

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 01/12/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Padronização de ELISA para detecção de anticorpos anti-  
*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em soro e fezes  
de cervídeos.**

**Maria Helena Mazzoni Baldini  
Médica Veterinária**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PADRONIZAÇÃO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* E *NEOSPORA  
CANINUM* EM SORO E FEZES DE CERVÍDEOS**

**Maria Helena Mazzoni Baldini**

**Orientador: Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

**2021**

B177p

Baldini, Maria Helena Mazzoni

Padronização de ELISA para detecção de anticorpos anti-Toxoplasma gondii e Neospora caninum em soro e fezes de cervídeos / Maria Helena Mazzoni Baldini. -- Jaboticabal, 2022  
92 p. : il.

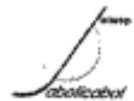
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Patologia veterinária. 2. Toxoplasmose. 3. Neospora. 4.  
Transmissão. 5. Animais silvestres. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Ati  
Ace

Essa ficha não pode ser modificada.



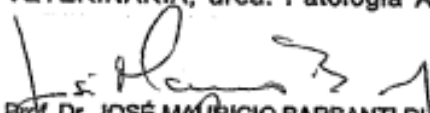
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

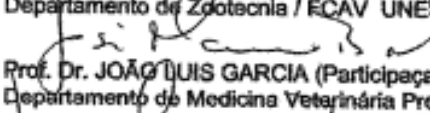
**TÍTULO DA TESE:** PADRONIZAÇÃO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* E *Neospora caninum* EM SORO E FEZES DE CERVIDEOS

**AUTORA:** MARIA HELENA MAZZONI BALDINI

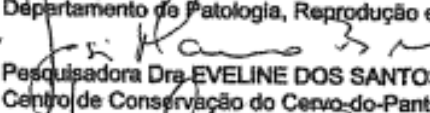
**ORIENTADOR:** JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

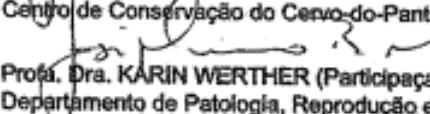
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE (Participação Virtual)  
Departamento de Zootecnia / ECAV UNESP Jaboticabal

11   
Prof. Dr. JOÃO LUIS GARCIA (Participação Virtual)  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva-UEL / Londrina/PR

11   
Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

11   
Pesquisadora Dra. EVELINE DOS SANTOS ZANETTI (Participação Virtual)  
Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal / Promissão, SP

11   
Profa. Dra. KARIN WERTHER (Participação Virtual)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / UNESP/Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2021

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Maria Helena Mazzoni Baldini** – Nascida em 22 de julho de 1991, na cidade de Joinville, Santa Catarina. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em março de 2009. Durante a graduação foi bolsista de extensão do Projeto Amigo do Carroceiro, sob supervisão do professor Joandes Henrique Fonteque. Cumpriu estágio extra-curricular em Clínicas veterinárias como Cia Bichos (Joinville-SC), Vida Livre (Curitiba – PR), Tukan (São Paulo – SP) e no Centro de Reabilitação de Animais Selvagens - CRAS (Campo Grande –MS). Em 2013 cumpriu estágio curricular no Zoológico de Sorocaba e Refúgio Biológico Bela vista da Itaipu Binacional. Ingressou em março de 2014 no curso de Pós-graduação em Ciencia Animal da UDESC, sob orientação do Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes, sendo bolsista pela CAPES, durante o mestrado participou do Treinamento Técnico do NUPECCE em 2015. Em 2016 começou a trabalhar como médica veterinária do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Associação R3 animal em Florianópolis – SC. Em março de 2018 ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária na UNESP – Jaboticabal sob orientação do professor José Maurício Barbanti Duarte.

## **Agradecimentos**

Ficam aqui registrados meus agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para que eu concluísse essa tese de doutorado. Agradeço à toda minha família, em especial aos meus pais, Rosanna Mazzoni Baldini e Vagner Baldini pelo suporte e apoio para que eu continuasse meus estudos. Agradeço ao meu orientador, José Maurício Barbanti Duarte por aceitar me orientar mesmo com os desafios que o projeto proporcionava. A toda a equipe de graduandos, pós-graduandos e funcionários do Nupecce, pela amizade e auxílio durante as atividades do setor. À Eveline Zanetti e a Tijoá por terem cedido amostras dos animais do Centro de Conservação do Cervo-do-pantanal. Às amigas e colegas Eluzai Dinai Sandoval, Yuki Tanaka e Gabrielle Queiroz pelo auxílio nas análises dos trabalhos descritos nessa tese, e à Patrícia Perin por ter contribuído na revisão dos capítulos. Agradeço também aos pesquisadores que contribuíram de forma mais efetiva para o desenvolvimento do projeto: ao Prof. Hélio Montassier, Prof. Rosângela Zacarias Machado e aos funcionários da IMUNODOT, em especial Carla Freschi. Também agradeço à Priscila Fioresi Garcia, por todos os conselhos e ajuda para organizar meus pensamentos e conseguir escrever essa tese.

