



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

***Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM TECIDO CEREBRAL DE RAPOSA-DO-CAMPO (*Pseudalopex vetulus*) NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL**

MARIA CECÍLIA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

RECIFE
2013



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

***Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM TECIDO CEREBRAL DE RAPOSA-DO-CAMPO (*Pseudalopex vetulus*) NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL**

MARIA CECÍLIA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

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.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Carvalho Maia

Co-orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE
2013

Ficha catalográfica

N244n Nascimento, Maria Cecília Oliveira do
Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* em tecido cerebral de raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) no Estado da Paraíba, Brasil / Maria Cecília Oliveira do Nascimento. – Recife, 2013.
42 f. : il.

Orientadora: Rita de Cássia Carvalho Maia.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.

Referências.

1. *Neospora caninum* 2. *Toxoplasma gondii* 3. *Pseudalopex vetulus* 4. Canídeo 5. Identificação 6. DNA I. Maia, Rita de Cássia Carvalho, orientadora II. Título

CDD 636.089

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

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

***Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM TECIDO CEREBRAL DE RAPOSA-
 DO-CAMPO (*Pseudalopex vetulus*) NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL**

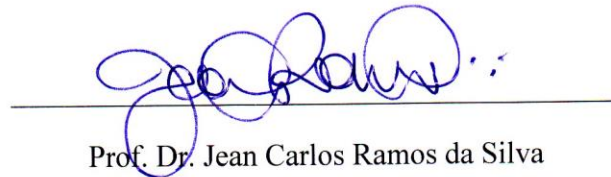


Maria Cecília Oliveira do Nascimento
 Recife, 19 de fevereiro de 2013

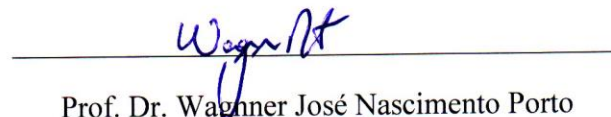
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Rita de Cássia Carvalho Maia (Orientadora)
 Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE



Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva
 Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE



Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto
 Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Dr.^a. Érica Paes Barreto Xavier de Moraes Oliveira
 Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Ramos e Elci,
por todo amor, carinho e paciência.
Amo vocês!

Ao meu irmão Felipe e minha cunhada Olivia,
por todos os momentos de descontração.
Amo vocês!

Aos meus amigos queridos
por estarem sempre ao meu lado.
Amo vocês!

"Superar o fácil não tem mérito, é obrigação; vencer o difícil é glorificante;
ultrapassar o outrora impossível é esplendoroso." (Alexandre Fonteles)

AGRADECIMENTOS

À professora Rita Maia, que além de orientadora é amiga e mãe de todos nós. Muito obrigada por tudo. Por sempre acreditar em mim e me fazer chegar até aqui.

Ao professor Rinaldo Mota, que me acolheu de coração aberto em seu laboratório em um momento muito difícil pra mim. Muito obrigada por todo apoio que o senhor me deu, nunca vou esquecer.

Ao professor Roberto Soares, por ter aberto as portas do mestrado pra mim. Aprendi muito com o senhor em todos estes anos.

À Luana Silva e ao Prof. Albério Gomes da Universidade Federal de Campina Grande (Patos-PB) pela ajuda com as amostras e apoio durante todo o processo e execução do trabalho. Luana, agradeço em especial a você porque além de colega de laboratório, se tornou uma grande amiga.

Aos meus amigos e irmãos do Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas (LDIC). Muito obrigada por tudo. Não tenho palavras pra dizer o quanto vocês são importantes pra mim. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Este trabalho é nosso!

À professora Marleyne Amorim, por toda dedicação que a senhora tem no PGCAT. Sempre nos orientando e facilitando pra que tudo saia da melhor forma possível. Parabéns pelo excelente trabalho que a senhora está promovendo na pós-graduação.

À todos os professores que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho funcionasse.

À todos os funcionários da SOLL, por sempre nos dar apoio quando precisamos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN), por todo o apoio que me deram, seja no trabalho, seja em uma conversa casual, vocês foram muito importantes nesta jornada. Em especial à Ana Lisa por toda ajuda na confecção da árvore filogenética. Muito obrigada, Ana!

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ - PE) pela ajuda no sequenciamento das amostras.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho de dissertação teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no financiamento da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Raposa-do-campo (<i>Pseudalopex vetulus</i>)	15
2.1.1. Hábitos	15
2.1.2. Características físicas	15
2.2. <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.3. Ciclo Biológico	16
2.4. Epidemiologia	19
2.5. PCR no Diagnóstico de <i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i> em animais selvagens	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
3. OBJETIVOS	28
3.1. Geral	28
3.2. Específicos	28
4. ARTIGO	29
5. CONCLUSÃO	42

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Ciclo biológico do *N. caninum*. Fonte: Modificado de DUBEY (2003)_____ 17

Figura 2 Ciclo biológico do *T. gondii*. Fonte: Modificado de DUBEY et al. (1998)____ 18

ARTIGO

Figura 1 Mapa do Estado da Paraíba destacando os municípios com raposas positivas para *N. caninum*_____ 33

Figura 2 Mapa do Estado da Paraíba destacando os municípios com raposas positivas para *T. gondii*_____ 34

Figura 3 Árvore filogenética do *Neospora caninum*_____ 35

Figura 4 Árvore filogenética do *Toxoplasma gondii*_____ 36

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CDV – Vírus da Cinomose Canina

ddH₂O – Água ultra pura

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

TAE – Tris-Acetato-EDTA

RESUMO

A raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), no passado denominada *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* ou apenas *Lycalopex vetulus*, é um canídeo selvagem nativo do Brasil e encontrado comumente no semiárido nordestino convivendo em contato com rebanhos. *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, e, apesar das diferenças filogenéticas, biológicas, estruturais e antigênicas são bastante relacionados um com o outro, sendo, no passado, considerados uma única espécie. Estudos têm demonstrado a ocorrência de *T. gondii* e *N. caninum* em canídeos domésticos e selvagens, demonstrando que algumas dessas espécies são consideradas hospedeiras intermediárias e definitivas desses protozoários. Objetivou-se neste estudo pesquisar a presença do DNA de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em amostras de tecido cerebral de 49 raposas-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), encontradas mortas nas rodovias no sertão paraibano. As amostras foram processadas para a extração do material genético e em seguida submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos para *T. gondii* e *N. caninum*. Das amostras analisadas, 14,3% e 12,2% foram positivas para *T. gondii* e *N. caninum*, respectivamente e a identidade molecular dos produtos amplificados foi confirmada por sequenciamento. Com este trabalho concluiu-se que a raposa-do-campo (*P. vetulus*) é hospedeira intermediária de *Neospora caninum* e de *Toxoplasma gondii*, porém mais estudos nesta área são necessários para observar a participação desta espécie no ciclo selvagem e doméstico destes parasitos.

ABSTRACT

The hoary fox (*Pseudalopex vetulus*), in the past called *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* or just *Lycalopex vetulus*, is a wild canid native of Brazil and commonly found in the semiarid northeastern area living in contact with cattle. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* are protozoa belonging to the phylum Apicomplexa, and despite phylogenetic differences, biological, structural, and antigenic, they are closely related to each other, and in the past considered a single species. Studies have demonstrated the occurrence of *T. gondii* and *N. caninum* in domestic and wild canids, showing that some of these animals as well as intermediate hosts stand as definitive hosts. In the present study, we used brain tissue samples from 49 hoary fox (*Pseudalopex vetulus*) found dead in the countryside roads of Paraíba. These samples were processed for extraction of genetic material and then subjected to polymerase chain reaction (PCR) using specific primers for *T. gondii* and *N. caninum*. Was observed in 14.3% and 12.2% of animals the presence of *T. gondii* and *N. caninum* respectively and the molecular identity of the amplified products was confirmed by sequencing. This work concluded that the hoary fox (*P. vetulus*) is an intermediate host of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, but more studies are needed in this area to observe the involvement of this species in the wild and domestic cycle of these parasites.

