda mais baixo em lebres-comuns (*Lepus europaeus*) na República Tcheca, com 4% (6/164) de positividade.

O papel do coelho doméstico na epidemiologia da toxoplasmose em humanos ainda não foi bem estabelecido, mas é considerado de provável importância (AGHWAN et al., 2010). Sroka et al. (2003) detectaram a presença do *Toxoplasma gondii* viável no sistema nervoso de coelhos de fazenda na Polônia através de técnicas sorológicas e histológicas, bioensaio e PCR, sugerindo o coelho (*O. cuniculus*) como uma potencial fonte de infecção.

A infecção por *T. gondii* em humanos transmitida por coelhos já foi descrita por Berverley et al. (1954) onde foi realizado um levantamento sorológico de pessoas de diversas áreas de atuação e obtiveram como maior frequência de positivos, as pessoas que tiveram contato com coelhos (manipuladores e caçadores). Ishikawa et al. (1990) relataram um caso de linfadenite toxoplásmica em um homem residente com coelhos

sorologicamente positivos para *T. gondii* apresentando nódulos cérvico-faciais com presença do parasito confirmado através de técnicas de imunofluorescência.

A infecção de coelhos por *T. gondii* representa uma preocupação para a saúde pública, pois esse parasita pode ser transmitido ao homem por meio do contato durante a caça e esfolagem e através do consumo de carne mal cozida, sendo essa descrita como a fonte mais provável de infecção (AHMMED et al., 2011). Alvarado-Esquivel et al. (2011) associaram o consumo de carne de coelho com infecção por *T. gondii* em seres humanos em Durango, México.

Segundo Hejlíček & Literák (1995), o coelho possui um comportamento de reservatório de *T. gondii* e a infecção é mantida graças à transmissão intra-uterina do protozoário.

A toxoplasmose em coelhos já foi descrita por diversos outros autores como Waller & Bergquist (1982) na Suíça, Dubey et al. (1992) nos Estados Unidos, Almeria et al. (2004) na Espanha, Stutzin et al. (2006) no Chile, Figueroa-Castillo et al. (2006) no México, Aghwan et al. (2010) no Iraque, Ashmawy et al. (2011), Ahmmed et al. (2011) no Egito e Dubey et al. (2011) nos Estados Unidos.

No Brasil, há relatos na literatura da infecção experimental por *T. gondii* em coelhos como descrito por Mitsuka et al. (1998) onde dois coelhos foram inoculados com 10^6 taquizoítos vivos e, após dois a quatro dias, apresentaram sinais clínicos com evolução para o óbito mesmo após tratamento; por Engracia-Filho et al. (2001) que infectaram nove coelhas gestantes com oocistos de *T. gondii* e foi possível a observação de sinais clínicos da doença, principalmente o aborto; e Albuquerque et al. (2002) que inocularam 10^3 e 10^6 taquizoítos de *T. gondii* em 15 coelhas e se observou sinais clínicos da doença e alterações histopatológicas.

Ainda existem poucos dados na literatura referentes à prevalência da toxoplasmose em coelhos naturalmente infectados no Brasil. Porém, Nobrega et al. (1952) relataram um surto de toxoplasmose que provocou óbito de 319 coelhos em um plantel no Instituto Biológico em São Paulo e mais tarde, Santos et al. (1968) observaram a doença em seis coelhos no estado do Rio de Janeiro. Dubey et al. (2011) também relataram a presença de coelhos naturalmente infectados no Estado de Minas Gerais.

A toxoplasmose também foi descrita em infecções naturais em coelhos nos Estados Unidos (DUBEY et al., 1992; LELAND et al., 1992), na República Checa

(HEJLICEK et al., 1997), na Polônia (SROKA et al., 2003), no México (FIGUEROA-CASTILLO et al., 2006) e no Iraque (AGHWAN et al., 2010).

4.3 Diagnóstico da Toxoplasmose

O diagnóstico de toxoplasmose em coelhos pode ser realizado por meio de técnicas que evidenciam a presença do parasito como a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), por técnicas que demonstram a presença de anticorpos como o Teste de Aglutinação Modificada (MAT) e pela impressão de esfregaços de órgãos em lâminas para detecção de cistos teciduais (ALBUQUERQUE et al., 2002; KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; DINIZ, 2006; AGHWAN et al., 2010; DARABUS et al., 2011; MUNHOZ et al., 2002). *T. gondii* pode ainda ser isolado em pacientes por meio da inoculação de secreções e fluídos corporais em animais de laboratório pela técnica de bioensaio e cultura de tecidos (DUBEY, 1988).

A técnica de detecção de cistos teciduais de *T. gondii* em coelhos já foi relatada por Engracia-Filho et al. (2001), Albuquerque et al. (2002), Sroka et al. (2003), Barakat (2007) e Aghwan et al. (2010).

4.3.1 Diagnóstico Sorológico

Classicamente, o diagnóstico da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra o parasita (CANTOS et al., 2000).

Na fase aguda da toxoplasmose, primeiro ocorre a produção de imunoglobulina M (IgM), seguida da produção de imunoglobulina G (IgG) (fase crônica). A produção de anticorpos IgM e IgG contra *T. gondii* em coelhos ocorre cerca de uma semana após a infecção (GUSTAFSSON et al., 1997 a,b; BARAKAT et al., 2007). Cantos et al. (2000) relataram a presença de anticorpos da classe IgA em infecções toxoplásmicas transmitidas por via oral.

Muitas técnicas são empregadas no diagnóstico sorológico da toxoplasmose como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Teste Imunoenzimático (ELISA), imunoblotting e reações de aglutinação como o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) e o Teste de Hemaglutinação indireta (IHAT) (PARTANEN et al., 1984; SUZUKI et al., 1990; GROSS et al., 1992; CANTOS et al., 2000).

O Teste de Aglutinação Modificada (MAT) é um dos testes mais utilizados para a detecção de anticorpos contra *Toxoplasma* em coelhos (SROKA et al., 2003; ALMERÍA et al., 2004; AGHWAN et al., 2010; DUBEY et al., 2011; ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2013), principalmente pela facilidade de realização já que não necessita de um conjugado específico para esta espécie.

Almeria et al. (2004) detectaram no MAT, anticorpos contra *Toxoplasma* em 14,2% (65/456) dos coelhos naturalmente infectados na Espanha. Já Aghwan et al. (2010) relataram positividade em 86% (43/50) em amostras de soro de coelhos no Iraque e Dubey et al. (2011) em 9,5% (2/21) no Brasil.

No MAT, os soros são tratados com o uso de 2-Mercaptoetanol para que haja uma redução de anticorpo IgM, em seguida são incubados com o uso de formalina; desta forma são detectados anticorpos contra *Toxoplasma* da classe IgG (SROKA et al., 2003). O soro é diluído em 1:25, 1:50 e 1:500, sendo considerado positiva a reação a partir da primeira diluição (DUBEY & DESMONTS, 1987; DUBEY, 1988; ALMERÍA et al., 2004; DUBEY et al., 2011).

Outras técnicas sorológicas para o diagnóstico da Toxoplasmose em coelhos têm sido realizadas com êxito por diversos autores. A RIFI foi realizada por Cox et al. (1981) onde foram analisados soros provenientes de 1697 coelhos naturalmente infectados da Austrália. Essa técnica também foi utilizada por Sedlak et al. (2000) que detectaram anticorpos em 12 coelhos (*O. cuniculus*) e 12 lebres (*L.europaesus*) em um estudo experimental, demonstrando que as espécies selvagens são mais sensíveis à infecção por *T. gondii* que as espécies domésticas. Mitsuka et al. (1998) utilizaram essa técnica para detectar anticorpos em coelhos experimentalmente infectados, sendo possível a observação de positividade em animais que receberam uma carga alta (10^6) de taquizoítos. Já Waller & Bergquist (1982) utilizaram a RIFI e o imunoensaio para a detecção dos anticorpos contra *Toxoplasma* em coelhos de laboratório, demonstrando uma completa correlação entre os resultados dos dois testes.

O Teste de Hemaglutinação Indireta (IHAT) também tem sido relatado em pesquisas de anticorpos contra *T. gondii* em coelhos por diversos autores como Engracia-Filho et al. (2001) em estudo experimental com coelhas gestantes no Brasil. No Chile, Stutzin et al. (2006) detectaram uma prevalência de 8% em coelhos naturalmente infectados; já Ashmawy et al. (2011), no Egito, detectaram prevalência de 15%. Também no Egito, Ahmmed et al. (2011) detectaram uma prevalência de 21,96% em coelhos naturalmente infectados.

O Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) também é utilizado no diagnóstico da toxoplasmose em coelhos. Hassl et al. (1987), em um estudo experimental, detectaram a presença de anticorpos contra *T. gondii* em três coelhos infectados oralmente com 10^6 oocistos do parasito, após 31-52 dias pós-infecção, resultado semelhante ao encontrado por Barakat (2007), no Egito, que detectou positividade após 14-56 dias pós-infecção em 17 coelhos de um experimento. Já Quan et al. (2009) na Coreia detectaram anticorpos em cinco coelhos entre 4 a 18 dias após a infecção experimental. Porém, Darabus et al. (2011) não encontraram positividade em um coelho em um Zoológico na Romênia utilizando esta técnica.

No Brasil, Mecca et al. (2011) detectaram positividade e titulações semelhantes de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* no sangue e em tecidos de coelhos em estudo experimental. Além disto, nesse mesmo estudo também foi detectada positividade em 1,35% (1/74) das amostras.

No México, Figueroa-Castillo et al. (2006) utilizaram o ELISA para a detecção de anticorpos contra *T. gondii* onde foram analisadas amostras de soro de coelhos naturalmente infectados com positividade em 26,9% (77/286). Luptakova et al. (2009), por sua vez, utilizaram a Fixação de Complemento para a detecção de anticorpos em coelhos na Eslováquia, observando-se positividade em 71,4% (15/21). Por fim, Smith & Frenkel (1995) nos Estados Unidos utilizaram o Teste do Corante de Sabin-Feldman Modificado e detectaram uma prevalência de 17% (2/12) em Coelhos-da-Flórida (*Sylvilagus floridanus*).

Mesmo com todos os testes sorológicos disponíveis, o resultado do exame de uma amostra de soro positiva estabelece somente que o hospedeiro foi infectado em algum momento no passado e o título do anticorpo não tem correlação com a gravidade dos sinais (DUBEY, 1988).

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Apesar do diagnóstico da toxoplasmose se basear classicamente no uso da sorologia e na demonstração do protozoário em amostras de animais doentes, a PCR também é considerada uma alternativa valiosa (HOMAN et al., 2000; MORENO et al., 2012). Os recentes avanços no conhecimento do genoma desse parasito tornaram possível a utilização da PCR para sua detecção (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; FERREIRA et al., 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de diagnóstico que possibilita a amplificação de pequenas amostras de DNA até um nível suficiente que permita sua identificação (CURY et al., 2005). Para a identificação de DNA específico de *T. gondii* se analisa a amplificação de fragmentos do gene B1 de *Toxoplasma* (BIN DAJEM & ALMUSHAIT, 2012; HASSANAIN et al., 2013).

A análise genética de *T. gondii* vem assumindo posição de destaque no estudo da epidemiologia da Toxoplasmose, fatores envolvidos na transmissão e no mecanismo da doença (FERREIRA et al., 2011). A confirmação da presença de *T. gondii* em técnicas mais sensíveis e específicas como a PCR tem se tornado de grande relevância nos mais diversos estudos envolvendo espécies animais, principalmente os voltados para casos de quadros reprodutivos (MORENO et al., 2012).

Sendo a técnica molecular de maior sensibilidade para detectar *T. gondii*, esta tem sido bastante indicada em estudos em associação com outros testes diagnósticos com o objetivo de confirmar a presença do parasito quando outro teste não for suficiente, principalmente em casos de infecções recentes (BIN DAJEM & ALMUSHAIT, 2012; MORENO et al., 2012; HASSANAIN et al., 2013).

Em humanos, o diagnóstico molecular da toxoplasmose pode ser realizado com amostras de sangue, fluídos corporais, urina, lavados brônquio-traqueais e do LCR do recém-nascido. A PCR tem sido também realizada no líquido amniótico para diagnóstico da infecção intra-uterina (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; DINIZ, 2006). Além disso, esta técnica tem sido bastante utilizada no diagnóstico pré-natal e na prevenção da infecção toxoplásmica em humanos (COSTA et al., 2013).

Em coelhos, alguns autores utilizaram com êxito essa técnica para detectar *T. gondii*. Sroka et al. (2003) na Polônia detectaram a presença do *T. gondii* em cérebros de quatro coelhos naturalmente infectados e os fragmentos sequenciados foram de 262pb. Dubey et al. (2011) no Brasil utilizaram com êxito essa técnica para detectar *T. gondii* em amostras de cérebro de um coelho naturalmente infectado no estado de Minas Gerais.

4.3.3 Exame Histopatológico

As alterações histopatológicas associadas à Toxoplasmose como a presença de cistos teciduais, também são importantes fontes de diagnóstico para essa enfermidade (BARAKAT, 2007), porém o encontro de cistos ou taquizoítos na coloração específica

vai depender se o fragmento coletado contém as referidas formas evolutivas, tornando difícil muitas vezes uma confirmação neste teste diagnóstico (GIRALDI et al., 2002).

Os cistos contendo bradizoítos nos tecidos são a forma de resistência do *T. gondii* que podem permanecer viáveis pelo resto da vida do hospedeiro (DUBEY & FRENKEL, 1976; DJURKOVIC-DJAKOVIC & MILENKOVIC, 2001). Os bradizoítos podem estar presentes em todos os tecidos, porém, os principais sítios de infecção latente ocorrem no miocárdio, cérebro e tecido músculo-esquelético (REMYINGTON & CAVANAUGH, 1965; DJURKOVIC-DJAKOVIC & MILENKOVIC, 2001).

A infecção por *T. gondii* está tradicionalmente associada à presença de lesões necróticas do sistema nervoso central, sendo a presença dessas lesões quase que em sua totalidade, correlacionadas à presença do DNA do parasito confirmada através de exames moleculares (MORENO et al, 2012). As principais lesões observadas na Toxoplasmose são infiltrados inflamatórios mononucleares multifocais, focos de necrose principalmente em sistema nervoso central e gliose (MORENO et al., 2012). Em casos de comprometimento do sistema reprodutivo já foram descritas lesões caracterizadas por áreas de necrose, congestão e infarto em tecido placentário (CASTANO et al., 2014). Em coelhos, lesões teciduais associadas à infecção por *T. gondii* já foram descritas por Gustafsson et al. (1997a), Haziroulu et al. (2003) e Ahmmed et al. (2011).

4.4 Prevenção e Controle

Para prevenir a toxoplasmose, algumas atitudes de higiene pessoal e biossegurança são propostas, como a lavagem das mãos antes de manipular a carne e vegetais e a lavagem de todos os materiais que entraram em contato com a carne crua. Além desses, um dos fatores para a prevenção dessa enfermidade é o cozimento e lavagem correta dos alimentos além de obter alimentos e água de boa procedência. Pessoas imunodeprimidas como gestantes devem evitar também o contato com felídeos (DUBEY, 1988).

Em criações de coelhos e de outros animais, deve-se evitar fornecer carnes cruas e/ou de má procedência, vegetais mal lavados e água de fontes duvidosas. Deve-se também evitar o estresse e superpopulação uma vez que nessas condições algumas espécies animais podem realizar canibalismo. As criações também devem ser mantidas longe de outros animais como gatos e outros felídeos (DUBEY, 1988).

5. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, G.R.; SOUZA-PINTO, A.R.; OLIVEIRA, F.C.R.; MUNHOZ, A.D.; LOPES, C.W.G. (2002). Lesões em Coelhos Inoculados com *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). Rev Bras Parasitol Vet, 11(1):27-31.
- ALMERIA, S.; CALVETE, C.; PAGES, A.; GAUSS, C.; DUBEY, J.P. (2004). Factors Affecting the Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Infection in Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. Vet Parasitol, 123:265–270.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; ALVARADO-ESQUIVEL, D.; VILLENA, I.; DUBEY, J.P. (2013). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic rabbits in Durango State, Mexico. Prev Vet Med, 111:325– 328
- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; TORRES-BERUMEN, J.L.; ESTRADA-MARTÍNEZ, S.; LIESENFELD, O.; MERCADO-SUAREZ, M.F. (2011). *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case–control study in a northern Mexican population. Parasit Vectors, 4:75.
- AGHWAN, S.S.; AL-TAEE, A.F.; SULIMAN, E.G. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic rabbits by using multiple techniques. Iraqi J Vet Sci, 24(2):65-69.
- AHMED, N.E.; EL-AKABAWY, L.M.; RAMADAN, M.Y.; KANDEEL, N.M. (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Rabbits in Egypt. Benha Vet Med J - Special Issue, 1:191-193.
- ASHMAWY, K.L.; ABUAKKADA, S.S.; AWAD, A.M. (2011). Seroprevalence of Antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in Farmed Domestic Rabbits in Egypt. Zoonoses Public Hlth, 58(5):357–364.
- BARAKAT, A.M.A. (2007). Some Diagnostic Study on Male New Zealand Rabbit Experimentally Infected with *Toxoplasma gondii* Strain. Global Vet, 1(1):17-23.
- BARBOSA, O.R.; SCAPINELO, C.; MODENUTI, M.I. et al. (1992). Desempenho de Coelhos da Raça Nova Zelândia Branco, Criados em Diferentes Tipos de Instalações

Durante as Estações de Verão e Inverno: 2-Parâmetros Hematológicos. R Bras Zootec, 21(5):787-796.

BEVERLEY, J.K.; CALEY, J.P.; ROSEMAN, C.J. (1954). Human toxoplasmosis infection. J Hyg, 52:37-46.

BIN DAJEM, S.M.; ALMUSHAIT, M.A. (2012). Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by PCR in blood samples collected from pregnant saudi women from the Aseer region, Saudi Arabia. Ann Saudi Med, 32(5):507-512.

BOBIĆ, BRANKO.; KLUN, IVANA.; NIKOLIĆ, ALEKSANDRA.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, OLGICA. (2012). *Toxoplasma gondii* Infection in South-East Europe: Epidemiology and Epizootiology. Toxoplasmosis – Recent Advances. (subject: Health Sciences), ed. by DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. InTech, Rijeka, Croatia. ISBN: 978-953-51-0746-0. DOI: 10.5772/2845. p.37-54.

BRUM-JUNIOR, B.S. (2012). A Cunicultura como Alternativa ao Combate a Fome. Iv Seminário Nacional de Ciência e Tecnologia em Cunicultura. UNESP-Botucatu. Botucatu, SP.

CANTOS, G. A.; PRANDO, M.D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M. (2000). Toxoplasmose: Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. Rev Assoc Med Bras, 46(4):335-341.

CASTANO, P.; FUERTES, M.; FERRE, I.; FERNANDEZ, M.; FERRERAS, M.C.; MORENO-GONZALO, J.; GONZALES-LANZA, C.; KATZER, F.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ORTEGA-MORA, L.M.; PEREZ, V.; BENAVIDES, J. (2014). Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. Vet Res, 45:9.

COSTA, J.G.L; CARNEIRO, A.C.A.V.; TAVAREZ, A.T.; ANDRADE, G.M.Q.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; JANUARIO, J.N.; MENEZES-SOUZA, D.; FUJIWARA, R.T.; VITOR, R.W.A. (2013). Real-Time PCR as a prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. J Clin Microbiol, 51(8):2766–2768

- COX, J.C.; Edmonds, J.W., Rosamond, C.H.S. (1981). Toxoplasmosis and the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia with suggested mechanisms for dissemination of oocysts. J Hyg, 87, 331-337.
- CURY, P.R.; FURESE, C.; ARAUJO, N.S. (2005). Técnica e Aplicação da Reação da Polimerase em Cadeia na Área Odontológica. Ver Fac Odontol Aracatuba, 26(2):34-39.
- DARABUS, G.; AFRENIE, M.; OLARIU, R.T.; ILIE, M.S.; BALINT, A.; HOTEA, I. (2011). Epidemiological Remarkson *Toxoplasma gondii* Infection in Timisoara Zoo. Sci Parasitol, 12(1):33-37.
- DINIZ, E.M.A. (2006). O diagnóstico da toxoplasmose na gestante e no recém-nascido. Pediatria, 28(4):222-225.
- DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; MILENKOVIC, V. (2001). Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. Acta Protozool, 40:99–106.
- DUARTE, A.T.; CARVALHO, J.M. (1979). Cunicultura. Lisboa: Clássica, 413 p.
- DUBEY, J.P. (1988). Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton. 318 p.
- DUBEY, J. P. (2001). Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol, 87:215–219.
- DUBEY, J. P. (2005). Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. Vet Parasitol, 133:289–298.
- DUBEY, J.P.; BROWN, C.A.; CARPENTER, J.L.; MOORE, J.J. (1992). Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. Vet Parasitol, 44:305-309.
- DUBEY, J.P., DESMONTS, G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet J, 19:337–339.
- DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of toxoplasma cysts. J Protozool, 23:537-554.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*, 38:1257–1278.

DUBEY, J.P.; PASSOS, L.M.F.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L.R.; GENNARI, S.M.; SU, C. (2011). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from feral guinea fowl (*Numida meleagris*) and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Brazil. *J Parasitol*, 97(5):842-845.

ELMORE, S.A.; JONES, J.L.; CONRAD, P.A.; PATTON, S.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii*: Epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol*, 30(10):190-196.

ENGRACIA-FILHO, J.R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MYASAKA, D.; CASTAGNOLLI, K.; COSTA, A.J. (2001). Toxoplasmose experimental em coelhas gestantes. *Revista Semina: Ciências. Agrárias*, 22(1):3-10.

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

FERREIRA, W.M.; MACHADO, L.C.; JARUCHE, Y.G.; CARVALHO, G.G.; OLIVEIRA, C.E.A; SOUZA, J.D.S.; CARISSIMO, A.P.G. (2012). Manual Prático de Cunicultura. Ed. do Autor. Bambuí, MG. 75 p.

FIGUEROA-CASTILLO, J.A.; DUARTE-ROSAS, V.; JUAREZ-ACEVEDO, M.; LUNA-PASTEN, H.; CORREA, D. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. *J Parasitol*, 92(2):394-395.

FRENKEL, J.K.;S. FRIEDLANDER. (1951). Toxoplasmosis. Pathology of neonatal disease, pathogenesis, diagnosis, and treatment. 105 p.

FROLICH, K.; WISSER, J.; SCHMUSER, H.; FEHLBERG, U.; NEUBAUER, H.;GRUNOW, R.; NIKOLAOU, K.; PRIEMER, J.; THIEDE, S.; STREICH, W.; SPECK, S. (2003). Epizootiologic and ecologic investigations of european brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *J Wildl Dis*, 39(4):751-761

GIRALDI, J.H.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E. A. NAVARRO, I.T. BATISTA, T.N. (2002). Sorologia e histopatologia de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. Semina. Ciências Agrárias. Londrina, 23(1):9-14.

GROSS, U.; ROOS, T.; APPOLDT, E. (1992). Improved serological diagnoses of *Toxoplasma gondii* infections by detection of immunoglobulin A (IgG) and IgM antibodies against P30 by using the Immunoblot. J Clin Microbiol, 30:1436-1441.

GUSTAFSSON, K.; UGGLA, A.; JARPLID, B. (1997a). *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). II. Pathology. J Comp Pathol, 117(4):351-360.

GUSTAFSSON, K.; WATTRANG, E.; FOSSUM, C.; HEEGAARD, P.M.; LIND, P.; UGGLA, A. (1997b). *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). II. Early immune reactions. J Comp Pathol, 117(4):361-369.

HARFOUSH, M.; TAHOON, AEL-N. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic ducks, free-range chickens, turkeys and rabbits in Kafr El-Sheikh Governorate Egypt. J Egypt Soc Parasitol, 40(2):295-302.

HASSANAIN, M.A.; EL-FADALY, H.A.; HASSANAIN, N.A.; SHAAPAN, R.M.; BARAKA, A.M.; EL-RAZIK, K.A.A. (2013). Serological and molecular diagnosis of toxoplasmosis in human and animals. WJMS, 9(4):243-247.

HASSL, A.; AUER, H.; HERMENTIN, K.; PICHER, O.; ASPÖCK, H. (1987). Experimental studies on circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in intermediate hosts: Criteria for detection and structural properties. Zbl Bakt Hyg, 263:625-634.

HAZIROGLU, R.; ALTINTAS, K.; ATASEVER, A.; GULBAHAR, M.Y.; TUNCA, O.R. (2003). Pathological and immunohistochemical studies in rabbits experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Turk J Vet AnimSci, 27:285-293.