Por último, agradeço a todos os animais utilizados nesses e em outros projetos, na esperança que os dados obtidos a partir deles possam um dia ser utilizados efetivamente para conservação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| Certificado da Comissão de Ética:.....  | i         |
| RESUMO .....  | iii       |
| ABSTRACT .....  | v         |
| LISTAS DE FIGURAS.....  | vii       |
| <b>CAPÍTULO 1- Considerações gerais.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....  | 1         |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....   | 2         |
| 2.1 Os cervídeos brasileiros.....   | 2         |
| 2.2 <i>Toxoplasma gondii</i> .....  | 4         |
| 2.3 <i>Neospora caninum</i> .....   | 7         |
| 2.4 Imunoglobulinas específicas fecais .....  | 10        |
| 3 OBJETIVOS.....  | 13        |
| 4 REFERÊNCIAS .....   | 14        |
| <b>CAPÍTULO 2 – Assessment of transplacental transmission of <i>Neospora caninum</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> in Neotropical deer: an estimative based on serology.....</b> | <b>23</b> |
| 1 INTRODUCTION .....  | 24        |
| 2 MATERIALS AND METHODS.....  | 25        |
| 2.1 Ethical approval .....  | 25        |
| 2.2 Experimental design.....  | 25        |
| 2.3 Indirect fluorescent antibody test (IFAT) for <i>N. caninum</i> and <i>T. gondii</i> ...26  |           |
| 2.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for <i>N. caninum</i> and <i>T. gondii</i> .....  | 26        |
| 2.5 Animals genealogy and statistical analysis.....   | 27        |
| 3 RESULTS.....  | 28        |
| 3.1 IFAT and ELISA.....   | 28        |
| 3.2 Congenital transmission rate.....   | 28        |
| 4 DISCUSSION .....  | 32        |
| 5 CONCLUSION .....  | 34        |
| 6 REFERENCES .....  | 35        |



**CAPÍTULO 3- Toxoplasmosis in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*):  
reproductive and clinical evaluation following experimental infection .....41**

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUCTION.....                             | 42 |
| 2 MATERIALS AND METHODS.....                    | 43 |
| 2.1 Ethical approval .....                      | 43 |
| 2.2 Experimental design .....                   | 43 |
| 2.3 Experimental infection procedure .....      | 44 |
| 2.4 Clinical Parameters .....                   | 44 |
| 2.5 Serology .....                              | 44 |
| 2.6 Electroejaculation and semen analysis ..... | 45 |
| 2.7 PCR analysis .....                          | 46 |
| 3 RESULTS .....                                 | 47 |
| 3.1 Clinical parameters .....                   | 47 |
| 3.2 Serology .....                              | 47 |
| 3.3 Seminal parameters.....                     | 48 |
| 3.4 PCR Analysis .....                          | 48 |
| 4 DISCUSSION .....                              | 50 |
| 5 CONCLUSION .....                              | 53 |
| 6 REFERENCES .....                              | 53 |

**CAPÍTULO 4- Standardization failure of an indirect ELISA for detection of fecal immunoglobulins to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in deer**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>feces.....</b>                                  | <b>60</b> |
| 1 INTRODUCTION .....                               | 60        |
| 2 MATERIALS AND METHODS.....                       | 62        |
| 2.1 Ethical approval .....                         | 62        |
| 2.2 Experimental design .....                      | 62        |
| 2.3 Fecal extract preparation and storage .....    | 63        |
| 2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)..... | 63        |
| 3 RESULTS .....                                    | 65        |
| 4 DISCUSSION .....                                 | 65        |
| 5 REFERENCES .....                                 | 69        |

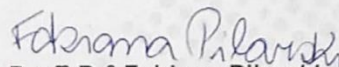
**CAPÍTULO 5 – Considerações finais .....74**

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Uso do teste de ELISA para detecção de imunoglobulinas secretoras específicas nas fezes de cervídeos e sua correlação com imunoglobulinas séricas", protocolo nº 003732/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

|                     |   |
|---------------------|---|
| Vigência do Projeto | 15/04/2018 a 30/11/2021   |
| Espécie / Linhagem  | Cervídeos do gênero <i>Mazama sp.</i> <i>Odocoileus virginianus</i> e <i>Ozotocerus bezoarticus</i> |
| Nº de animais       | 25  |
| Peso / Idade        | 13 a 50 Kg  |
| Sexo                | Ambos os sexos  |
| Origem              | Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos – NUPECCE   |

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.

  
**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



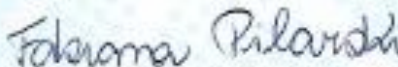
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Toxoplasmose em *Mazama gouazoubira*: Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e reprodutivos em machos experimentalmente infectados**", protocolo nº 06892/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de junho de 2019.

|                     |   |
|---------------------|---|
| Vigência do Projeto | 13/07/2019 a 13/07/2020                                 |
| Espécie / Linhagem  | Veado – catingueiro / <i>Mazama gouazoubira</i>         |
| Nº de animais       | 05 (cinco)  |
| Peso / Idade        | 15 kg / 01 a 08 anos                                    |
| Sexo                | Machos  |
| Origem              | Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos - NUPECCE |

Jaboticabal, 13 de junho de 2019.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Pilarski  
Coordenadora – CEUA

## RESUMO

A maior parte dos dados descritos na literatura sobre patógenos de cervídeos neotropicais são provenientes de levantamentos sorológicos, informações sobre vias de transmissão e avaliações clínicas ainda são escasos. O presente trabalho teve como objetivos: a) estimar a prevalência de cervídeos positivos para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em 92 animais mantidos em cativeiro; b) Avaliar a probabilidade de diferentes vias de transmissão do *T. gondii* e *N. caninum*; c) avaliar a sintomatologia clínica e resposta imune humoral de machos de veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) infectados experimentalmente com oocistos da cepa ME49 (genotipo tipo II) de *T. gondii* e d) padronizar a técnica de ELISA indireta para detecção de anticorpos fecais específicos para *T. gondii* e *N. caninum*. Inicialmente, foram colhidas amostras dos animais cervídeos pertencentes a dois criadouro conservacionistas e comparados os resultados sorológicos obtidos nos testes de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA indireto pelo teste de concordância Kappa de Cohen. Em seguida, foram desenhadas árvores genealógicas dos animais de cada espécie para estimativa da taxa de transmissão congênita de cada doença. A prevalência estimada para *T. gondii* foi de 20,73% pela técnica de RIFI e 25,60% por ELISA, apresentando uma concordância razoável ( $\kappa = 0,277$ ) entre as duas técnicas sorológicas utilizadas. Já para *N. caninum* a prevalência estimada foi de 40,24% por RIFI e 39,02% por ELISA com uma correlação quase perfeita ( $\kappa = 0,83$ ) entre as técnicas. A taxa de transmissão congênita, estimada com base em números de filhos positivos de mães positivas entre o número total de filhos de mães positivas, diferiu bastante entre as doenças, sendo de 0% para toxoplasmose e 81,25% para neosporose. No capítulo 3, para a infecção experimental dos animais, quatro machos da espécie *Mazama gouazoubira* foram infectados experimentalmente com 5000 oocistos esporulados de *T. gondii* da cepa ME49, enquanto um animal soronegativo foi usado como controle. Os animais foram monitorados quanto aos parâmetros clínicos de -7 a 40 dias após a infecção (dpi). Amostras de sangue foram coletadas semanalmente até 49 dpi para detecção de anticorpos pelo teste de ELISA. A cada 15 dias os animais foram submetidos à contenção química e coleta de sêmen por eletroejaculação e o material genético das amostras de sêmen foi extraído para posterior análise por PCR para *T. gondii*. Apenas dois dos quatro animais infectados desenvolveram resposta de anticorpos detectável no teste de ELISA, e mesmo sem nenhum animal ter manifestado sinais clínicos da infecção, o material genético do parasita foi encontrado no sêmen dos animais soropositivos aos 35 e 49 dpi. A terceira etapa do projeto visou a padronização da técnica de ELISA para detecção de imunoglobulinas fecais contra os dois patógenos. Amostras de fezes frescas foram coletadas, extraídas e armazenadas em nitrogênio líquido ou processadas imediatamente. Um pool de amostras de animais soropositivos foi utilizado como controle positivo para *N. caninum* e um pool de amostras de animais experimentalmente infectados foi usado como controle para *T. gondii*. Mesmo com diversas alterações de protocolos não foi possível contornar o problema da baixa