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa (DUBEY, 1977, DUBEY et al., 2002), possuem um ciclo heteroxeno onde são formados os taquizoítos e os cistos contendo os bradizoítos nos tecidos dos hospedeiros intermediários, além dos oocistos excretados no ambiente pelos hospedeiros definitivos através das fezes (MILLER et al., 1972; DUBEY et al., 2007b).

A raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), no passado denominada *Dusicyon* (*Lycalopex*) *vetulus* ou apenas *Lycalopex vetulus*, é um canídeo selvagem nativo do Brasil e encontrado comumente no semiárido nordestino convivendo em contato com ruminantes (EISENBERG & REDFORD, 1999; DANTAS-TORRES et al., 2010).

Em canídeos selvagens é frequente a infecção por *T. gondii*. Por ter um hábito alimentar constituído essencialmente de carne e por ser um predador de pequenos animais como coelhos, roedores e pequenos ruminantes, os canídeos selvagens podem se infectar com cistos presentes nos tecidos de hospedeiros intermediários, além do contato direto com o ambiente contaminado com os oocistos (LINDSAY et al., 1996).

Gondim et al. (2004) relataram a existência de um ciclo selvagem de *N. caninum*, demonstrando também uma relação com o ciclo doméstico. Sendo assim, a exposição de bovinos aos canídeos selvagens tem sido identificada como fator de risco para a infecção por *N. caninum* em rebanhos, refletindo grande importância destes animais na transmissão deste protozoário (BARLING et al., 2000; GONDIM et al., 2004; ROSYPAL & LINDSAY, 2005). Um hospedeiro definitivo elimina aproximadamente 500.000 oocistos após a infecção, tornando a transmissão horizontal extremamente importante no ciclo, pois essa quantidade de oocistos pode infectar todo um rebanho, levando ao aumento do número de abortos e gerando grandes perdas econômicas (GONDIM et al., 2002).

Alguns estudos já relataram a presença do *N. caninum* e do *T. gondii* em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (WOLFE et al., 2001; ALMERIA et al., 2002; WAPENAAR et al., 2007), demonstrando que esses animais são hospedeiros intermediários para os dois agentes. Neste seguimento, sendo a raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) um membro da mesma família da raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) pode-se considerar a hipótese dessa espécie ser também um hospedeiro intermediário.

No Brasil não existem estudos sobre a ocorrência de *T. gondii* e *N. caninum* em raposas-do-campo o que estimulou a realização desta pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*)

A raposa-do-campo (*P. vetulus*) é um canídeo selvagem endêmico no Brasil. Está presente nos estados do Mato Grosso do Sul, Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco (EISENBERG & REDFORD, 1999; DALPONTE & COURTENAY, 2004; DANTAS-TORRE et al., 2010). Há relatos também da sua presença em áreas de silvicultura (ROCHA et al., 2005). Dalponte (1997) relatou que a raposa-do-campo (*P. vetulus*) é um dos canídeos brasileiros menos estudados.

2.1.1 Hábitos

Possui hábito noturno e crepuscular. Geralmente são encontradas vivendo isoladas, em pares ou a fêmea com seus filhotes (NOWAK, 1999). Alimenta-se de aves, insetos, pequenos mamíferos, répteis e frutos (FONSECA et al., 1996; DALPONTE, 1997). Estes animais apresentam hábitos monógamos; em vida livre, as fêmeas têm seus filhotes nos meses de julho e agosto, parindo de quatro a cinco filhotes. Os animais tornam-se independentes das mães com cerca de nove a dez meses vivendo em áreas próximas às que viveram nos primeiros meses de vida (DALPONTE & COURTENAY, 2004).

2.1.2 Características físicas

É considerada um dos menores canídeos existente na América do Sul. Seu corpo mede entre 58,5 e 64 cm e sua cauda varia entre 28 e 32 cm, chegando a pesar até 4,0kg (CABRERA & YEPES, 1960; NOWAK, 1999). Sua pelagem é vermelho-amarronzada na cabeça e cinza-amarronzada no dorso e os membros são esbranquiçados. Apresenta também uma faixa escura que se estende da nuca até a extremidade da cauda, porém é mais aparente nos machos adultos (VIEIRA, 1946; NOWAK, 1999; DALPONTE & COURTENAY, 2004).

2.2 *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY, 1977, DUBEY et al., 2002).

Splendore (1908) identificou *T. gondii* pela primeira vez em coelhos no Instituto Biológico de São Paulo no Brasil e no mesmo ano Nicolle & Manceaux (1908) identificaram no Instituto Pasteur na Tunísia no *Ctenodactylus gondi*.

N. caninum foi identificado em um cão na Noruega que apresentava sintomatologia neurológica, mas era soronegativo para *T. gondii* (BJËRKAS et al., 1984). Finalmente, em 1988, em um estudo realizado por Dubey et al. (1988) foram identificadas diferenças entre *T. gondii* e o novo organismo encontrado; após análises morfológicas e imunohistoquímicas foi proposto um novo gênero *Neospora* e espécie *N. caninum* (BJËRKAS & DUBEY, 1991).

N. caninum e *T. gondii* possuem características fenotípicas bastante semelhantes e são estritamente relacionados, porém, apresentam diferenças biológicas, estruturais e antigênicas. Onde, só é possível fazer a diferenciação destas espécies após a realização de análises moleculares (MUGRIDGE et al., 1999; SLAPETA et al., 2002).

2.3 Ciclo Biológico

N. caninum e *T. gondii* possuem uma grande variedade de hospedeiros intermediários como as aves e vários mamíferos tanto domésticos quanto selvagens (TENTER et al., 2000; DUBEY et al., 2002).

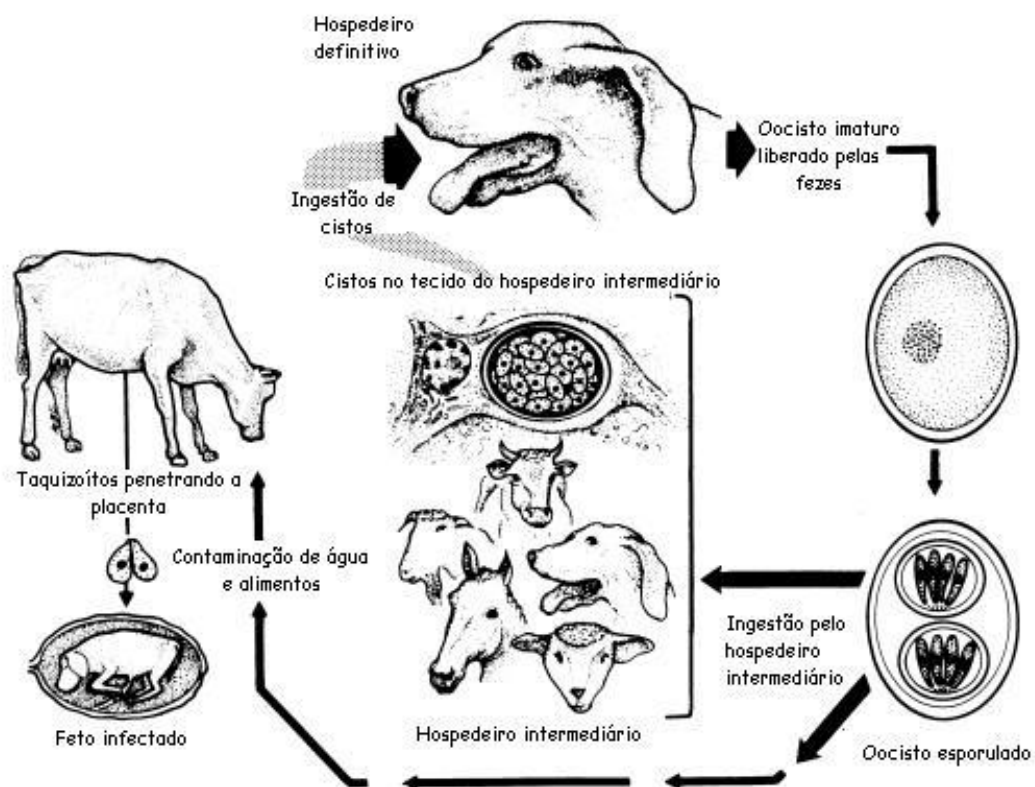
T. gondii é amplamente estudado, não apenas por sua importância na Medicina Veterinária como causador de aborto nos rebanhos, mas também por ser um agente que gera problemas na saúde pública (TENTER et al., 2000). *N. caninum*, além de causar aborto nos rebanhos (DUBEY, 2003), já se comprovou por meio da sorologia que humanos também podem se infectar (NAM et al., 1998; TRANAS et al., 1999) e que pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) podem apresentar sintomatologia neurológica (LOBATO et al., 2006).