HEJLICEK, K.; LITERAK, I. (1995). Animal sources and spread of *Toxoplasma gondii*. Ceskoslovenská Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie. Praha, 44(3):121-126.

HEJLICEK, K.; LITERAK, I.; NEZVAL, J. (1997). Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *J. Wildlife Dis*, 33:480–485.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. (2000). Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol*, 30(1):69-75.

ISHIKAWA, T.; NISHINO, H.; OHARA, M.; SHIMOSATO, T.; NABA, K. (1990). The identification of a rabbit-transmitted cervical toxoplasmosis mimicking malignant lymphoma. *Am J ClinPathol*, 94:107-110.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITO, C.; FERNANDES, O. (2005). Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *J Bras Patol Med Lab*, 41(4):229-235.

LAMORIL, J.; MOLINA, J-M.; GOUVELLO, A.; GARIN, Y.J.; DEYBACH, J-C.; MODAI, J.; DEROUIN, F. (1996). Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. *J Clin Pathol*, 49:89-92.

LELAND, M.M.; HUBBARD, G.B.; DUBEY, J.P. (1992). Clinical toxoplasmosis in domestic rabbits. *Lab AnimSci*, 42:318-319.

LIU, S.G.; QIN, C.; YAO, Z.J.; WANG, D. (2006). Study on the Transmission of *Toxoplasma gondii* by Semen in Rabbits. *Zhongguo Ji Sheng Chong XueYu Ji Sheng Chong Bing ZaZhi*, 24(3):166-170.

LUFT, B.T. & REMINGTON, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis*, 157:1-6.

LUPTÁKOVÁ, L.; BÁLENT, P.; VALENČÁKOVÁ, A.; NOVOTNÝ, F.; PETROVOVÁ, E. (2009). Serological Detection of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in Animals Kept in Households. *Folia Vet*, 53(2):87-89.

MACHADO, L.C. & FERREIRA, W.M. (2002?). Fundamentos de Conforto Ambiente aplicados à Cunicultura. Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária. Disponível em: <<http://www.coelhoecia.com.br/...Cunicultura.pdf>>, acessado em 05 de janeiro de 2015, às 13:00h.

MECCA, J.N.; MEIRELES, L.R.; ANDRADE-JUNIOR, H.F. 2011. Quality Control of *Toxoplasma gondii* in Meat Packages: Standardization of an Elisa Test and its Use for Detection in Rabbit Meat Cuts. *Meat Sci*, 88(3):584–589.

MITSUKA, R.; NAVARRO, I.T.; SILVA, A.C.B; BREGANÓ, J.W.; ALFIERI, A.; JANKEVICIUS, J.V.; VIDOTTO, O. (1998). *Toxoplasma gondii*: II. Caracterização antigênica de taquizoítos de oito amostras. *Braz J Vet Res An Sci*, 35(3):110-114.

MOORE, L. C. (2005). *A House Rabbit Primer: Understanding and Caring for your Companion Rabbit*. Santa Monica Press LLC, 211 p.

MORENO, B., COLLANTES-FERNANDEZ, E., VILLA, A., NAVARRO, A. REGIDOR-CERRILLO, J., ORTEGA-MORA, L.M. (2012). Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol*, 187:312-318.

MULLER P.B. (1982). *Bioclimatologia Aplicada aos Animais Domésticos*. 2ª edição. Porto Alegre: Sulina, 158 p.

MUNHOZ, A.D.; PINTO, A.R.S.; ALBUQUERQUE, G.R.; OLIVEIRA, F.C.R.; LOSS, Z.G.; LOPES, C.W.G. (2002). Toxoplasmose em coelhos: comparação do perfilbioquímico hepático com os achados patológicos em infecção pelo *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Latinoam*, 57(3-4):83-87.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Seances AcadSci*, 147:763–766.

NOBREGA, P.; TRAPP, E.E.; GIOVANNONI, M. (1952). Toxoplasmose Epizoótica em Coelhos. I, Ação da sulfadiazina. *Cienc Cult*, 4:35-44.

OKERMAN, L. (1994). *Diseases of Domestic Rabbits*. Second 1st ed., Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK, 152 p.

PATTON, N.M.; HGEN, K.W.; GORHAN, J.R.; FLATT, R.E. (2000). *Domestic rabbits, Diseases and Parasites a Pacific Northwest Extension Publication*. Orgon, Idobo, Washington PNW, 23 p.

- PARTANEN, P.; TURUNEN, H.J.; PAASIVUO, R. (1984). Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection. *J ClinMicrobiol*, 20(1):133-135.
- QUAN, J.H.; HASSAN, H.A.; CHA, G-H.; SHIN, D-W.; LEE, Y-H. (2009). Antigenemia and specific IgM and IgG antibody responses in rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol*, 47(4):409-412.
- QUINTON, J.F. (2005). *Novos Animais de Estimação: Pequenos Mamíferos*. Editora Roca Ltda, p. 210-211.
- REMINGTON, J.S. & CAVANAUGH, E.M. (1965). Isolation of the encysted form of *T. gondii* from human skeletal muscles and brain. *N Engl J Med*, 273:1308-1310.
- ROCA T. (1998). Aspectosfundamentales de cunicultura. In: PRIMER CONGRESO DE CUNICULTURA DE LAS AMÉRICAS, Montecilio. Primer Congreso de Cunicultura de Las Américas. Montecillo, Edo De México: Colégio de postgraduados.
- RODRIGUES, P.A.A. (2007). Cunicultura: Um estudo sobre a aplicação da Contabilidade de Custos voltada aos pequenos empresários. Universidade - Católica de São Paulo. Dissertação de Mestrado, 63 p.
- SABIN, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J Am Med Assoc*, 116:801–807.
- SABIN, A.B.; OLITSKY, P.K. (1937). *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science*, 85:336–338.
- SANTOS, J.A.; NOVLOSKI, G.; DA COSTA PEREIRA, E.F.; LANGENEGGER DE REZENDE, A.M. (1968). Estudo sobre a incidência e as lesões histopatológicas da toxoplasmose em mamíferos domésticos (cães e coelhos) no Brasil. *Pesq Agropec Bras*, 3:275-283.
- SEDLÁK, K.; LITERÁK, I.; FALDYNA, M.; TOMAN, M.; BENÁK, J. (2000). Fatal toxoplasmosis in brown hares (*Lepus europaeus*): possible reasons of their high susceptibility to the infection. *Vet Parasitol*. 93(1):13-28.

- SMITH, D.D. & FRENKEL, J.K. (1995). Prevalence of Antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and East Central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. *J Wildl Dis*, 31(1):15-21.
- SOUZA, C.; SOUZA, J.C.; FARIA, A.C. (2007). Métodos de atribuição de custos conjuntos aplicados à atividade de cunicultura: um estudo de caso. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, Lavras, 9(1):98-110.
- SPLENDORE, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita de' conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Scient*, 3:109-112.
- SPRINGER, W.T. (1997). Other blood and tissue protozoa. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, p. 900-911.
- SROKA, J.; ZWOLINSKI, J.; DUTKIEWICZ, J.; LUTY, S.T.; LATUSZYNSKA, J. (2003). Toxoplasmosis in Rabbits Confirmed by Strain Isolation: A Potential Risk of Infection Among Agricultural Workers. *Ann Agric Evniron Med*, 10:125-128.
- STUTZIN, M.; CONTRERAS, M.C.; SCHENONE, H. (2006). Epidemiology of toxoplasmosis in Chile. V. Prevalence of the infection in humans and domestic and wild animals, studied by indirect hemagglutination reaction, in the Juan Fernández Archipelago. V Region. *Bol Chil Parasitol*, 44:33-40.
- SUZUKI, Y.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S. (1990). Use of Acute-Stage Specific Antigens of *Toxoplasma gondii* for Serodiagnosis of Acute Toxoplasmosis. *J Clin Microb*, 28:1734-1738.
- WALLER, T.; BERGQUIST, N.R. (1982). Rapid Simultaneous Diagnosis of Toxoplasmosis and Encephalitozoonosis in Rabbits by Carbon Immunoassay. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 32(5):515-517.
- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. (1939). Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*, 89:226-227.