especificidade do teste, constatada pelos altos ruídos nas leituras das placas. Foi possível concluir que as técnicas sorológicas provaram ser muito úteis para estudos epidemiológicos em animais de cativeiro, tendo diversas aplicações além da simples estimativa da prevalência, porém sem a padronização de um método não invasivo de detecção de anticorpos, estudos epidemiológicos em populações de vida-livre ainda são um grande desafio. Nesses estudos foi possível inferir que a principal via de transmissão do *N. caninum* em cervídeos é a via congênita, de forma semelhante ao que se observa em bovinos, enquanto que o *T. gondii* parece utilizar da via horizontal para a transmissão na maioria dos casos. Além disso, a infecção experimental com 5000 oocistos esporulados de *T. gondii* não causou sinais clínicos nos animais estudados, sugerindo que a espécie apresenta certa resistência à doença, por outro lado, a detecção do DNA do parasito no sêmen dos animais sugere que a transmissão sexual é uma possibilidade nessas espécies, o que deve ser levado em consideração por criadouros conservacionistas.

## ABSTRACT

Most of the data on neotropical deer pathogens come from serological surveys, little is known about transmission routes and clinical evaluations. The present study aimed to: a) estimate the prevalence of positive cervids for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in animals kept in captivity; b) Assess different routes of infection of *T. gondii* and *N. caninum* on these deer populations; c) Evaluate the clinical symptomatology and humoral immune response of male brocket deer (*Mazama gouazoubira*) experimentally infected with *T. gondii* (ME49 strain) oocysts; and d) Standardize an indirect ELISA technique for non-invasive detection of specific fecal antibodies to *T. gondii* and *N. caninum*. Initially, deer serum samples collected from animals from two conservation breeding centers were tested by both techniques making it possible to compare the results obtained in the indirect immunofluorescence tests (IFAT) and indirect ELISA by the Cohen's Kappa concordance test. Furthermore, family trees were drawn for each species to estimate the congenital transmission rate of both diseases. The *T. gondii* prevalence were 20,73% by IFAT and 25,60 by ELISA, with , with an fair agreement of  $\kappa = 0.277$  between the two serological techniques. For *N. caninum*, the antibody prevalence was 40,24% by IFAT and 39,02% by ELISA, with a almost perfect correlation of  $\kappa = 0.83$  between techniques. The congenital transmission rate, estimated by the number of positive offspring from positive mothers by the total of positive mother offspring, differed significantly between diseases, resulting in 0% for Toxoplasmosis and 81,25% for Neosporosis. In Chapter 3, four *Mazama gouazoubira* males were inoculated with 5000 sporulated *T. gondii* oocysts (ME49), while one seronegative animal was used as a control. Animals were monitored for clinical parameters from -7 to 40 days post-infection (dpi). Blood samples were collected weekly up to 49 dpi for antibody detection by the previously standardized ELISA test. Once every 15 days, the animals were chemical restraint for semen collection by electroejaculation. DNA of the semen samples was extracted for *T. gondii* PCR analysis. Only two from four infected animals developed an antibody response detectable in the ELISA test, and despite the animals didn't manifest any clinical signs, the parasite's genetic material was found in the semen of the seropositive animals at 35 and 49 dpi. In the third step, the standardization of ELISA technique for detection of fecal immunoglobulins against the two pathogens was carried out, aiming to apply the methodology to epidemiological studies in free-living animals. Fresh stool samples were collected, extracted and stored in liquid nitrogen or processed immediately. A pool of samples from seropositive animals was used as a positive control for *N. caninum* and a pool of samples from experimentally infected animals was used as a control for *T. gondii*. Even with several protocol changes, it was not possible to overcome the problem of the low specificity evidenced by the high background at plate readings. Finally, it was possible to conclude that serological techniques have proved very useful for epidemiological studies in captive animals, having several applications beyond the simple estimation of prevalence, but without the standardization of a non-invasive method of detection of antibodies, epidemiological studies in free-living populations are still challenging. Whith these studies it was possible to infer tha the congenital transmission is the major route of infection os *N. caninum* in neotropical deer, in the other hand, horizontal transmission seem to be more important to *T. gondii* epidemiology in these species. Furthermore, the experimental infection with 5000 *T. gondii* oocysts did not caused clinical signs in *Mazama gouazoubira*, implying that the specie present some resistance to the disease, still, the detection of the parasite in semen samples indicate the possibility of sexual transmission of *T. gondii* in cervids,

and breeding centers should take this into account for better reproductive performance of the animals.

## LISTAS DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

**Figure 1.** Family tree of red brocket (*Mazama americana*) from Deer Research and Conservation Center – UNESP/ SP.

**Figure 2.** Family tree of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*), pampas deer (*Ozotoceros bezarticus*), amazonian brown brocket (*Mazama nemorivaga*) and dwarf red brocket (*Mazama nana*) and small red brocket (*Mazama bororo*) from Deer Research and Conservation Center – UNESP/ SP.

**Figure 3.** Family tree of marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) from the Marsh Deer Conservation Center – Tijoá/ SP).

### CAPÍTULO 3

**Figure 1.** Percentual of optical density (OD) values obtained in indirect ELISA readings from infected (M1, M2, M3, M4) and uninfected brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) during the experiment.

**Figure 2.** Seminal parameters. Line graphs represent the values of sperm motility index (%), membrane integrity (%), acrosome integrity (%), semen volume (ml), total defects (%), minor defects (%), major defects (%), sperm concentration (sptz/ejaculate) from male 1 (●), male 2 (■), and male 3 (▲), male 4 (▼) and male 0 (◆)

### CAPÍTULO 4

**Fig 1.** Schematic representation of (A) serial dilutions of antigen in the ELISA plate wells, wells 6 received carbonate-bicarbonate buffer only and (B) serial dilutions of fecal extracts, wells F received blocking buffer (1% ovalbumin in PBS Tween 20) only.

**Fig 2.** Graph relating OD values for different *T. gondii* antigen concentrations against dilutions series of samples in carbonate-bicarbonate buffer. Curves show titration of



antiserum at different dilutions from wells 1-5. Wells 6 received a carbonate-bicarbonate buffer only.

**Fig 3.** Graph relating OD values for different *N. caninum* antigen concentrations against dilutions series of samples in carbonate-bicarbonate buffer. Curves show titration of antiserum at different dilutions from wells 1-5. Wells 6 received a carbonate-bicarbonate buffer only.

## CAPÍTULO 1- Considerações gerais

### 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mundo está sofrendo uma rápida mudança em seus ecossistemas, e diversos patógenos, vetores e hospedeiros acompanham essas mudanças rapidamente. Patógenos introduzidos podem causar doenças graves em animais selvagens, e em alguns casos os animais selvagens podem servir de reservatórios para agentes patogênicos sem desenvolverem sinais clínicos, exercendo um importante papel na epidemiologia de diversas doenças emergentes (Bengis et al., 2002).

Doenças infecciosas são citadas como uma das causas de declínio de populações de cervídeos neotropicais entre elas o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (Duarte et al., 2012a) e do veado-mateiro (*Mazama americana*), como consequência da perda do habitat e maior contato com animais domésticos que podem transmitir febre aftosa (Araujo Júnior et al., 2010), leptospirose (Mathias et al. 1999, Galli et al. 2014), toxoplasmose (Ferreira et al. 1997), tuberculose (Luna et al. 2003), hemoparasitos (Grazziotin et al., 2011; Sacchi et al., 2012), ectoparasitas (Szabó et al., 1999; Szabó et al., 2003) e endoparasitas diversos (Tiemann et al., 2005; Duarte et al., 2012b). As enfermidades comuns a animais domésticos também são citadas como possível causa de declínio de populações de veado-de-mão-curta (*M. nana*), porém há uma carência de estudos epidemiológicos com essas espécies (Duarte et al., 2012c). Mesmo com esses relatos, ainda pouco se sabe sobre a dinâmica das doenças infecciosas em cervídeos neotropicais. A maior parte dos estudos é proveniente de levantamentos sorológicos de populações em cativeiros e de espécies de cervídeos que ocorrem em zonas temperadas.

A forma como uma doença se dissemina em um ecossistema depende de vários fatores, incluindo espécies envolvidas, o nicho ecológico e a estrutura social dos animais. Para a realização de um estudo epidemiológico é necessária colheita de dados e amostras de vários indivíduos. Em um estudo envolvendo animais selvagens de vida-livre, a colheita de amostras geralmente requer que os animais sejam capturados, o que frequentemente é um manejo problemático. Isso faz com que experimentos de larga escala sejam prejudicados devido à maior parte dos estudos serem realizados com número de amostras insuficientes, levando a uma

dificuldade de extrapolação desses dados, o que pode conduzir a erros de interpretação (Caley et al. 2009). Dentre os animais selvagens, os cervídeos são animais reconhecidamente sensíveis aos efeitos do estresse, sendo comum advirem acidentes traumáticos, sérios problemas cardiorrespiratórios e distúrbios metabólicos graves como a acidose e a miopatia de captura (Nunes et al., 2007). Portanto, procedimentos de captura de cervídeos requerem muita cautela e habilidade da equipe e podem representar um grande risco à vida desses animais (Duarte et al., 2010). Por esse motivo, técnicas não invasivas de diagnóstico de enfermidades representariam um grande avanço no estudo de patologia e epidemiologia em cervídeos neotropicais.

Parasitas que causam problemas reprodutivos em ruminantes domésticos também representam um fator de risco em potencial para o sucesso na reprodução de cervídeos em cativeiro. O conhecimento das manifestações clínicas e como a doença é introduzida e se mantém em populações de cervídeos é muito importante para programas de conservação de espécies silvestres. Tendo isso em vista, o presente trabalho teve como objetivo utilizar técnicas sorológicas, especialmente o teste de ELISA para avaliar a prevalência, vias de transmissão e susceptibilidade clínica à toxoplasmose e neosporose de duas populações de cervídeos mantidos em cativeiro. Além disso, realizar a padronização do teste de ELISA indireto para procura de imunoglobulinas fecais específicas para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, buscando assim uma forma de diagnóstico não invasivo que pudesse ser utilizada em animais de vida livre.

## 5 CONCLUSION

Neotropical deer do not appear to develop clinical manifestations of infection for *T. gondii* ME49 strain (genotype II), however, the presence of the protozoa DNA in seminal samples suggests that sexual transmission may be a viable route of infection in deer species. We must consider the possibility that recently infected females may have gestational complications due to infection, reducing fetal viability and negatively impacting the fitness of captivity or free-ranging populations.

## 6 REFERENCES

- Arantes, T.P., Lopes, W.D.Z., Ferreira, R.M., Pieroni, J.S.P., Pinto, V.M.R., Sakamoto, C.A., Costa, A.J. da, 2009. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. *Exp. Parasitol.* 123, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.003>
- Bag, S., Saha, B., Mehta, O., Anbumani, D., Kumar, N., Dayal, M., Pant, A., Kumar, P., Saxena, S., Allin, K.H., Hansen, T., Arumugam, M., Vestergaard, H., Pedersen, O., Pereira, V., Abraham, P., Tripathi, R., Wadhwa, N., Bhatnagar, S., Prakash, V.G., Radha, V., Anjana, R.M., Mohan, V., Takeda, K., Kurakawa, T., Nair, G.B., Das, B., 2016. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. *Sci. Rep.* 6, 26775. <https://doi.org/10.1038/srep26775>.
- Barth AD, Oko R.1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa University Press, Iowa.

Baszler, T. V., Dubey, J. P., Löhr, C. V., Foreyt, W. J. 2000. Toxoplasmic encephalitis in a free-ranging rocky mountain bighorn sheep from Washington J. Wildl. Dis., 36(4), 752–754.

Blom, E., 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. Nord. Vet. Med. 25, 383–391.

Carme, B., Bissuel, F., Ajzenberg, D., Bouyne, R., Aznar, C., Demar, M., Bichat, S., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Peneau, C., Neron, P., Dardé, M.L., 2002. Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. J Clin. Microbiol. 40, 4037–4044. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002>

CBRA, 1998. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal., 2nd ed. CBRA, Belo Horizonte.

Chiebao, D.P., Pena, H.F., Passarelli, D., Santín, T., Pulz, L.H., Strefezzi, R.F., Sevá, A.P., Martins, C.M., Lopes, E.G., Grisi Filho, J.H.H., Gennari, S.M., Soares, R.M., 2019. Congenital Transmission of *Toxoplasma gondii* After Experimental Reinfection With Brazilian Typical Strains in Chronically Infected Sheep. Front. Vet. Sci. 6, 93. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00093>

Costa, A.J., Araujo, F.G., Costa, J.O., Lima, J.D., Nascimento, E., 1977. Experimental Infection of Bovines with Oocysts of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 63, 212. <https://doi.org/10.2307/3280042>

Dalimi, A., Abdoli, A., 2013. *Toxoplasma gondii* and Male Reproduction Impairment: A new Aspect of Toxoplasmosis Research. Jundishapur J Microbiol 6. <https://doi.org/10.5812/jjm.7184>

Dass, S.A.H., Vasudevan, A., Dutta, D., Soh, L.J.T., Sapolsky, R.M., Vyas, A., 2011. Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* Manipulates Mate Choice in Rats by Enhancing Attractiveness of Males. PLoS ONE 6, e27229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027229>

Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Dardé, M.-L., Dei-Cas, E., Houfflin-Debarge, V., 2010. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. Prenat. Diagn. 30, 902–905. <https://doi.org/10.1002/pd.2563>

de Moraes, É.P.B.X., Batista, A.M., Faria, E.B., Freire, R.L., Freitas, A.C., Silva, M.A.R., Braga, V.A., Mota, R.A., 2010. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Vet. Parasitol.* 170, 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.017>

de Thoïs, B., Demar, M., Aznar, C., Carme, B., 2003. Ecologic Correlates of *Toxoplasma gondii* Exposure in Free-ranging Neotropical Mammals. *J. Wildl. Dis.* 39, 456–459. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.2.456>

Duarte, J.M.B., Garcia, J.M., 1997. Tecnologia para a propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção, in: *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos Blastoceros, Ozotoceros e Mazama*. Funep, Jaboticabal, pp. 228–238.

Duarte, J.M.B., Vogliotti, A., Zanetti, E. dos S., de Oliveira, M. L. Tiepolo, L. M., Rodrigues, L.F., de Almeida, L. B., 2012. Avaliação do Risco de Extinção do Veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* G Ficher [von Waldhein], 1814 no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* 3, 50-58.

Dubey, J.P., Thorne, E.T., Sharma, S.P., 1980. Experimental toxoplasmosis in elk (*Cervus canadensis*). *Am. J. Vet. Res.* 41, 792–793.

Dubey, J.P., Thorne, E.T., Williams, E.S., 1982. Induced toxoplasmosis in pronghorns and mule deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 1263–1267.

Dubey, J.P., Sundar, N., Gennari, S.M., Minervino, A.H.H., Farias, N.A. da R., Ruas, J.L., dos Santos, T.R.B., Cavalcante, G.T., Kwok, O.C.H., Su, C., 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.* 143, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.024>

Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Ulrich, V., Gill, J., Carstensen, M., Sundar, N., Kwok, O.C.H., Thulliez, P., Majumdar, D., Su, C., 2008. Transplacental toxoplasmosis in naturally-infected white-tailed deer: Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from foetuses of different gestational ages. *Int. J. Parasitol.* 38, 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.11.010>

Esteban-Redondo, I., Innes, E.A., 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.* 28, 1459–1466. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00116-7)

Flegr, J., Klapilová, K., Kaňková, Š., 2014. Toxoplasmosis can be a sexually transmitted infection with serious clinical consequences. Not all routes of infection are created equal. *Med. Hypotheses.* 83, 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.05.019>

Formenti, N., Trogu, T., Pedrotti, L., Gaffuri, A., Lanfranchi, P., Ferrari, N., 2015. *Toxoplasma gondii* Infection in Alpine Red Deer (*Cervus elaphus*): Its Spread and Effects on Fertility. *PLoS ONE* 10, e0138472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138472>

Hlaváčová, J., Flegr, J., Řežábek, K., Calda, P., Kaňková, Š., 2021. Male-to-Female Presumed Transmission of Toxoplasmosis Between Sexual Partners. *Am. J. Epidemiol.* 190, 386–392. <https://doi.org/10.1093/aje/kwaa198>

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. *International. J. Parasitol.* 30 (1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00170-8).

Howard JG. 1993. Semen collection and analysis in carnivores. In: Fowler ME, editor. *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. 3rd ed., W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 390–399.

Innes, E., Bartley, P.M., Buxton, D., Katzer, F., 2009. Ovine toxoplasmosis. *Parasitology.* 136,1887–1894.

Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *J. Infect. Dis.* 172, 1561–1566. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.6.1561>

IUCN, 2015. *Mazama gouazoubira*, in: Black-Decima, P. A., Vogliotti, a.: The IUCN red list of threatened species 2016: e. T29620a22154584. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T29620A22154584.en>

Kavaliers, M., Choleris, E., Pfaff, D.W., 2005. Genes, odours and the recognition of parasitized individuals by rodents. *Trends. Parasitol.* 21, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.07.008>

Khaki, A., Farzadi, L., Ahmadi, S., Ghadamkheir, E., Shojaee, S., Sahizadeh, R. (Eds.), 2011. Recovery of spermatogenesis by *Allium cepa* in *Toxoplasma gondii* infected rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 903–907.

Lindsay, D. S., Dubey, J. P., 2020. Toxoplasmosis in wild and domestic animals, in: Weiss, L., Kim, K. *Toxoplasma Gondii*, 3 ed. Academic Press, Cambridge and Massachusetts, pp.293–320. doi:10.1016/b978-0-12-815041-2.00006-2

Liu, S.G., Qin, C., Yao, Z.J., Wang, D., 2006. Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases* 24, 166–170.

Lopes, W.D.Z., Costa, A.J., Souza, F.A., Rodrigues, J.D.F., Costa, G.H.N., Soares, V.E., Silva, G.S., 2009a. Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Anim. Reprod. Sci.* 111, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.015>

Lopes, W.D.Z., da Costa, A.J., Santana, L.F., dos Santos, R.S., Rossanese, W.M., Lopes, W.C.Z., Costa, G.H.N., Sakamoto, C.A., dos Santos, T.R., 2009b. Aspects of *Toxoplasma* Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis Aries*). *J. Parasitol. Research* 2009, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2009/602803>

Lopes, W.D.Z., Rodriguez, J.D., Souza, F.A., dos Santos, T.R., dos Santos, R.S., Rosanese, W.M., Lopes, W.R.Z., Sakamoto, C.A., da Costa, A.J., 2013. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Vet. Parasitol.* 195, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.056>

Moura, A.B., Costa, A.J., Jordão Filho, S., Paim, B.B., Pinto, F.R., Di Mauro, D.C., 2007. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. *Pesq. Vet. Bras.* 27, 430–434. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007001000008>

Oksanen, A., Gustafsson, K., Lunden, A., Dubey, J.P., Thulliez, P., Uggla, A., 1996. Experimental *Toxoplasma gondii* Infection Leading to Fatal Enteritis in Reindeer (*Rangifer tarandus*). *The J. Parasitol.* 82, 843. <https://doi.org/10.2307/3283904>



Pena, H.F.J., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int. J. Parasitol.* 38, 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>

Pinder, L., Leeuwenberg, F. 1997. Veado-Catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher 1814) in: Duarte, J.M.B. (ed.). *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal. pp 60-68.

Pope, C.E., Zhang, Y.Z., Dresser, B.L. 1991. A simple staining method for quantifying the acrosomal status of cat spermatozoa. *J. Zoo. Wildl. Med.* 22,97–95. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90233-4](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90233-4).

Santana, L.F., Costa, A.J. da, Pieroni, J., Lopes, W.D.Z., Santos, R.S., Oliveira, G.P. de, Mendonça, R.P. de, Sakamoto, C.A.M., 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19, 179–182. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612010000300010>

Santana, Luís Fernando, Costa, A. J. da, Pieroni, J., Lopes, W. D. Z., Santos, R. S., Oliveira, G. P. de, Mendonça, R. P. de, Sakamoto, C. A. M., 2010. Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19(3), 179–182.

Santana, L.F., Rossi, G.A.M., Gaspar, R.C., Pinto, V.M.R., Oliveira, G.P. de, Costa, A.J. da, 2013. Evidence of sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in goats. *Small Ruminant Res.* 115, 130–133. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.08.008>

Scarpelli, L., Lopes, W.D.Z., Migani, M., Bresciani, K.D.S., Costa, A.J. da, 2009. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 59–64. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000100009>

Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>

Vieira, A.S., Rosinha, G.M.S., Oliveira, C.E. de, Vasconcellos, S.A., Lima-Borges, P.A., Tomás, W.M., Mourão, G.M., Lacerda, A.C.R., Soares, C.O., Araújo, F.R. de, Piovezan, U., Zucco, C.A., Pellegrin, A.O., 2011. Survey of *Leptospira* spp in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Pantanal wetlands of the state of Mato Grosso

do Sul, Brazil by serology and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 763–768. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600019>

Vikøren, T., Tharaldsen, J., Fredriksen, B., Handeland, K., 2004. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway. *Vet. Parasitol.* 120, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.015>

Vyas, A., 2013. Parasite-augmented mate choice and reduction in innate fear in rats infected by *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Biol.* 216, 120–126. <https://doi.org/10.1242/jeb.072983>

Williamson, J.M.W., Williams, H., Sharman, G.A.M., 1980. Toxoplasmosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Scotland. *Vet. Sci. Res. J.* 29, 36–40. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32682-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32682-1)

Zimpel, C.K., Grazziotin, A.L., Barros Filho, I.R. de, Guimaraes, A.M. de S., Santos, L.C. dos, Moraes, W. de, Cubas, Z.S., Oliveira, M.J. de, Pituco, E.M., Lara, M. do C.C. de S.H., Villalobos, E.M.C., Silva, L.M.P., Cunha, E.M.S., Castro, V., Biondo, A.W., 2015. Occurrence of antibodies anti -*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira interrogans* in a captive deer herd in Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24, 482–487. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015065>