Os hospedeiros definitivos do *N. caninum* são os cães (*Canis lupus familiaris*), coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobo

cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011) e de *T. gondii* são principalmente os gatos e outros felídeos (TENTER et al., 2000).

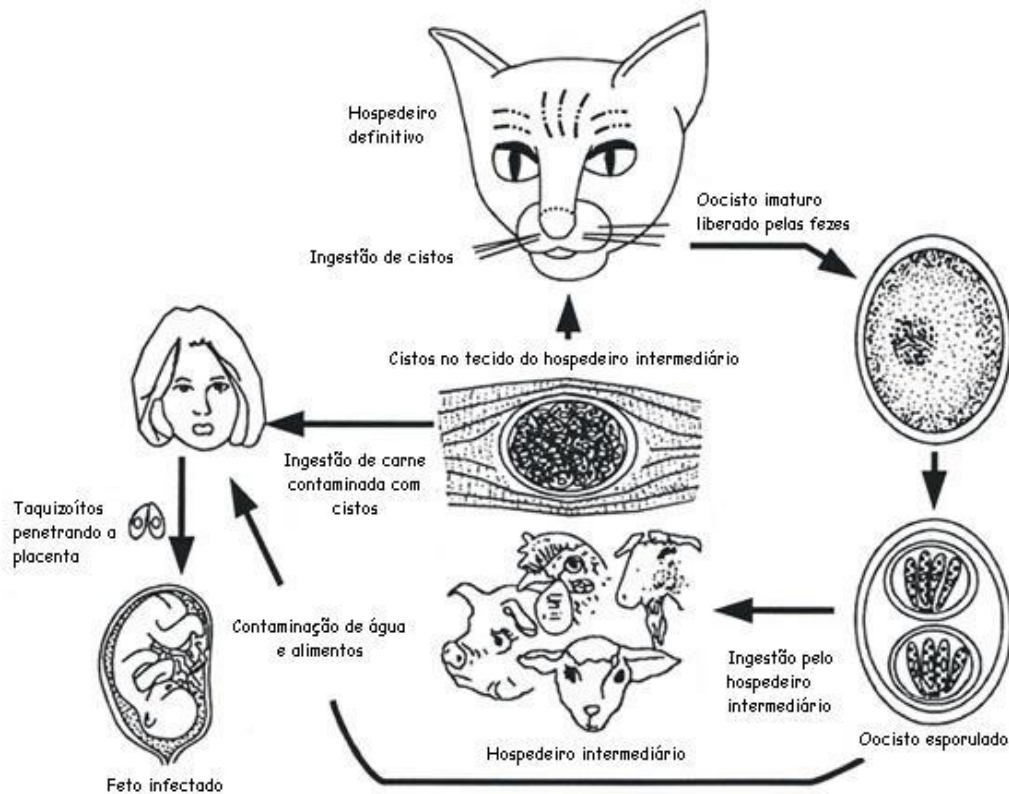
N. caninum e *T. gondii* possuem um ciclo heteroxeno complexo com três formas infecciosas, onde ocorre a fase assexuada no hospedeiro intermediário onde se encontram os taquizoítos e os cistos contendo bradizoítos e a fase sexuada no hospedeiro definitivo carnívoro que excretam os esporozoítos dentro do oocisto. Os hospedeiros intermediários se infectam ao ingerir os oocistos esporulados eliminados no ambiente pelos hospedeiros definitivos. Estes, por sua vez, infectam-se ao se alimentar de animais com cistos contendo bradizoítos nos tecidos (Figuras 1 e 2) (MILLER et al., 1972; DUBEY et al., 2007b).

Figura 1: Ciclo biológico do *N. caninum*



Fonte: Modificado de DUBEY (2003).

Figura 2: Ciclo biológico do *T. gondii*



Fonte: Modificado de DUBEY et al. (1998).

O oocisto de *N. caninum* e do *T. gondii* é liberado nas fezes do hospedeiro definitivo. No ambiente ocorre a esporulação dando origem a dois esporocistos, contendo quatro esporozoítos cada (forma infectante). O hospedeiro intermediário ingere o oocisto e os esporozoítos são liberados no intestino delgado por ação de enzimas proteolíticas que destroem a parede do oocisto. Os esporozoítos liberados penetram as células do epitélio intestinal e os gânglios adjacentes. No interior de cada célula o parasito é rodeado por um vacúolo parasitológico e se multiplica ativamente por meio de endogemação rápida produzindo múltiplos taquizoítos. Ao final de 24h há a ruptura da célula com a liberação dos taquizoítos e invasão de novas células. Após um período de multiplicação nos gânglios mesentéricos, os taquizoítos são liberados na corrente sanguínea invadindo qualquer tipo de célula. Quando o hospedeiro adquire imunidade frente à infecção, os taquizoítos extracelulares são eliminados e os que estão presentes nos tecidos se envolvem em uma membrana elástica e se transformam em bradizoítos. Os bradizoítos se

multiplicam de forma lenta dentro do cisto se tornando a forma de resistência endógena. (DUBEY et al., 1998).

O hospedeiro definitivo pode se infectar por meio da ingestão de cistos teciduais. Ao ingerir o cisto, os bradizoítos são liberados e penetram nas células do intestino delgado. No epitélio intestinal iniciam a multiplicação assexuada por esquizogonia. Após um determinado número de esquizogonia, os merozoítos liberados dos equizontes penetram em novas células transformando-se uns em microgametas (masculinos) e outros em macrogametas (femininos), começando assim, a fase sexual do ciclo (gametogonia). Os microgametas são liberados por ruptura celular para penetrar nas células que alojam os macrogametas fecundando-os. Após a fecundação, dentro da célula hospedeira se forma o ovo ou zigoto que é envolvido em uma parede transformando-se em oocisto (TENTER et al., 2000).

2.4 Epidemiologia

O cão e alguns canídeos selvagens têm uma grande importância no ciclo da neosporose. Estudos têm demonstrado que ocorre uma maior positividade para *N. caninum* em cães de área rural (ANTONY & WILLIAMSON, 2003; FERNANDES et al., 2004) quando comparado a áreas urbanas. O contato de cães com rebanhos infectados pelo *N. caninum* mantém o ciclo e a disseminação deste protozoário (ANTONY & WILLIAMSON, 2003). Cães de vida livre ou que tem acesso a outros animais apresentam uma maior predisposição ao contato com o parasito (GENNARI et al., 2002).

Andreotti et al. (2006) identificaram uma maior soroprevalência em animais acima dos 6 meses, demonstrando que a transmissão horizontal nos cães é mais comum do que a transmissão vertical, porém, Fernandes et al. (2004) não demonstraram significância da infecção relacionada à idade dos animais. A raça e o sexo não apresentaram diferenças na predisposição, estando todos os cães sujeitos à infecção pelo *N. caninum* (SOUZA et al., 2002; CAÑÓN-FRANCO et al 2003; WANHA et al., 2005).