6. ARTIGO

Ocorrência de *Toxoplasma gondii* em coelhos domésticos na região Nordeste do Brasil

(A ser submetido ao periódico ACTA Tropica)

Ocorrência de *Toxoplasma gondii* em coelhos domésticos na região Nordeste do Brasil

RESUMO - Objetivou-se neste estudo realizar um levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em coelhos domésticos na Região Nordeste do Brasil. Foram coletadas amostras de sangue de 150 coelhos e fragmentos de cérebro, coração e diafragma de 54 coelhos de criações de subsistência. As amostras de soro foram submetidas ao teste sorológico (MAT) e as amostras de tecidos à análise molecular (PCR) e exame histopatológico. Os dados obtidos em questionários foram submetidos à análise dos fatores de risco. 6,7% (10/150) dos coelhos examinados foram positivos no MAT e 9,25% (5/54) das amostras foram positivas na PCR. Na histopatologia foram detectadas lesões associadas ao *T. gondii* caracterizadas principalmente por granuloma, infiltrados inflamatório mononuclear, áreas de degeneração e necrose no cérebro e coração. Os fatores de risco identificados foram: alimentação a base de vegetais crus – *Oddsratio*: 39,00 e contato entre gatos e coelhos – *Oddsratio*: 52,00. Esta é a primeira descrição de toxoplasmose em coelhos na região Nordeste do Brasil e os problemas de manejo identificados neste estudo devem ser corrigidos para reduzir a frequência de animais positivos nos plantéis.

Palavras-chave: Toxoplasmose, MAT, PCR, Saúde Pública.

ABSTRACT – This study aimed to hold a serosurvey of toxoplasmosis in domestic rabbits in the Northeastern of Brazil. Blood samples from 150 rabbits and tissue fragments (brain, heart and diaphragm) from 54 rabbits were collected in the state of Pernambuco. Serum samples were submitted to serologic testing (MAT) and tissue samples for molecular (PCR) and histopathological analysis. Data obtained in

questionnaires were submitted to analysis of risk factors. 6.7% (10/150) of the examined rabbits were positive in MAT and 9.25% (5/54) of the samples were positive in PCR. On histopathology were detected lesions associated with *T. gondii* mainly characterized by granuloma, mononuclear cell infiltrates, areas of degeneration and necrosis in brain and heart. The identified risk factors were: feeding based on raw vegetables - *Odds ratio*: 39.00; and contact between cats and rabbits - *Odds ratio*: 52.00. This is the first report of toxoplasmosis in rabbits in Northeastern Brazil and the identified management problems in this study should be corrected to reduce the frequency of positive animals in herds.

Keywords: Toxoplasmosis, MAT, PCR, Public Health.

1. Introdução

O sucesso em uma criação econômica de coelhos depende diretamente do estado higiênico-sanitário e da incidência e gravidade de certas enfermidades, principalmente as de caráter reprodutivo (Rodrigues, 2007), dentre as quais se destaca a toxoplasmose (Ahmmed et al., 2011).

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, sendo os mamíferos e as aves considerados hospedeiros intermediários e os felídeos os únicos hospedeiros definitivos (Dubey, 1988). *Toxoplasma gondii* foi inicialmente identificado por Nicolle e Manceaux (1908) em um roedor silvestre africano (*Ctenodactylus gundi*) na Tunísia, do qual o seu nome deriva, e em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) de laboratório por Splendore (1908) no Brasil.

A transmissão nos coelhos ocorre por meio de alimentos contaminados com oocistos do parasito, transmissão transplacentária e convívio desses animais com gatos domésticos infectados com *T. gondii* (Quinton, 2005; Moore, 2005).

O consumo da carne de coelho infectada e o convívio com esses animais são caracterizados como um risco à saúde pública, sendo a transmissão para humanos já relatada na Inglaterra, (Beverley et al., 1954), no Japão (Ishikawa et al.; 1990), no México (Figuroa-Castillo et al., 2006; Alvarado-Esquivel et al., 2011), na Espanha (Almeria et al., 2004) e no Egito (Harfoush e Tahoon, 2010). No Brasil, Mecca et al. (2011) detectaram a presença de *Toxoplasma gondii* em 1,35% das carnes de coelho para consumo, demonstrando a importância desse animal na cadeia epidemiológica da transmissão da toxoplasmose.

No Brasil existem poucos relatos sobre a infecção natural em coelhos, sendo descrita por Nobrega et al. (1952) que relataram um surto com evolução para o óbito em 46,5% (319/685) dos animais em um plantel no Instituto Biológico em São Paulo. Santos et al. (1968) detectaram *T. gondii* em seis coelhos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro e mais tarde, Dubey et al. (2011) relataram a presença de 9,52% (2/21) de coelhos positivos no Estado de Minas Gerais.

Na região Nordeste do Brasil não há dados sobre a ocorrência da toxoplasmose em coelhos. A ausência de estudos recentes e abrangentes compromete o estabelecimento de medidas preventivas para o controle desta enfermidade. Neste sentido, objetivou-se neste trabalho estudar a ocorrência de *T. gondii* em coelhos domésticos na Região Nordeste do Brasil e os fatores de risco associados à doença.

2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licença nº 080/2014.

Este estudo foi realizado em estabelecimentos de criação doméstica e/ou destinadas ao abate de coelhos no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil, no período de 2013 a 2014. As propriedades incluíam duas criações comerciais e seis criações domésticas, totalizando oito propriedades e cinco municípios (Tabela 1).

Para análise sorológica, após a contenção física dos animais e anti-sepsia foram coletadas amostras de sangue de 150 coelhos, da espécie *Oryctolagus cuniculus*, por meio de punção da veia auricular. Nas propriedades destinadas ao abate foram coletadas amostras de tecidos de 54 coelhos (cérebro, coração e diafragma) para análise molecular (PCR) e histopatológica.

Cada fragmento dos órgãos foi dividido em duas partes, onde a primeira foi fixada em formol tamponado a 10% para exame histopatológico e a segunda congelada a -80°C para análise molecular.

A escolha dos locais e o número de amostras foram realizados de forma não probabilística por conveniência (Thrusfield, 2004).

Tabela 1: Amostras biológicas coletadas de coelhos de acordo com o município e propriedades de origem no Estado de Pernambuco, Brasil.

Município	Propriedade	Total de Animais	Amostras coletadas	
			Sangue	Órgãos
Camaragibe	A	37	x	x
	B	16	x	x
	C	8	x	-
Recife	D	16	x	-
	E	40	x	-
São José da				
Coroa Grande	F	14	x	-

Fernando de Noronha	G	18	x	-
Vitória de Santo Antão	H	1	x	x

* x: coletado; - : não coletado.

2.2 Sorologia (MAT)

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos para a obtenção dos soros e esses foram armazenados a -20°C para posterior realização do teste sorológico. Os soros dos 150 animais coletados foram testados para anticorpos IgG de *T. gondii* utilizando a técnica do Teste de Aglutinação Modificado (MAT), com diluições de 1:25, 1:50 e 1:500 e ponto de corte 1:25 (Dubey e Desmonts, 1987).

2.3 PCR

Para a análise molecular, os fragmentos de cérebro, coração e diafragma foram inicialmente submetidos à extração de DNA com *kit* comercial “Quiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Quiagen®), seguindo o protocolo do fabricante.

Foram utilizados os *primers* TOX4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) para detecção do gene B1, amplificando uma região de 529 pares de base (pb), seguindo protocolo de reações descrito por Homan et al. (2000). Após a amplificação do DNA, os produtos de PCR foram analisados e quantificados em gel de agarose a 2%, com marcador de peso molecular 1 kb, corado com *bluegreen*, visualizado em luz ultravioleta e fotografado.

2.4 Exame Histopatológico

Para o estudo histopatológico, as amostras de cérebro, coração e diafragmados animais positivos na PCR foram desidratadas com álcoois antes de serem embebidos em parafina. Os blocos foram cortados em secções de 5µm, desparafinizados, reidratados, corados com Hematoxilina-Eosina e examinados em microscopia óptica. Os órgãos foram examinados para a detecção de lesões associadas à infecção por *Toxoplasma gondii* (Moreno et al., 2012).

2.5 Análise estatística

Para o estudo dos fatores de risco foram aplicados questionários epidemiológicos para a obtenção de dados individuais e gerais dos animais e das propriedades. Inicialmente foi realizada uma análise estatística descritiva, determinando-se medidas de dispersão para as frequências absolutas e relativas. Para análise dos fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* foi realizada inicialmente uma análise univariada das variáveis de interesse através do teste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher, quando necessário. Posteriormente foi realizada a regressão logística considerando como variável dependente o exame sorológico (positivo e negativo). As variáveis independentes ou explanatórias consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística $<0,20$. Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não fossem excluídos da análise (Hosmer e Lemeshow, 1989), sendo consideradas no modelo final as variáveis com $p < 0,05$. O programa EpiInfo™ 7 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

3. Resultados

3.1 Sorologia e PCR

A frequência de coelhos positivos na sorologia foi de 6,7% (10/150) e a detecção de DNA de *T. gondii* na PCR foi de 9,25% (5/54) (Tabela 2). O título de anticorpos observado foi de 1:500 em todos os coelhos e apenas um animal foi positivo simultaneamente na sorologia e PCR. A distribuição da frequência de animais sorologicamente positivos por município encontra-se na Tabela 3.

Tabela 2: Coelhos positivos para *T. gondii* no estado de Pernambuco, Brasil.

Animais Positivos (N°)*	Titulação (MAT)	Órgãos Positivos (PCR)
24	Negativo	Cérebro
25	Negativo	Cérebro
33	1:500	Cérebro/Diafragma
36	Negativo	Cérebro
37	Negativo	Diafragma
78	1:500	-
80	1:500	-
81	1:500	-
84	1:500	-
86	1:500	-
87	1:500	-
88	1:500	-
142	1:500	-
196	1:500	-

*Número de identificação dos animais.

Tabela 3: Distribuição da frequência de anticorpos de *T. gondii* em coelhos por município no estado de Pernambuco, Brasil.

Município	Total (n)	Positivo	Negativo
------------------	------------------	-----------------	-----------------

		F.A.	F.R (%)	F.A.	F.R. (%)
Camaragibe	61	1	1,6	60	98,4
Recife	56	-	-	56	100,00
São José da Coroa Grande	14	7	50,0	7	50,0
Fernando de Noronha	18	2	11,1	16	88,9
Vitória de Santo Antão	1	-	-	1	100,0

3.2 Exame Histopatológico

Foram encontradas lesões associadas ao *T. gondii* em algumas amostras de tecidos dos coelhos positivos na PCR (Figura 1). As lesões cerebrais foram caracterizadas por inflamação multifocal, edema, necrose, presença de granuloma circundado por células com núcleo picnótico e células grandes com aspecto epitelióide, áreas de endotélio reativo nos vasos ao redor com marginação leucocitária, manguito perivascular e microglia reativa.

O coração foi o tecido que apresentou maior frequência de alterações com presença de infiltrados inflamatórios perivasculares mononucleares multifocais, invasão e necrose segmentar de fibras musculares, miocardite multifocal granulomatosa, hemorragia multifocal do miocárdio e de região subepicárdica, degeneração mixomatóide caracterizada por vacuolização do miocárdio, presença de macrófagos, infiltrado neutrofílico, edema, endocardite e lesão valvular, áreas com endotélio reativo e evidenciação de espaçamentos de fibras musculares. No diafragma foram observadas degenerações do tecido muscular, além de discreto infiltrado de células polimorfonucleares. Não foi observada a presença de cistos de *Toxoplasma gondii* em

nenhuma amostra analisada. Os animais negativos no MAT e na PCR não apresentaram alterações significativas no exame histopatológico.

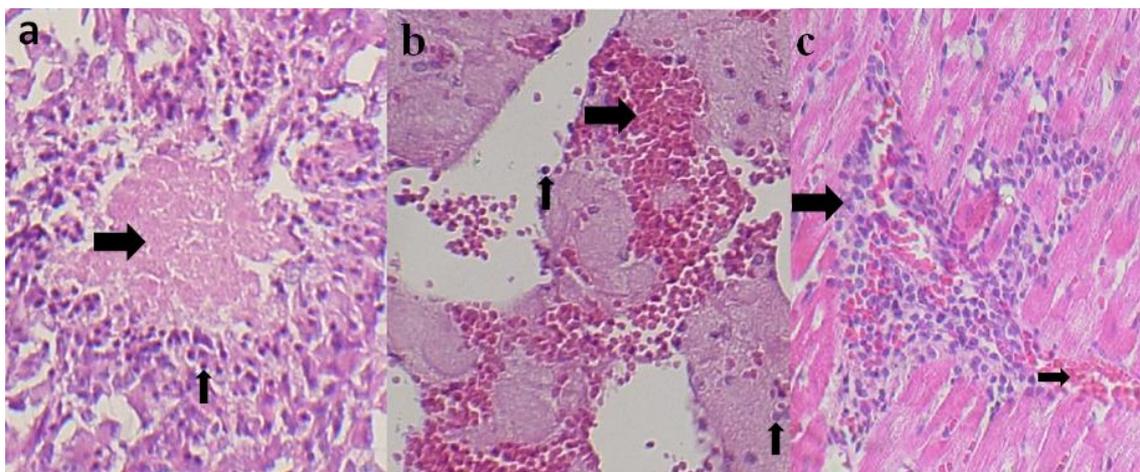


Figura 1: Amostras de tecido de coelhos positivos para *Toxoplasma gondii*. Lâminas coradas através de Hematoxilina-Eosina (HE). **a:** Granuloma em tecido cerebral. Área apresentando maior vascularidade com centro de caráter eosinofílico acelular indicativo de necrose (seta grande), circundado por células com núcleo picnótico (seta pequena) e células grandes com aspecto epitelióide (63x). **b:** Lesão vascular com hemorragia de miocárdio (seta grande), infiltrado neutrofílico (setas pequenas) e aspecto edematoso. Presença de endocardite valvular, células mononucleadas e degeneração mixomatóide (aspecto vacuolizado) (63x). **c:** infiltrado inflamatório perivascular mononuclear multifocal (seta grande) com focos hemorrágicos em miocárdio (seta pequena). Invasão e necrose segmentar de fibras musculares (160x).

3.3 Estudo de Fatores de Risco

O resultado da análise univariada dos fatores associadas à infecção por *T. gondii* em coelhos encontra-se na Tabela 4. Na regressão logística foram confirmadas como fatores de risco as variáveis: alimentação a base de vegetais crus (*Odds ratio*: 39,00) e contato de coelhos com gatos (*Odds ratio*: 52,00) (Tabela 5).

Tabela 4. Análise univariada dos fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em coelhos.

Variável	N	MAT	OR ^a (I.C. 95% ^b)	Valor de p
Sexo				
Macho	62	3 (4,8%)	0,58 (0,09 – 2,71)	0,343
Fêmea	88	7 (8,0%)		
Raça				
Nova Zelândia	136	10 (7,4%)	-	0,363
Lion Head	14	0 (0,0%)		
Idade (dias)				
<100	37	1 (2,7%)	-	0,278
Entre 101 a 365 dias	63	0 (0,0%)		
> 365	21	1 (4,8%)		
Alimentação				
Peletizada	118	1 (0,8%)	0,02 (0,00 – 0,14)	<0,000
Vegetais crus	32	9 (28,1%)		
Criação consorciada com outras espécies				
Sim	26	2 (7,7%)	1,20 (0,11 – 6,59)	0,545
Não	124	8 (6,5%)		
Fonte de água				
Água tratada	88	9 (10,2%)	-	0,110
Poços	24	0 (0,0%)		
Fontes naturais *	37	1 (2,7%)		
Fornecimento de alimentos				
Cochos coletivos	122	2 (1,6%)	0,04 (0,00 – 0,20)	<0,000
No solo	28	8 (28,6%)		
Gatos têm contato com coelhos				
Sim	18	8 (44,4%)	52,0 (9,85 – 373,42)	<0,000
Não	132	2 (1,5%)		
Presença de gatos na propriedade				
Sim	134	10 (7,5%)	-	0,311
Não	16	0 (0,0%)		

Área geográfica

Urbana	88	9 (10,2%)	6,94 (0,91 – 309,49)	0,034
Peri-urbana	62	1 (1,6%)		

Tipo de criação

Gaiola suspensa	102	1 (1,0%)	0,04 (0,00 – 0,27)	<0,000
No solo	48	9 (18,8%)		

*Riachos, rios e açudes / ^aOdds ratio, ^b Intervalo de confiança de 95%

Tabela 5. Regressão logística dos fatores de risco associados à infecção pelo *T. gondii* em coelhos no estado de Pernambuco, Brasil.