A presença de *T. gondii* em cães é bastante comum como vem demonstrando as pesquisas sorológicas realizadas no Brasil (SILVA et al., 1997; SOUZA et al., 2002; LOPES et al., 2011;

PLUGGE et al., 2011) e em outros países (ASLANTAS et al., 2005; WANHA et al., 2005; ROQUEPLO et al., 2011; NGUYEN et al., 2012).

Ainda não se sabe exatamente qual o papel do cão na transmissão do *T. gondii* para os rebanhos e para os humanos, porém, Tenter et al. (2000) relataram que na fase aguda da infecção, o cão elimina taquizoítos na saliva e urina, principalmente, constituindo uma fonte de infecção. Schares et al. (2005) acreditam que o contato do cão com as fezes do gato pode levar a uma contaminação do pêlo do cão com os oocistos tornando-o carreador mecânico do *T. gondii*. Esse contato com gatos tem demonstrado uma elevada associação com cães soropositivos para *T. gondii* (AZEVEDO et al., 2005). Assim como ocorre com o *N. caninum*, cães de vida livre apresentam maior soropositividade para *T. gondii* do que os animais domiciliados (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004b).

Animais acima de um ano apresentam soroprevalência mais elevada para *T. gondii* (AZEVEDO et al., 2005) e da mesma forma que ocorre com o *N. caninum*, cães de todas as raças e sexo estão predispostos à infecção por *T. gondii* (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004b; AZEVEDO et al., 2005).

Vários estudos foram realizados com o objetivo de identificar *N. caninum* e *T. gondii* em canídeos selvagens. No Brasil, testes sorológicos apontaram a presença da infecção em animais selvagens (GENNARI et al., 2004; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a, MATTOS et al., 2008; CATENACCI et al., 2010; ANDRÉ et al., 2010). Pesquisas semelhantes também foram realizadas em outros países (WOLFE et al., 2001; ALMERIA et al., 2002; WAPENAAR et al., 2007), porém a pesquisa com animais selvagens ainda é muito escassa e muitos detalhes ainda não foram elucidados.

Sinais clínicos da doença já foram relatados em raposa com toxoplasmose, onde o animal apresentou necrose quase total dos linfonodos mesentéricos, hemorragia e necrose focal no cérebro (DUBEY & LIN, 1994). Em um guaxinim (*Procyon lotor*) nos EUA foi relatado quadro de convulsão, encefalite e pneumonia causado pela associação do *N. caninum* com o vírus da cinomose canina (CDV) (LEMBERGER et al., 2005). Hoje já se sabe que a presença de animais selvagens próximos a rebanhos pode ser um fator de risco para neosporose em bovinos (BARLING et al., 2000).

2.5 PCR no diagnóstico de *T. gondii* e *N. caninum* em animais selvagens

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular de amplificação de ácidos nucléicos que apresenta alta sensibilidade e especificidade, porém é necessário que todas as etapas, inclusive as que antecedem a PCR, sejam realizadas com extrema cautela, para que tanto o armazenamento das amostras quanto a extração do ácido nucléico contribuam para a obtenção de um resultado mais preciso (SWITAJ et al., 2005).

Cada vez mais, estudos estão utilizando a técnica da PCR para identificação do DNA de *N. caninum* e *T. gondii* em animais selvagens por ser uma técnica precisa e de fácil execução (DUBEY et al., 2007a; YU et al., 2009; AUBERT et al., 2010; CONSTANTIN et al., 2011; De CRAEYE et al., 2011).

Tendo em vista a escassez de dados relacionados a estas duas doenças em animais selvagens e considerando a possibilidade da raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) ter participação no ciclo biológico tanto em *T. gondii* quanto em *N. caninum*, foi de grande importância a pesquisa destes agentes no sistema nervoso central, utilizando a PCR para confirmação destes animais como hospedeiros intermediários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMERÍA, S. et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.107, p. 287-294, 2002.
- ANDRÉ, M. R., et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. **Journal of Parasitology**. v. 96, p.1007-1009, 2010.
- ANDREOTTI, R. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.135, p. 375-379, 2006.
- ANTONY, A.; WILLIAMSON, N.B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 51, p.232-237, 2003.
- ASLANTAS, O. et al. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.187-191, 2005.
- AUBERT, D. et al. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. **Veterinary Parasitology**, v.171, p.346-349, 2010.
- AZEVEDO, S.S. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**. v. 79, p.51-56, 2005.
- BARLING, K.S. et al. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. **Journal of the American veterinary Medical Association**. v. 217, p.1361-1365, 2000.
- BJERKÅS, I. et al. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**. v. 70, p.271-274, 1984.
- BJERKÅS, I.; DUBEY, J.P. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 32, p.407-410, 1991.
- CABRERA, A; YEPES, J. **Mamíferos sud americanos**. 2 ed. v. 1. Buenos Aires: EDITORA ADIAR, 1960, 187p.

- CAÑÓN-FRANCO, W.A., et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 115, p.71-74, 2003.
- CAÑÓN-FRANCO, W.A., et al. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p.275–277, 2004a.
- CAÑÓN-FRANCO, W.A., et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. **Veterinary Research Communications**. v. 28, p.113-118, 2004b.
- CATENACCI, L. S., et al. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania spp.* infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 169, p.190-192, 2010.
- CONSTANTIN, E.M. et al. Studies on the role of the red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**. v. 124, p.148-153, 2011.
- DALPONTE, J.C. Diet of the hoary fox, *Lycalopex vetulus*, in Mato Grosso, Central Brazil. **Mammalia**. v. 61, p.537-546, 1997.
- DALPONTE, J.; COURTENAY, O. Hoary fox *Pseudalopex vetulus* (Lund, 1842). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M.; MACDONALD, D.W. (Eds.). **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan**. Gland, Switzerland e Cambridge, UK: IUCN/SSC Canid Specialist Group, 2004, 430p.
- DANTAS-TORRE, F. et al. Ticks infesting wildlife species in Northeastern Brazil with new host and locality records. **Journal of Medical Entomology**. v. 46, p.1243-1246, 2010.
- De CRAEYE, S. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? **Veterinary Parasitology**. v. 178, p.64-69, 2011.
- DUBEY, J.P. Taxonomy of Sarcocystis and other Coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.170, p.778, 782, 1977.
- DUBEY, J.P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 192, p.1269-1285, 1988.

- DUBEY, J.P.; LIN, T.L. Acute toxoplasmosis in a gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*). **Veterinary Parasitology**. v. 51, p.321-325, 1994.
- DUBEY, J.P. et al. Isolation of a third species of *Sarcocystis* in immunodeficient mice fed feces from opossums (*Didelphis virginiana*) and its differentiation from *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. **The Journal of Parasitology**. v. 84, p.1158-1164, 1998.
- DUBEY, J.P. et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**. v.41, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. **The Journal of Parasitology**. v.93, p.1524-1527, 2007a.
- DUBEY, J.P. et al. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 323-367, 2007b.
- DUBEY, J.P. et al. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.181, p.382-387, 2011.
- EISENBERG, J.F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil)**. v. 3. Chicago and London: THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, 1999, 609p.
- FERNANDES, B.C. et al. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais--Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 123, p.33-40, 2004.
- FONSECA, G.A.B. et al. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil**. n. 4. Belo Horizonte: CONSERVATION INTERNACIONAL & FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 1996, 38 p.
- GENNARI, S. M., et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 106, p.177-179, 2002.
- GENNARI, S. M., et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 121, p.337-340, 2004.

- GONDIM, L.F.P. et al. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**. v. 88, p.1159-1163, 2002.
- GONDIM, L.F.P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 34, p.159-161, 2004.
- KING, J.S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v.40, p.945-950, 2010.
- LEMBERGER, K.Y. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. **The Journal of Parasitology**. v. 91, p.960-961, 2005.
- LINDSAY, D.S. et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**. v. 2, p.657-659, 1996.
- LOBATO, J. et al. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by Human Immunodeficiency Virus or have neurological disorders. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.13, p.84-89, 2006.
- LOPES. M.G. et al. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p.111-114, 2011.
- MATTOS, B. C., et al. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 17 Supl. 1, p.267-272, 2008.
- MILLER, N. L. et al. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology**. v.58, p.928-937, 1972.
- MUGRIDGE, N.B. et al. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.1545-1556, 1999.
- NAM, H.W. et al. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**. v.36, p.269-275, 1998.

- NGUYEN, T.T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from Korea. **Acta parasitologica**. v. 57, p.7-12, 2012.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**. v. 147, p.736, 1908.
- NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the World**. 6 ed. v. 1 e 2. Baltimore: THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY PRESS, 1999.
- PLUGGE, N. F. et al. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, p.202-206, 2011.
- ROCHA, V. J. et al. Ordem Carnívora. p. 91-126. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; FANDIÑO-MARIÑO, H.; ROCHA, V. J. **Mamíferos da Fazenda Monte Alegre, Paraná**. Londrina: EDUEL, 2005, 202p.
- ROQUEPLO, C. et al. *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia. **Parasite**. v. 18, p.345-348, 2011.
- ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. The Sylvatic cycle of *Neospora caninum*: Where do you we go from here? **Trends in parasitology**. v. 21, p.439-440, 2005.
- SCHARES, G. et al. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **Internacional Journal for Parasitology**. v. 35, p.1525-1537, 2005.
- SILVA, D.A. et al. Detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in dogs. A comparative study of immunoenzymatic, immunofluorescent and haemagglutination titers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, p.785-789, 1997.
- SLAPETA, J.R. et al. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p.157-167, 2002.
- SOUZA, S.L. et al. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **The Journal of Parasitology**. v. 88, p.408-409, 2002.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. **Rev Soc Sci Sao Paulo**. v. 3, p.109-112, 1908.

- SWITAJ, K. et al. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**. v.11, p.170-176, 2005.
- TENTER, A.M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Internacional Journal for Parasitology**. v. 30, p.1217-1258, 2000.
- TRANAS, J. et al. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.6, p.765-767, 1999.
- VIEIRA, C.C. Carnívoros do Estado de São Paulo. **Arquivos de Zoologia**. v. 5, p.135-175, 1946.
- WANHA, K. et al. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 189-193, 2005.
- WAPENAAR, W. et al. Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 51-58, 2007.
- WOLFE, A. et al. T. J. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. **Veterinary Record**, v.149, p. 759 – 763, 2001.
- YU, X. et al. Detection of *Neospora caninum* from farm-bred young blue foxes (*Alopex lagopus*) in China. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, p. 113-115, 2009.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Contribuir para o estudo epidemiológico da toxoplasmose e neosporose em animais selvagens.

3.2. Específicos

- Realizar a extração de material genético (DNA) de amostras de sistema nervoso central de raposas-do campo;
- Realizar PCR para detecção de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em raposas-do-campo;
- Calcular o percentual de infecção para cada patógeno estudado;
- Analisar filogeneticamente *T. gondii* e *Neospora caninum* obtidos nas análises moleculares.

4. ARTIGO

Este artigo foi submetido para publicação no periódico Veterinary Parasitology.

Ocorrência de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em tecido cerebral de raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) no Brasil

Maria Cecília Oliveira do Nascimento^a, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva^b, Pomy de Cássia Peixoto Kim^a, Albério Antônio de Barros Gomes^b, Ana Lisa do Vale Gomes^c, Rita de Cássia Carvalho Maia^c, Rinaldo Aparecido Mota^{a*}

^a Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil

^b Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, s/n, 58700-970, Patos, PB, Brasil.

^c Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil

*Autor Correspondente. Tel.: +55 81 33206425; fax: +55 81 3320 6400.
E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com (R. A. Mota).

Resumo: *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa e responsáveis por severos prejuízos relacionados a patologias reprodutivas em ruminantes no mundo. Objetivou-se estudar a presença de DNA desses parasitos em tecido cerebral de 49 raposas-do-campo (*Pseudalopex vetulus*), procedentes do sertão do estado da Paraíba, Brasil. As amostras foram processadas para a extração do material genético e em seguida submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos para *T. gondii* e *N. caninum*. 14,3% e 12,2% das amostras foram positivas para *T. gondii* e *N. caninum*, respectivamente e a identidade molecular dos produtos amplificados foi confirmada por sequenciamento. Esta é o primeiro relato da presença do DNA desses parasitos em raposa-do-campo no Brasil, confirmando esta espécie como hospedeiro intermediário.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, raposa-do-campo, hospedeiro intermediário

1. Introdução

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY, 1977, DUBEY et al., 2002). Possuem características fenotípicas semelhantes e são estritamente relacionados, porém, apresentam diferenças antigênicas, biológicas e estruturais. A diferenciação destas espécies só foi possível a partir de análises moleculares (MUGRIDGE et al., 1999; SLAPETA et al., 2002).

Os hospedeiros intermediários se infectam ao ingerir os oocistos esporulados eliminados no ambiente pelos hospedeiros definitivos. Os hospedeiros definitivos de *N. caninum* são os cães (*Canis lupus familiaris*) (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (*Canis latrans*) (GONDIM et al., 2004), dingo (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010) e lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY et al., 2011) e de *T. gondii* são os gatos e outros felídeos (TENTER et al., 2000). Alguns estudos já relataram a presença de *N. caninum* e *T. gondii* em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (WOLFE et al., 2001; ALMERIA et al., 2002; WAPENAAR et al., 2007), demonstrando que esses animais são hospedeiros intermediários para os dois protozoários.

Em canídeos selvagens, a infecção por *T. gondii* é frequente pelo hábito de alimentar-se de carne de coelhos, roedores e pequenos ruminantes (LINDSAY et al., 1996). Gondim et al. (2004) relataram a existência de um ciclo selvagem para o *N. caninum*, demonstrando também uma relação com o ciclo doméstico.

No Brasil há evidência sorológica da infecção por *T. gondii* e *N. caninum* em canídeos silvestres das espécies *Lycalopex gymnocercus* e *Cerdocyon thous* (GENNARI et al., 2004; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004b, MATTOS et al., 2008; CATENACCI et al., 2010; ANDRÉ et al., 2010) e *T. gondii* em *Pseudalopex vetulus* (GENNARI et al., 2004; ANDRÉ et al., 2010).

Objetivou-se estudar a presença do DNA de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em raposa-do-campo (*Pseudalopex vetulus*) para confirmar esta espécie como hospedeiro

intermediário desses parasitos no Brasil.

2. Material e Métodos

A identificação fenotípica das raposas-do-campo foi realizada pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). As amostras de 49 raposas foram cedidas por este grupo de pesquisa e foram colhidas em rodovias no estado da Paraíba, Brasil que situa-se entre as Latitudes Sul – 06°46'19 "e 07°38'32" e Longitude Oeste – 36°42'52 "e 38°08'56". A coleta do material biológico foi realizada com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Proc. nº 3322001-CGEF) que reconhece a presença desta espécie na região.

2.2.1. Extração do DNA e PCR

A extração do DNA das amostras de tecido cerebral das raposas foi realizada utilizando-se o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante.

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo de Yamage (1996) e Homan (1999) para *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente. O controle positivo de *N. caninum* foi obtido através de suspensão de células VERO inoculadas com a cepa NC-1 e de *T. gondii* por meio de suspensão de lavado intra-peritoneal de camundongos previamente infectados com a cepa RH. As amostras foram preparadas para um volume final de 12,5µL contendo: 6,25µL de Top Taq Master Mix (Qiagen), 0,5µL de cada *primer* (NP6 e NP21 para *N. caninum* e TOX4 e TOX5 para *T. gondii*) a 10pmol, 2,75µL de ddH₂O e 2,5µL de DNA. Ao controle negativo foi adicionado ddH₂O, substituindo o DNA.

Alíquotas com 9,0 µL dos produtos da PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com 0,3 µL de *blue green loading dye I* em tampão TAE 1x, sob

voltagem constante (100V) durante 50 min. O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta (UV) em Transluminador (modelo L.PIX, Loccus Biotecnologia®). Foi utilizado 2µL do marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder. Para *N. caninum* foi visualizado um fragmento de 328pb e para *T. gondii* de 529pb.

2.2.2. Sequenciamento das amostras

As amostras positivas na PCR foram purificadas utilizando o kit QIAquick® Gel Extraction (50) e encaminhadas para o sequenciamento. As sequências foram analisadas e editadas utilizando programa BioEdit. Com o programa Mega 5.05 foram alinhadas as sequências do GenBank com as sequências das amostras, utilizando o programa ClustalW cutoff de 50%. O alinhamento foi editado e a árvore gerada utilizou o método de máxima verossimilhança com Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) General Time Reversible model (GTR) como modelo evolucionário e valores de Bootstrap de 1000 réplicas.

2.3. Confeção de mapas georreferenciados

As coordenadas geográficas dos locais de recolhimento das raposas foram obtidas com um aparelho de GPS (*Global Position System*) e os limites geográficos da localização foram plotados em um mapa georreferenciado digital do Estado da Paraíba, baseado no mapa da malha municipal do Brasil de 2001, obtido junto ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). As atividades de plotagem e tratamento dos mapas digitais foram realizados com o programa ArcGIS versão 9.1. Foram construídos dois mapas: um com a distribuição dos municípios positivos para *T. gondii* e outro com os municípios positivos para *N. caninum*.

Considerou-se um município positivo que apresentou pelo menos uma amostra positiva para cada agente pesquisado.

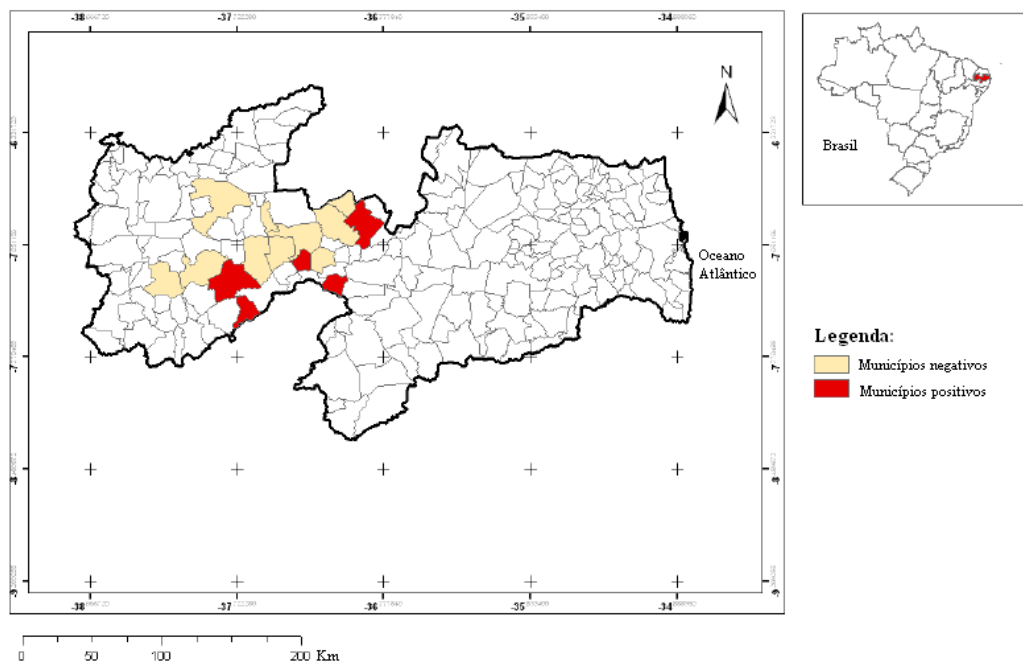
3. Resultados

3.1. Reação em Cadeia da Polimerase

3.1.1. *Neospora caninum*

Das amostras analisadas, 12,2% (6/49) foram positivas na PCR, sendo três machos e três fêmeas dos municípios de Água Branca, Desterro, Olho d'Água, São José do Bonfim e Santa Luzia (Figura 1).

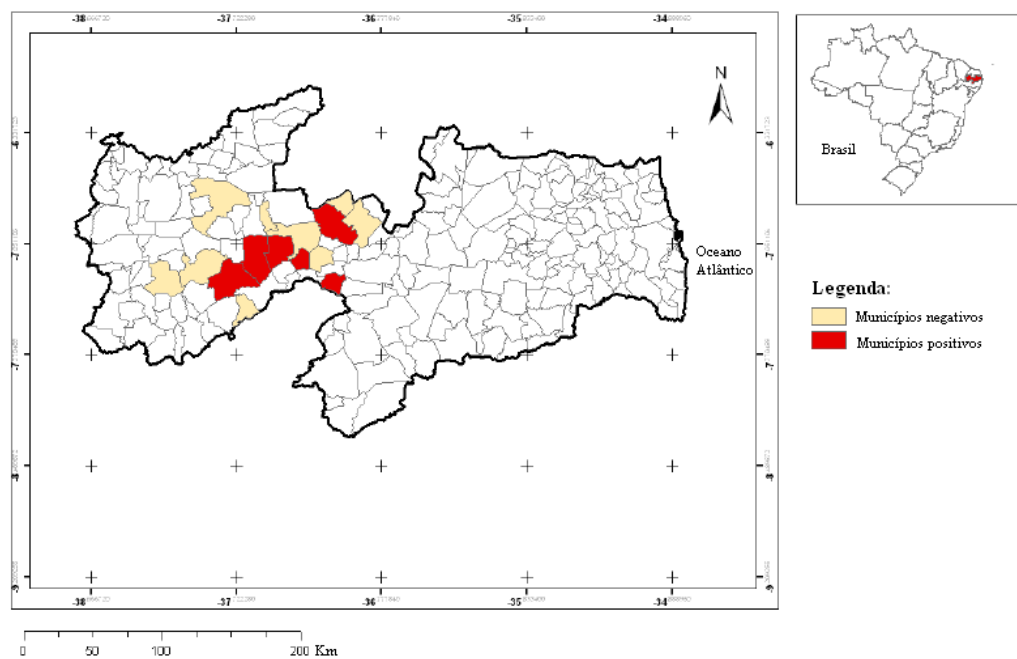
Figura 1: Mapa do Estado da Paraíba destacando os municípios com raposas positivas para *N. caninum*.



3.1.2. *Toxoplasma gondii*

Das amostras analisadas, 14,3% (7/49) foram positivas na PCR, sendo seis machos e uma fêmea dos municípios de Catingueira, Desterro, Olho d'Água, São José do Bonfim, São Mamede e Santa Terezinha (Figura 2).

Figura 2: Mapa do Estado da Paraíba destacando os municípios com raposas positivas para *T. gondii*.



3.2 Sequenciamento de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*

Na análise do sequenciamento de fita dupla direta foi possível confirmar a identidade molecular das amostras de *N. caninum* com similaridade de 91% com sequências armazenadas no GenBank (AY940485.1) (Figura 3). Para *T. gondii*, obteve-se similaridade de 98% com sequências armazenadas no GenBank (EF648168.1).

Figura 3: Árvore filogenética de *Neospora caninum*

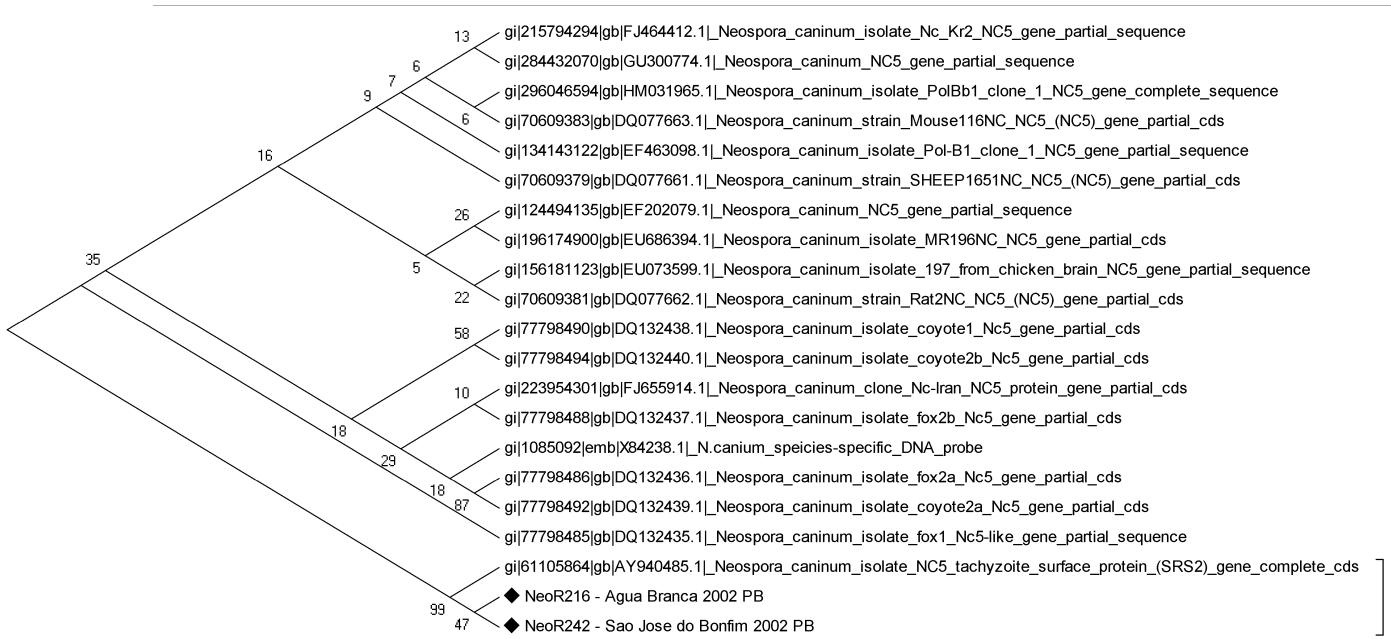


Figura 4: Árvore filogenética de *Toxoplasma gondii*



4. Discussão

O DNA de *N. caninum* e *T. gondii* foi encontrado em 12,2% e 14,3% das amostras analisadas, respectivamente. Este resultado foi confirmado no sequenciamento que demonstrou 98% de similaridade com *T. gondii* (SONG & ZHU, 2010). O estudo filogenético para *N. caninum* foi realizado baseado na região do genoma específica para este parasito (NC5), onde foram incluídas duas sequências dos isolados do presente estudo (R216 e R242) e 16 sequências homólogas que representam diferentes isolados do parasito: animais silvestres (DQ132435.1), domésticos (DQ077661.1) e clonagem (FJ655914.1). A representação filogenética demonstrou que dentre as sequências utilizadas para a construção da árvore, as duas (R216 e R242) tiveram 99% de similaridade com a AY940485.1 obtida no estudo realizado por Baszler et al. (2005).

Para o *T. gondii*, o estudo filogenético baseou-se na sequência de DNA repetitivo de 529pb que é encontrado de 200 a 300 vezes no genoma deste protozoário (HOMAN et al., 2002), onde foram incluídas todas as sequências positivas dos isolados no presente estudo e 12 sequências homólogas. Observou-se similaridade de 98% das amostras com as sequências presentes no GenBank, confirmando assim a identidade com *T. gondii* (DQ779189.1; EF648168.1; DQ779191.1).

Recentemente, um estudo semelhante realizado por Bartley et al (2013) na Grã Bretanha detectou a presença de *N. caninum* em algumas espécies de carnívoros selvagens, confirmando o agente no sequenciamento. Os autores concluíram que quase todas as espécies de carnívoros selvagens estudados são hospedeiros intermediários e podem atuar como sentinelas do parasito naquela região.

Almeria et al. (2002), na Espanha também relataram a presença de *N. caninum* em 10,7%

(13/122) das amostras de raposas vermelhas estudadas, detectando-as como hospedeiro intermediário deste parasito. Em outro estudo realizado com coiotes (*Canis latrans*) em Wisconsin, EUA, *T. gondii* foi identificado em 40,0% dos animais (DUBEY et al., 2007).

Neste estudo não foram encontradas diferenças nos resultados quanto ao sexo dos animais. Em cães, alguns estudos sorológicos para *N. caninum* e *T. gondii* realizados em diferentes localidades no Brasil também não demonstraram diferença na frequência da infecção em machos e fêmeas, sugerindo que todos estão expostos às mesmas condições de risco para *N. caninum* (SOUZA et al., 2002; CAÑÓN-FRANCO et al., 2003) e *T. gondii* (CAÑÓN-FRANCO et al., 2004a, AZEVEDO et al., 2005).

A raposa-do-campo, anteriormente denominada *Lycalopex vetulus* ou *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* é um canídeo silvestre encontrado na região Nordeste do Brasil, onde é comum pessoas criarem esses animais como canídeos de estimação, uma prática proibida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (GENNARI et al., 2004). Hospedeiros definitivos domésticos como o gato para *T. gondii* e o cão para *N. caninum* podem se alimentar de raposas-do-campo encontradas mortas nas fazendas e adquirir a infecção, contribuindo desta forma com o ciclo doméstico e selvagem dessas parasitoses. Em outros estudos foram encontrados canídeos selvagens soropositivos no Brasil (GENNARI et al., 2004; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004b, MATTOS et al., 2008; CATENACCI et al., 2010; ANDRÉ et al., 2010) e em outros países (WOLFE et al., 2001; ALMERIA et al., 2002; WAPENAAR et al., 2007), contudo até então nada se sabia sobre a participação da raposa-do-campo no ciclo biológico de *N. caninum* e *T. gondii*.

Evidências epidemiológicas têm sugerido que os canídeos selvagens, especificamente raposas e coiotes, também podem desempenhar um papel importante na epidemiologia da neosporose bovina. Associações foram encontradas entre a densidade de bovinos soropositivos

para *N. caninum* e a abundância de coiotes (*Canis latrans*) e raposas cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) (BARLING et al., 2000). No Brasil não existem trabalhos relacionando a presença de canídeos silvestres como fator de risco para neosporose bovina, entretanto, Souza et al. (2012) observaram em estudo realizado em Alagoas, Brasil, que a falta de cuidado com o descarte de fetos abortados pode ser um fator de risco, pois cães e canídeos selvagens podem ter acesso ao tecido contaminado e manter o ciclo da neosporose na propriedade. A raposa-do-campo é um canídeo selvagem nativo do Brasil comumente encontrado convivendo em contato com rebanhos de bovinos e outros ruminantes (EISENBERG & REDFORD, 1999; DANTAS-TORRES et al., 2010).

A presença de *N. caninum* e *T. gondii* no Brasil associados ao aborto em ruminantes em propriedades rurais vem sendo demonstrada em trabalhos científicos. Em estudo realizado em São Paulo com amostras de 105 fetos bovinos observou-se um índice de positividade para *N. caninum* de 24,8% (CABRAL et al., 2009). *T. gondii* tem sido associado a abortos em pequenos ruminantes como observado por de Moraes et al. (2011) em Pernambuco, Brasil onde foram encontradas lesões sugestivas de *T. gondii* em 14,3% das placentas coletadas de 35 abortos ocorridos em ovinos.