VARIÁVEIS	Valor de p	OR ^a	IC 95% ^b
Alimentação a base de vegetais crus	0,016	39,00	1,94– 782,51
Contato entre gatos e coelhos	0,048	52,00	9,71 – 278,36

^aOdds ratio, ^b Intervalo de confiança de 95%

4. Discussão

Este é o primeiro relato da detecção de *Toxoplasma gondii* em coelhos naturalmente infectados na região Nordeste do Brasil, sendo esta uma das poucas pesquisas realizadas no Brasil, apesar do consumo alimentar desta espécie ser frequente no país.

Anticorpos contra *T. gondii* através do MAT foram detectados em 6,7% (10/150) dos coelhos analisados. Este resultado é semelhante aos estudos realizados por Dubey et al. (2011) que detectaram 9,52% (2/21) coelhos positivos no Estado de Minas Gerais, Brasil. Na Espanha, Almería et al. (2004) obtiveram positividade em 14,2% (65/456) dos coelhos analisados; Alvarado-Esquível et al. (2013) obtiveram positividade em 16,3% (70/429) coelhos no México e Sroka et al. (2003) obtiveram positividade em 22,2% (2/9) coelhos naturalmente infectados na Polônia.

Outros trabalhos, empregando outras técnicas sorológicas também relataram índices semelhantes aos obtidos no presente estudo. No Teste de Hemaglutinação Indireta (IHAT), Ahmmed et al. (2011) detectaram positividade em 11% (11/100) e Ashmawy et al. (2011) em 11,34% (22/194) no Egito; Hejlícek et al. (1997) detectaram 8% (6/79) na República Tcheca e Stutzin et al. (2006) encontraram 8% (4/50) no Chile na técnica do Corante de Sabin-Feldman Modificado (DT). Em estudo mais recente realizado por Neumayerova et al. (2014) na República Tcheca e Eslováquia foram detectados anticorpos contra *T. gondii* em 10,1% (99/981) de coelhos naturalmente infectados no ELISA.

Outros autores relataram índices mais elevados de soropositividade que o observado no presente estudo, como Figueroa-Castillo et al. (2006) que detectaram 26,9% (77/286) de positividade em fazendas no México e HarfousheTahoon (2010) em 37,5% dos coelhos avaliados no Egito. O estudo que detectou maior frequência de coelhos sorologicamente positivos foi realizado na Eslováquia por Luptakova et al. (2009) com 71,4% (15/21) positivos na técnica de fixação de complemento.

Toxoplasma gondii foi detectado em quatro amostras de cérebro e duas de diafragma na PCR. A presença do parasito em coelhos naturalmente infectados já foi descrita por Sroka et al. (2003) na Polônia e por Dubey et al. (2011) no Brasil. A maioria dos animais positivos na PCR foi negativo na sorologia (4/5) o que pode estar relacionado com a sensibilidade das técnicas utilizadas (Silva et al., 2015; Bin Dajeme Almushait,2012). Além disso, a produção de anticorpos em coelhos naturalmente infectados ainda não está bem estabelecida, com descrições apenas em estudos de caráter experimental (Hassl et al., 1987; Gustafsson et al.,1997b;Barakat, 2007;Quan et al. 2009). Quan et al. (2009) ainda sugerem que a transmissão

transplacentária do *T. gondii* em coelhos pode levar a uma produção deficiente de anticorpos, sendo necessária a associação do diagnóstico molecular para sua detecção.

Os coelhos positivos na PCR apresentaram no exame histopatológico lesões compatíveis com a infecção por *T. gondii*. Em tecido cerebral foi observada, entre outros achados, a presença de infiltrado inflamatório com presença de leucócitos, manguito perivascular e necrose, sendo estes achados semelhantes àqueles relatados por Ahmmed et al. (2011) em coelhos naturalmente infectados. A presença de granuloma cerebral observada já foi anteriormente relatada em coelhos na infecção experimental por *T. gondii* (Haziroulu et al., 2003). As lesões no tecido cardíaco e músculo esquelético caracterizadas por presença de infiltrados inflamatórios perivasculares mononucleares multifocais também foram descritas por Gustafsson et al. (1997a) em coelhos infectados experimentalmente.

A propriedade localizada no município de São José da Coroa Grande foi a que apresentou maior frequência de coelhos positivos (50%). Nesta propriedade, o fornecimento de vegetais crus e a presença de gatos nas proximidades da criação foram observados. Segundo Harfoush e Tahoou (2010), uma alta frequência de coelhos positivos indica contaminação do solo com oocistos e o contato com felinos em um mesmo ambiente é importante na cadeia de transmissão de *T. gondii*.

Neste estudo, o fornecimento de vegetais crus e a presença de gatos nas criações contribuíram para a transmissão desse protozoário nos criatórios. Outros autores já identificaram os alimentos caseiros contaminados como fatores de risco para toxoplasmose em coelhos como Almeria et al. (2004) e Alvarado-Esquivel et al. (2013).

A presença de animais positivos para *T. gondii* com ausência de sinais clínicos demonstra que o coelho é uma importante fonte de infecção para o homem. Resultados

semelhantes foram descritos por Cox et al. (1981), Dubey et al. (1992) e Gustafsson et al. (1997a).

Esta é o primeiro registro de toxoplasmose em coelhos na Região Nordeste do Brasil e os problemas de manejo identificados neste estudo devem ser corrigidos para reduzir a frequência de animais positivos nos plantéis.

REFERÊNCIAS

Ahmed, N.E., El-Akabawy, L.M., Ramadan, M.Y., Kandeel, N.M. 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in rabbits in Egypt. Benha Vet. Med. J. - Special Issue. 191-193.

Almeria, S., Calvete, C., Pages, A., Gauss, C., Dubey, J.P. 2004. Factors affecting the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Spain. Vet. Parasitol. 123, 265–270.

Alvarado-Esquivel, C., Torres-Berumen, J.L., Estrada-Martínez, S., Liesenfeld, O., Mercado-Suarez, M.F. 2011. *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case–control study in a northern Mexican population. Parasit. Vectors. 4, 75.

Alvarado-Esquivel, C., Alvarado-Esquivel, D., Villena, I., Dubey, J.P. 2013. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic rabbits in Durango State, Mexico. Prev.Vet. Med. 111 (3-4), 325-328.

Ashmawy, K.L., Abuakkada, S.S., Awad, A.M. 2011. Seroprevalence of Antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in Farmed Domestic Rabbits in Egypt. Zoonoses Public Health, 58 (5), 357–364.

- Barakat, A.M.A. 2007. Some diagnostic study on male New Zealand rabbit experimentally infected with *Toxoplasma gondii* strain. Glob. Vet. 1 (1), 17-23.
- Beverley, J.K., Caley, J.P., Roseman, C.J. 1954. Human toxoplasmosis infection. J. Hyg. 52, 37-46.
- Bin Dajem, S.M., Almushait, M.A. 2012. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by PCR in blood samples collected from pregnant saudi women from the Aseer region, Saudi Arabia. Ann. Saudi. Med. 32 (5), 507-512.
- Cox, J.C.; Edmonds, J.W., Rosamond, C.H.S. 1981. Toxoplasmosis and the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia with suggested mechanisms for dissemination of oocysts. J. Hyg. 87, 331-337.
- Dubey, J.P., Desmonts, G. 1987. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. Equine Vet. J. 19, 337-339.
- Dubey, J.P. 1988. Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton. 318 p.
- Dubey, J.P.; Brown, C.A.; Carpenter, J.L.; Moore, J.J. 1992. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. Vet. Parasitol. 44, 305-309.
- Dubey, J.P., Passos, L.M.F., Rajendran, C., Ferreira, L.R., Gennari, S.M., Su, C. 2011. Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from feral guinea fowl (*Numida meleagris*) and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Brazil. J. Parasitol. 97 (5), 842-845.
- Figueroa-Castillo, J.A., Duarte-Rosas, V., Juarez-Acevedo, M., Luna-Pasten, H., Correa, D. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from Mexico. J. Parasitol. 92 (2), 394-395.

Gustafsson, K., Uggla, A., Jarplid, B. 1997a. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). II. Pathology. J. Comp. Pathol. 117 (4), 351-360.

Gustafsson, K., Wattrang, E., Fossum, C., Heegaard, P.M., Lind, P., Uggla, A. 1997b. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (*Lepus timidus*) and domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). II. Early immune reactions. J. Comp. Pathol. 117 (4), 361-369.