Hoje já se sabe que existe uma estreita relação entre o ciclo doméstico e selvagem destes parasitas (GONDIM et al., 2004; ROQUEPLO et al., 2011; COSTA et al., 2012), desta forma o contato de rebanhos com animais selvagens pode gerar perdas econômicas relacionadas a problemas reprodutivos causados por *N. caninum* e *T. gondii*.

5. Conclusão

Esta é o primeiro registro de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em raposas-do-campo no Brasil, confirmando esta espécie como hospedeiro intermediário destes parasitos.

Conflito de interesse

Nenhum.

Agradecimento

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ - PE) pelo apoio na realização do sequenciamento das amostras.

Referências Bibliográficas

- Almería, S., Ferrer, D., Pabón, M., Castellà, J., Mañas, S., 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 107, 287-294.
- André, M. R., Adania, C. H., Teixeira, R. H. F., Silva, K. F., Jusi, M. M. G., Machado, S. T. Z., de Bortolli, C. P., Falcade, M., Sousa, L., Alegretti, S. M., Felipe, P. A. N., and Machado, R. Z., 2010. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *J.Parasitol.* 96, 1007-1009.
- Azevedo, S.S., Batista, C.S., Vasconcellos, S.A., Aguiar, D.M., Ragozo, A.M., Rodrigues, A.A., Alves, C.J., Gennari, S.M. 2005. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res Vet Sci.* 79, 51-56.
- Barling, K.S., Sherman, M., Peterson, M.J., Thompson, J.A., McNeill, J.W., Craig, T.M., Adams, L.G., 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J Am Vet Med Assoc.* 217, 1361-1365.
- Bartley, P.M.; Wright, S.E.; Zimmer, I.A.; Roy, S.; Kitchener, A.C.; Meredith, A.; Innes, E.A.; Katzer, F. 2013. Detection of *Neospora caninum* in wild carnivorans in Great Britain. *Vet. Parasitol.* 192, 279-283.
- Baszler, T.V.; Haldorson, G.H.; Wenberg, K. 2005. Immunization with native surface protein NcSRS2 induces a Th2 immune response and reduces congenital *Neospora caninum* transmission in mice. *Int. J. Parasitol.* 35, 1407-1415.
- Cabral, A.D., Camargo, C.N., Galletti, N.T., Okuda, L.H., Pituco, E.M., Fava, C.D. 2009. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18, 14-19.
- Cañón-Franco W.A., Bergamaschi, D.P., Labruna, M.B., Camargo, L.M., Souza, S.L., Silva, J.C., Pinter, A., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Vet Parasitol.* 10, 71-74.
- Cañón-Franco, W.A., Bergamaschi, D.P., Labruna, M.B., Camargo, L.M., Silva, J.C., Pinter, A., Gennari, S.M. 2004a. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. *Vet Res Commun.* 28, 113-118.
- Cañón-Franco, W.A., Yai L.E.O., Souza S.L.P., Santos L.C., Farias N.A.R., Ruas J., Rossi F.W., Gomes A.A.B., Dubey J.P., Gennari S.M., 2004b. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. *Vet. Parasitol.* 123, 275-277

- Catenacci, L. S., Griese, J., da Silva, R. C., and Langoni, H., 2010. *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. infection in captive crab-eating foxes, *Cerdocyon thous* (Carnivora, Canidae) from Brazil. *Vet. Parasitol.* 169, 190-192.
- Costa, D.G., Marvulo, M.F., Silva, J.S., Santana, S.C., Magalhães, F.J., Filho, C.D., Ribeiro, V.O., Alves, L.C., Mota, R.A., Dubey, J.P., Silva, J.C. 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *J Parasitol.* 98, 679-680.
- Dantas-Torres, F., Siqueira, D.B., Rameh-De-Albuquerque, L.C., Da Silva E Souza, D., Zanotti, A.P., Ferreira, D.R., Martins, T.F., De Senna, M.B., Wagner, P.G., Da Silva, M.A., Marvulo, M.F., Labruna, M.B. 2010. Ticks infesting wildlife species in northeastern Brazil with new host and locality records. *J Med Entomol.* 47, 1243-1246.
- Dubey, J.P., 1977. Taxonomy of Sarcocystis and other Coccidia of cats and dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 170, 778-782.
- Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Uggla, A., Upton, S.J., Williams, D.J., Lindsay, D.S., 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol.* 32, 929-946.
- Dubey, J.P., Sundar, N., Nolden, C.A., Samuel, M.D., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C., Bodenstein, B., Su, C., 2007. Characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), and striped skunks (*Mephitis mephitis*) in Wisconsin identified several atypical genotypes. *J Parasitol.* 93, 1524-1527.
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C., Choudhary, S., 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 181, 382-387.
- Eisenberg, J.F.; Redford, K. H. 1999. Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil). The University Of Chicago Press, Chicago and London, 609pp.
- Gennari, S. M., Cañón-Franco, W. A., Yai, L. E. O., de Souza, S. L. P., Santos, L. C., Farias, N. A. R., Ruas, J., Rossi, F. W., and Gomes, A. A. B., 2004. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids from Brazil. *Vet. Parasitol.* 121, 337-340.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E., 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 34, 159 – 161.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 1999. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol.* 30, 69-75.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A., 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 40, 945-950.
- Lindsay, D.S., Kelly, E.J., McKown, R.D., Stein, F.J., Plozer, J., Herman, J., Blagburn, B.L., Dubey, J.P., 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J Parasitol.* 2, 657-659.
- Mattos, B. C., Patrício, L. F. L., Plugge, N. F., Lange, R. R., Richartz, R. R. T. B., and Dittrich, R. L., 2008. Soroprevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em canídeos selvagens cativos. *Rev Bras Parasitol Vet.* 17 Supl. 1, 267-272.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 28, 1473 – 1478.

- Moraes, E.P., da Costa, M.M., Dantas, A.F., da Silva, J.C., Mota, R.A. 2011. *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. *Vet Parasitol.* 183, 152-155.
- Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Heckerth, A.R., Johnson, A.M., Tenter, A.M., 1999. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 29, 1545-1556.
- Roqueplo, C., Halos, L., Cabre, O., Davoust, B. 2011. *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia. *Parasite.* 18, 345-348.
- Slapeta, J.R., Modrý, D., Kyselová, I., Horejs, R., Lukes, J., Koudela, B., 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol.* 109, 157-167.
- Song, H.Q.; Zhu, X.Q. 2010. 529 bp sequence of *Toxoplasma gondii* isolated from cat. Unpublished.
- Souza, S.L., Guimarães, J.S. Jr, Ferreira, F., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2002. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *J Parasitol.* 88, 408-409.
- Souza, M.E.; Porto, W.J.N.; Albuquerque, P.P.F.; Souza Neto, O.L.; Faria, E.B.; Pinheiro Júnior, J.W.; Mota, R.A. 2012. Seroprevalence and risk factors associated with infection by *Neospora caninum* of dairy cattle in the state of Alagoas, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 1009-1013.
- Tenter, A.M., Heckerth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30, 1217-1258.
- Wapenaar, W., Barkema, H.W., Schares, G., Rouvinen-Watt, K., Zeijlemaker, L., Poorter, B., O'Handley, R.M., Kwok, O.C., Dubey, J.P., 2007. Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. *Vet Parasitol.* 145, 51-58.
- Wolfe, A., Hogan, S., Maguire, D., Fitzpatrick, C., Vaughan, L., Wall, D., Hayden, T.J., Mulcahy, G., 2001. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. *Vet Rec.* 149, 759 – 763.
- Yamaga, M., Flechtner, O., Gottstein, B., 1996. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol.* 82, 272-279.

5 CONCLUSÃO

Com este trabalho concluiu-se que a raposa-do-campo (*P. vetulus*) é hospedeira intermediária de *Neospora caninum* e de *Toxoplasma gondii*, porém mais estudos nesta área são necessários para observar a participação desta espécie no ciclo selvagem e doméstico destes parasitos.