Harfoush, M., Tahoon, Ael-N. 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic ducks, free-range chickens, turkeys and rabbits in Kafr El-Sheikh Governorate Egypt. J. Egypt. Soc.Parasitol. 40 (2), 295-302.

Hassl, A., Auer, H., Hermentin, K., Picher, O., Aspöck, H. 1987. Experimental studies on circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in intermediate hosts: Criteria for detection and structural properties. Zbl. Bakt.Hyg. 263, 625-634.

Haziroulu, R., Altintas, K., Atasever, A., Gulbahar, M.Y. Tunca, O.K.R. 2003. Pathological and immunohistochemical studies in rabbits experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 27, 285-293

Hejlícek, K., Literak, I., Nezval, J. 1997. Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. J. Wildlife Dis. 33, 480–485.

Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H. 2000. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int. J. Parasitol. 30(1), 69-75.

Hosmer, D.W., Lemeshow, S. 1989. Applied Logistic Regression. Wiley, New York. 307p.

Ishikawa, T., Nishino, H., Ohara, M., Shimosato, T., Naba, K. 1990. The identification of a rabbit-transmitted cervical Toxoplasmosis mimicking malignant lymphoma. Am. J. Clin. Pathol. 94, 107-110.

Luptakova, L., Balent, P., Valencakova, A., Novotny, F., Petrovova, E. 2009. Serological detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in animals kept in households. Folia Vet. 53 (2), 87-89.

Mecca, J.N.; Meireles, L.R.; Andrade-Junior, H.F. 2011. Quality control of *Toxoplasma gondii* in meat packages: Standardization of an ELISA test and its use for detection in rabbit meat cuts. Meat Sci. 88 (3), 584–589.

Moore, L. C. 2005. A House Rabbit Primer: Understanding and Caring for your Companion Rabbit. Santa Monica Press LLC. p. 211.

Moreno, B., Collantes-Fernandez, E., Villa, A., Navarro, A. Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M. 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in ovine and caprine abortions. Vet. Parasitol. 187, 312-318.

Neumayerova, H., Jurankova, J., Jeklova, E., Kudlackova, A., Faldyna, M., Kovarcik, K., Janova, E., Koudela, B. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. Vet. Parasitol. 204, 184-190.

Nicolle, C., Manceaux, L. 1908. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C. R. Seances Acad. Sci. 147, 763–766.

Nobrega, P., Trapp, E.E., Giovannoni, M. 1952. Toxoplasmose epizootica em coelhos. I, Ação da sulfadiazina. Ciênc. Cult. 4, 35-44.

Quan, J.H., Hassan, H.A., Cha, G-H., Shin, D-W., Lee, Y-H. 2009. Antigenemia and specific IgM and IgG antibody responses in rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. Korean J. Parasitol. 47 (4), 409-412.

Quinton, J.F. 2005. Novos animais de estimação: pequenos mamíferos. Editora Roca Ltda. pp. 210-211.

Rodrigues, P.A.A. 2007. Cunicultura: Um estudo sobre a aplicação da contabilidade de custos voltada aos pequenos empresários. Universidade - Católica de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 63 p.

Santos, J.A., Novloski, G., Da Costa Pereira, E.F., Langenegger De Rezende, A.M. 1968. Estudo sobre a incidência e as lesões histopatológicas da toxoplasmose em mamíferos domésticos (cães e coelhos) no Brasil. Pesq. Agropec. Bras. 3, 275-283.

Silva, J.G., Alves, B.H.L.S., Melo, R.P.B., Kim, P.C.P, Souza-Neto, O.L., Bezerra, M.J.G., Sá, SG., Mota, R.A. 2015. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. Acta Trop. 42, 145–148.

Splendore, A. 1908. Um nuovo protozooparassita de' conigli. Incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminare. Rev. Soc. Scient. 3, 109–112.

Stutzin, M., Contreras, M.C., Schenone, H. 2006. Epidemiology of toxoplasmosis in Chile.V. Prevalence of the infection in humans and domestic and wild animals, studied

by indirect hemagglutination reaction, in the Juan Fernández Archipelago. V Region.
Bol. Chil. Parasitol. 44, 33-40.

Sroka, J., Zwolinski, J., Dutkiewicz, J., Luty, S.T., Latuszynska, J. 2003. Toxoplasmosis
in rabbits confirmed by strain isolation: A potential risk of infection among agricultural
workers. Ann. Agric. Environ. Med. 10, 125-128.

Thrusfield, M.V. 2004. Epidemiologia Veterinária. 2ª ed. Ed. Roca, São Paulo. 556 p.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da Toxoplasmose em coelhos naturalmente infectados em Pernambuco demonstrou importância quanto a sua detecção nas diferentes técnicas de diagnóstico, uma vez que esses animais podem adquirir a infecção sem apresentar sinais aparentes, podendo se comportar como fonte de infecção para todos os hospedeiros, inclusive o homem.

A identificação de coelhos positivos na sorologia e PCR e a identificação dos fatores de risco associados ao manejo alimentar dos coelhos deve ser foco para a implementação de medidas higiênico-sanitárias nas criações para o controle da toxoplasmose, sugerindo-se a importância de novos estudos que devem ser realizados para acrescentar informações sobre a epidemiologia desta importante zoonose.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A: Parecer de Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto descrito abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	080/2014
Número do processo	23082.007270/2013
Data de emissão da licença	07 de Julho de 2014
Título do Projeto	Detecção de DNA genômico de <i>Toxoplasma gondii</i> e Anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma</i> em coelhos domésticos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) no estado de Pernambuco, Brasil.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	Débora Costa Viegas de Lima; José Wilton Pinheiro Júnior.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Coelhos; total de 100 animais


Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

8.2 ANEXO B: Normas para submissão ao periódico ACTA Tropica

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering).

Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix,

Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but IF essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types:

TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first Page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See

<http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medicalstyle images, as well as a full range of charts, tables and

graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages,

authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically IF necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files Will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see <http://www.elsevier.com/googlemaps>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

8.3 ANEXO C: Questionário para Coleta de Amostras de Campo

Nome da Propriedade: _____ Nº _____ Nº Ficha: _____
Município: _____ Cidade: _____
Proprietário: _____ Contato: _____
Investigador: _____ Data: ____/____/____

Informações Gerais Propriedade:

Área: Urbana: Rural: Peri-Urbana:

Quantidade de animais (coelhos) na propriedade:

Matrizes: _____ Machos: _____ Fêmeas: _____ Jovens: _____

Raça: _____

Tipo de Criação: Gaiolas no Chão: Gaiolas Suspensas: Cercados:

Animais são criados em grupos: Sim: Não:

Presença de Gatos na Propriedade: Sim: Não:

Os gatos têm contato com os coelhos: Sim: Não:

Presença de Animais Silvestres na Propriedade: Sim: Não:

Presença de Roedores na Propriedade: Sim: Não:

Tipo(s) de Exploração:

Pet: Carne: Pele e Pêlos: Laboratorial:

Origem dos Animais: _____

Alimentação:

Tipo de Alimentação: Caseira: Ração Peletizada:

Fornecimento: Cochos: Chão:

Animais defecam no Local do alimento: Sim: Não:

Armazenamento dos Alimentos: Tambor: Sacos: Baldes:

Presença de Gatos Próximos aos Alimentos: Sim: Não:

Alimentos Ficam Expostos: Sim: Não:

Fornecimento de Água: Bebedouros Suspensos: Cochos:

Animais defecam no local da Água: Sim: Não:

Fonte de Água:

Água Tratada: Córregos e Riachos: Açudes: Poços:

Limpeza e Higiene:

Limpeza de Cochos e Bebedouros: Diariamente: Dias Alternados:
Semanalmente: Quinzenalmente: Mensalmente:

Limpeza das Instalações: Diariamente: Dias Alternados:
Semanalmente: Quinzenalmente: Mensalmente:

Utiliza Desinfetante para Limpeza Geral: Sim: Não:

Realiza Sistema de Quarentena: Sim: Não:

Sanidade dos Animais:

Histórico de Doenças Neurológicas: Sim: Não:

Histórico de Doenças Reprodutivas: Sim: Não:

Histórico de Diarréia: Sim: Não:

Uso de Medicções: Sim: Não:

Quais: _____

Vacinação: Mixomatose: DHV: Pasteurelose: