
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

EMILLY RIBEIRO

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EM SOLO DE RECINTOS DE
ANIMAIS LOCADOS NO ZOOLOGICO DE BAURU - SP

Bauru
2022

EMILLY RIBEIRO

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE *Toxoplasma gondii* EM SOLO DE RECINTOS DE
ANIMAIS LOCADOS NO ZOOLOGICO DE BAURU - SP

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Estadual “Júlio
de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título
de bacharel em Ciências Biológicas, área
de concentração Meio Ambiente.
Orientador: Simone Baldini Lucheis

Bauru
2022

Ribeiro, Emilly.

Avaliação molecular de *Toxoplasma gondii* em solos de recintos de animais locados no Zoológico de Bauru - SP / Emilly Ribeiro, 2022

46 f. : il.

Orientador: Simone Baldini Luccheis

Monografia (Graduação)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2022

1. Toxoplasmose. 2. Zoológico. 3. Solo. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

Bauru, 04 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Fábio Porto Foresti

Assinatura

Sergio Pereira

Assinatura

Simone Baldini Lucheis

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e a minha família, que sempre incentivaram meus estudos e minhas escolhas profissionais. Minha mãe, que sempre me apoia e incentiva a ser uma pessoa melhor. Meu pai que sempre cuidou de mim e me incentiva a ser independente.

Aos meus amigos, minha rede de apoio que é essencial pra mim. Agradeço aos meus amigos de São Paulo, que mantenho desde o ensino fundamental e possuo um carinho enorme. Marcella, Isabella, Bia, Denise e Vitor, amo vocês e agradeço pelos momentos que passamos juntos, vocês me ajudaram a chegar até aqui.

As minhas amigas que fiz em Mogi das Cruzes, cidade onde morei apenas um ano e meio e fiz duas amizades incríveis que são muito especiais pra mim, Gabi e Carol, amo vocês demais e sei que vou levar vocês pra vida.

As amizades que fiz em Bauru, cidade onde morei por 6 anos e tive a oportunidade de conhecer muitas pessoas incríveis. Juliana, uma amizade que não tenho palavras pra descrever o quão importante foi durante esse momento confuso que é a graduação. Entre essas pessoas incríveis, gostaria de mencionar meus amigos Luan Pink, Isabella Oppici, Azu, Yasmin, Tamy, Raquel e a querida Professora Carol, que me ensinou muito como professora e como pessoa.

Obrigada Ju, por ser incrível em todos os sentidos possíveis, por ser a pessoa com quem eu possa dividir todos os momentos e sentimentos, sei que posso contar com você e você comigo. Te amo demais.

Obrigada Let, uma amiga que apareceu no meu último ano da licenciatura, mas logo ganhou todo meu respeito, carinho e admiração. Você é uma pessoa incrível e me transmite uma sensação de paz e conforto. Obrigada por tudo e por tanto. Te amo.

Agradeço imensamente a minha amiga de infância, Larissa, com quem tenho uma conexão tão forte e especial que é única. Você é uma das poucas coisas constantes na minha vida e ainda aprendo muito com você. Te amo e admiro pra sempre.

Gostaria de agradecer também aos meus professores da universidade, aos técnicos de laboratório e monitores, que me auxiliaram de várias formas durante a graduação. Agradeço também a FAPESP pelo financiamento da pesquisa.

A minha orientadora Simone, que confiou em mim e me auxiliou sempre que precisei e aos meus amigos Lívia e Wesley que me ensinaram muito.

RESUMO

A toxoplasmose é uma das infecções parasitárias mais prevalentes em animais e humanos em todo o mundo, sendo motivo de atenção de muitos pesquisadores que, nas últimas décadas, buscam identificar as fontes de infecções de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) para otimizar a adoção de medidas preventivas. Estudos de caso-controle feitos previamente estimam que os humanos são infectados principalmente pelo consumo de carne crua ou mal cozida ou pela ingestão de frutas, vegetais, solo, frutos do mar ou água contaminada com oocistos deste protozoário. Solo contaminado com oocistos de *T. gondii* é uma grande fonte de infecção para animais e humanos, mas raramente foi diretamente detectada, devido à falta de métodos apropriados. Tendo em vista a toxoplasmose ser uma zoonose amplamente disseminada e de grande importância em saúde pública, propusemos a realização deste estudo com o objetivo de pesquisar *T. gondii* em solo de 30 recintos de diferentes espécies de animais procedentes do Zoológico de Bauru (SP) pela amplificação do DNA do protozoário com o uso da Reação em Cadeia da Polimerase convencional. A PCR para *T. gondii* foi realizada a partir dos primers TOX4 e TOX5, os quais amplificam 529pb. Os resultados demonstraram que as amostras de solo procedentes de dois recintos dos macacos africanos das espécies *Papio papio* (Babuíno comum) e *Papio hamadryas* (Babuíno Sagrado) foram positivas à prova de PCR para *T. gondii*, um resultado inédito neste ambiente, que revela a necessidade de um monitoramento sorológico para toxoplasmose nos animais do Zoológico de Bauru.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Oocistos, Solo, Zoológico, Zoonose, Diagnóstico

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the most prevalent parasitic infections in animals and humans around the world, being the subject of attention of many researchers who, in recent decades, seek to identify the sources of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infections to optimize the adoption of preventive measures. Previous case-control studies estimate that humans are infected mainly by eating raw or undercooked meat or by ingesting fruits, vegetables, soil, seafood or water contaminated with oocysts of this protozoan. Soil contaminated with *T. gondii* oocysts is a major source of infection for animals and humans, but it has rarely been directly detected, due to the lack of appropriate methods. Considering that toxoplasmosis is a widely disseminated zoonosis of great importance in public health, we proposed to carry out this study with the objective of researching *T. gondii* in the soil of 30 enclosures of different species of animals from the Bauru Zoo (SP) by amplification of the protozoan DNA using the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR for *T. gondii* was performed using primers TOX4 and TOX5, which amplify 529bp (Homan et al., 2000). The results showed that soil samples from two enclosures of African monkeys of the species *Papio papio* (Common Baboon) and *Papio hamadryas* (Sacred Baboon) were PCR positive for *T. gondii*, an unprecedented result in this environment that reveals the need for a Serological monitoring for toxoplasmosis in animals at the Bauru Zoo.

Keywords: Toxoplasmosis, Oocysts, Soil, Zoo, Zoonosis, Diagnosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Características gerais do protozoário	10
1.2 As três formas do protozoário e ciclo de reprodução	10
1.3 A toxoplasmose em humanos – sintomas e diagnóstico	11
1.4 Formas de transmissão do protozoário	12
1.5 A doença no Brasil	12
1.6 A toxoplasmose em animais silvestres	13
1.7 O Parque Zoológico Municipal de Bauru	14
2. OBJETIVO	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Tamanho amostral e local de realização das técnicas diagnósticas	15
3.2 Amostras de solo	17
3.3 Exames moleculares	17
3.3.1 Recuperação de oocistos das amostras de solo	17
3.3.2 Extração do DNA	18
3.3.3 Quantificação do DNA	18
3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) a partir de amostras de solo para <i>Toxoplasma gondii</i>	19
3.3.5 Eletroforese em gel de agarose	20
3.3.6 Controles	20
4. RESULTADOS	20
4.1 Local da coleta do material biológico	20
4.2 Tamanho amostral, procedência dos animais e coletas de material biológico	21
4.3 Recuperação de oocistos	24
4.4 Extração de DNA	27

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) e Eletroforese..	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do protozoário

A toxoplasmose, doença causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), é uma das zoonoses mais comuns entre humanos, infectando cerca de 1/3 da população mundial (SAADATNIA; GOLKAR, 2012; FLEGR et al., 2014). Além dos humanos, *T. gondii* infecta praticamente todos os animais homeotérmicos no mundo, como mamíferos e aves (DUBEY, 2010). Sua ampla distribuição global pode ser explicada por sua notável capacidade em invadir uma enorme variedade de células. A invasão na célula hospedeira é um processo ativo que depende da motilidade do parasito e da secreção sequencial de proteínas das organelas secretoras, as micronemas, as roptrias e os grânulos densos (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

Os primeiros relatos de identificação deste parasito foram realizados em dois países ao mesmo tempo: em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Manceaux em um roedor silvestre africano chamado *Ctenodactylus gundi*; e em 1908, no Brasil, por Splendore em coelhos de laboratório. A espécie foi descrita em 1909 com base na morfologia e o gênero *Toxoplasma* foi criado (*Toxo* = arco; *Plasma* = forma). Somente na década de 60 foi descrito o ciclo biológico completo do parasito e seus estágios evolutivos (FERGUSON, 2009).

Pertencente ao filo Apicomplexa, este parasito possui um complexo ciclo de vida heteróximo, constituído por dois tipos de reprodução: assexuada, dentro das células dos hospedeiros intermediários e sexuada, dentro das células epiteliais entéricas de felídeos, os hospedeiros definitivos (KAWAZOE; MINEO, 2012). Na natureza, existe em três formas: o oocisto, que libera esporozoítos; o cisto de tecido, que contém bradizoítos e o taquizoíto, forma invasiva de divisão rápida (KIM, 2018).

1.2 As três formas do protozoário e seu ciclo de reprodução

Os oocistos, estruturas ovais de 12 a 13 µm resultantes do ciclo sexuado do parasito, são excretados nas fezes de felídeos e após a esporulação no ambiente, passa a ser constituído por dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos infectantes. A parede do oocisto é uma estrutura de multicamadas extremamente robusta que protege o parasito de danos químicos e mecânicos. Isto permite que o parasito sobreviva por longos períodos em um ambiente úmido (MAI et al., 2009). Assim, a sobrevivência de oocistos esporulados no ambiente é favorecida pela umidade

e, sob condições ideais, os oocistos esporulados podem permanecer infectantes por mais de um ano. Essa pode ser uma das razões pelas quais a soroprevalência em humanos é maior em climas tropicais úmidos quando comparado ao clima seco (SCHLÜTER et al., 2014).

Após a ingestão oral de oocistos esporulados por novos hospedeiros, os esporozoítos liberados se transformam no estágio invasivo de divisão rápida, os taquizoítos. Os taquizoítos passam a penetrar ativamente as células nucleadas do hospedeiro e se replicam em um vacúolo intracitoplasmático, chamado de vacúolo parasitóforo. A replicação intravacuolar por endodiogenia se intensifica até que a célula hospedeira seja rompida e os taquizoítos livres invadem células vizinhas, circulando no corpo pelo sangue ou linfa, possibilitando a infecção de praticamente todos os tecidos. A forma de taquizoítos causa destruição tecidual e, portanto, é responsável pelas manifestações clínicas, o que caracteriza a fase aguda da doença (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

1.3 A toxoplasmose em humanos – sintomas e diagnóstico

O parasito *T. gondii* raramente causa manifestações clínicas em humanos saudáveis devido ao surgimento de uma resposta imune baseada em IFN- γ e IL-12, que induz a transformação de taquizoítos em bradizoítos intracelulares de replicação lenta que formam cistos teciduais persistentes, caracterizando a fase crônica da doença (YAROVINSKY, 2014). Os cistos teciduais podem ser encontrados em múltiplos órgãos, entretanto, eles são mais prevalentes em tecidos neurais e musculares, ou seja, cérebro, olhos, músculo esquelético e cardíaco; esses cistos podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro. Os cistos são infecciosos para hospedeiros intermediários e definitivos pelo consumo (carnivorismo) de tecido muscular ou cerebral contaminado (SCHLÜTER et al., 2014).

Em pacientes imunocomprometidos e fetos infectados pela passagem de taquizoítos pela placenta (infecção congênita), o parasito pode causar complicações como encefalite, cegueira, pneumonia, entre outros (DUBEY, 2010). Além disso, a toxoplasmose é a maior causa de abortos espontâneos e nascimentos prematuros em humanos (GOTTELAND et al., 2014).

O diagnóstico é normalmente realizado com o uso de métodos sorológicos, embora cistos teciduais possam ser observados em amostras de biópsia. O diagnóstico das infecções congênicas pode ser alcançado pela detecção do DNA de

T. gondii no líquido amniótico, utilizando-se métodos moleculares, tais como PCR (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

1.4 Formas de transmissão do protozoário

A transmissão do parasito pode ocorrer pela ingestão de oocistos presentes em solo, água e alimentos contaminados, pela ingestão de cistos teciduais presentes em carne crua ou mal cozida, através da placenta (congenita), e mais raramente por transplante de órgãos contaminados com cistos teciduais, pela transfusão de sangue contendo taquizoítos e por acidentes laboratoriais (ELMORE et al., 2010).

De acordo com Dubey et al. (2012), o consumo de carne contaminada com cistos teciduais e a ingestão de oocistos do meio ambiente são os dois modos mais importantes de transmissão de *T. gondii*.

Assim, um dos fatores importantes para a transmissão de *T. gondii* a humanos é o número de felídeos infectados e a consequente prevalência de oocistos no meio ambiente. Notavelmente, um único felídeo pode eliminar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados num período de até duas semanas, que se tornam infecciosos dentro de um a cinco dias depois da eliminação (DUBEY, 2010). As taxas de soropositividade em felídeos silvestres são, em geral, muito altas e podem estar próximas a 100%, enquanto a soroprevalência global de *T. gondii* em gatos domésticos é de 30-40% (ELMORE et al., 2010).

1.5 A doença no Brasil

No Brasil, o parasito já foi encontrado em alimentos e praças públicas. Dos Santos et al. (2010) encontraram oocistos de *T. gondii* em 7 de 31 amostras de solo de 31 parques infantis de escolas públicas na região noroeste do Estado de São Paulo. Esta é uma taxa alarmante de contaminação do solo considerando que se trata de uma área urbana e frequentada por crianças. Marchioro et al. (2016), pela primeira vez no Brasil, encontraram oocistos em vegetais orgânicos e não orgânicos, com uma taxa de contaminação de 3,8%.

Pinto-Ferreira et al. (2019) relataram um surto de toxoplasmose humana em uma instituição de pesquisa em Londrina, Paraná, Brasil e, após análise dos dados epidemiológicos, o consumo de hortaliças no restaurante da instituição foi a única variável associada com a ocorrência da doença, tendo-se veiculado o agente pela

água utilizada na lavagem dos alimentos, sendo que a boa prática de manipulação de alimentos poderia ter impedido a ocorrência do surto.

Esses dados indicam que os oocistos são uma grande fonte de contaminação no país, devido a sua resistência ao ambiente e ao clima tropical úmido que favorece a sobrevivência do parasito.

1.6 A toxoplasmose em animais silvestres

No Brasil, levantamentos sorológicos realizados até o momento indicam que *T. gondii* circula amplamente entre populações de felídeos neotropicais e exóticas em zoológicos (SILVA et al., 2007; ANDRÉ et al., 2010; MINERVINO et al., 2010; ULLMANN et al., 2010; CAÑON-FRANCO et al., 2013). O isolamento e a caracterização genotípica do parasito em *Puma yagouaroundi* (Jaguarundi) de um zoológico brasileiro confirmam essa observação (PENA et al., 2011). Silva et al. (2001b) realizaram uma pesquisa sorológica em felinos selvagens exóticos mantidos em cativeiro em 12 zoológicos brasileiros que resultou em 64,9% (24/37) de soropositividade, enquanto 54,6% (472/865) dos felinos neotropicais apresentaram anticorpos contra *T. gondii* em uma pesquisa incluindo 86 instituições de 20 estados brasileiros.

Estudos comprovaram também que o parasito circula entre diversas espécies de mamíferos (hospedeiros intermediários) em zoológicos e centros de conservação, como canídeos, roedores, primatas neotropicais e até mamíferos aquáticos como o peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus*) (ATTADEMO et al., 2016; MINERVINO et al., 2017; MINERVINO et al. 2010). Vitaliano et al. (2014) encontraram anticorpos contra *T. gondii* em 6 de 27 aves (22.2%) e em 13 de 26 (50%) de mamíferos mantidos em recintos.

Um estudo realizado no México, verificou presença de oocistos de *T. gondii* a partir de fezes de 35 felídeos silvestres, de dez espécies diferentes e procedentes de dez diferentes zoológicos. À microscopia direta não foram observados oocistos esporulados de *T. gondii* nas amostras de fezes avaliadas, porém à PCR 5/35 (14,3%) amostras foram positivas (GOMEZ-RIOS et al. 2019). Em um outro estudo, realizado na República Tcheca por Bartová et al. (2018), avaliou sorologicamente a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 1043 animais de zoológicos, tendo-se encontrado 33% de animais sorologicamente positivos, com maior prevalência de soropositivos entre as espécies carnívoras (66%).

1.7 O Parque Zoológico Municipal de Bauru

Assim, este estudo visou realizar a pesquisa de *T. gondii* pelo levantamento da contaminação do solo de recintos de animais locados no Parque Zoológico Municipal de Bauru, interior do estado de São Paulo e situa-se nas coordenadas 22°20' de latitude sul e 49°01' de longitude oeste. Atualmente, o parque possui uma área de 20 alqueires, que está inserida em um ambiente de cerrado de mais de 200 alqueires.

É considerado um zoológico de grande destaque no país, possuindo aproximadamente 880 animais e 227 espécies e recebendo cerca de 210.000 visitantes por ano. Os animais que residem no zoológico são provenientes de diferentes continentes, incluindo países da África, Ásia, Austrália, Europa, Américas do Norte e do Sul, embora a maioria seja proveniente da fauna brasileira.

Em 2013, ocorreram casos de toxoplasmose no Parque Zoológico Municipal de Bauru - SP, causando o óbito de algumas espécies animais, destacando-se os primatas não humanos africanos e pinguins, estes últimos possivelmente infectados pelo contato direto com a areia do recinto contaminada com oocistos. Este episódio gerou grande preocupação por parte dos setores responsáveis pela administração do local. Tal situação demonstra o risco de contaminação nos diferentes recintos dos animais e nas áreas externas, onde tratadores, médicos veterinários e seus auxiliares encontram-se expostos diariamente, bem como riscos para os transeuntes, já que o Parque Zoológico Municipal de Bauru é um local de intensa visitação, principalmente de crianças, justificando-se a investigação desta zoonose em recintos de animais locados no zoo.

Portanto, o solo dos recintos dos animais, bem como a área de estacionamento e área da praça de alimentação são passíveis de se contaminarem com oocistos de *T. gondii*, assim como pode haver a exposição à infecção dos animais bem como de seus tratadores e visitantes, caso estes recintos estejam contaminados; no entanto, esta avaliação nunca havia sido realizada em áreas do Zoo. Tendo em vista a toxoplasmose ser uma zoonose amplamente disseminada e de grande importância em saúde pública, propusemos a realização deste estudo.

2. OBJETIVO

Pesquisar *Toxoplasma gondii* em solo de recintos de animais procedentes do Zoológico de Bauru (SP), bem como em área de estacionamento e em praça de alimentação, pela amplificação do DNA do protozoário a partir de amostras de solo, com o uso da Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tamanho amostral e local de realização das técnicas diagnósticas

Foram coletadas amostras de 30 recintos locados no Parque Zoológico Municipal de Bauru - SP, localizado na Região Sudeste, situado na rodovia Comandante João Barros, s/nº no bairro de Vargem Limpa, na cidade de Bauru, no estado de São Paulo, nas coordenadas 22° 20' 27" S 49° 1' 10". Assim, são 128 amostras no total. O Quadro 1 apresenta uma relação de todos os recintos em que foram realizadas as coletas.

Quadro 1. Pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* a partir de oocistos em solo de recintos de animais silvestres, locados no Zoológico de Bauru-SP. Relação das espécies envolvidas com nome científico, nome popular e número de recintos pesquisados.

Nome científico	Nome popular	Número de recintos
<i>Ateles marginatus</i>	Macaco aranha de testa branca	11
<i>Alouatta fusca</i>	Bugio ruivo	
<i>Ateles paniscus</i>	Macaco aranha de cara vermelha	
<i>Alouatta caraya</i>	Bugio	
<i>Alouatta belzebul</i>	Guariba de mãos ruivas	
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Macaco barrigudo	
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Mico leão dourado	
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mico leão de cara dourada	
<i>Callicebus personatus</i>	Guigó	
<i>Saguinus fuscicollis</i>	Sagui de cara-suja	
<i>Saguinus labiatus</i>	Sagui de bigode	
<i>Pavo cristatus</i>	Pavão de ombros negros	5
<i>Pavo cristatus</i>	Pavão-azul	
<i>Pavo cristatus alba</i>	Pavão branco	
<i>Pavo cristatus</i>	Pavão arlequim	
<i>Pavo muticus</i>	Pavão verde	
<i>Threskiornis aethiopicus</i>	Ibis sagrado	3
<i>Coscoroba coscoroba</i>	Coscoroba	
<i>Syrigma sibilatrix</i>	Maria-Faceira	
<i>Theristicus caudatus</i>	Curicaca	
<i>Eudocimus ruber</i>	Guará	
<i>Macropus rufus</i>	Canguru vermelho	1
<i>Puma yagouaroundi</i>	Gato Mourisco	6
<i>Leopardus pardalis</i>	Jaguaririca	
<i>Puma concolor</i>	Onça Parda	
<i>Panthera tigris tigris</i>	Tigre Real de Bengala	
<i>Panthera leo</i>	Leão	
<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	
<i>Papio hamadryas</i>	Babuíno Sagrado	4
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandril	
<i>Erythrocebus pata</i>	Macaco Pata	
<i>Papio papio</i>	Babuíno Comum	
TOTAL		30

Os procedimentos laboratoriais para o exame molecular convencional das amostras de solo foram realizados no Laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Polo Centro-Oeste – Bauru-SP.

3.2 Amostras de solo

A coleta foi realizada com a supervisão do tratador responsável por cada setor de animais do zoológico. As amostras de solo foram retiradas da camada superficial (a uma profundidade de 5 cm) com colheres de plástico e de aço inoxidável previamente esterilizadas em laboratório e armazenadas em tubos Falcon graduados e esterilizados de 50 mL, para evitar a contaminação (Du et al., 2012). Foram coletadas 5g de solo em quatro (04) pontos de cada recinto, totalizando 20g de amostra por recinto. Os pontos de coleta foram divididos em categorias para posterior análise estatística. Os pontos foram: próximo a água dos animais, próximo à comida, próximo a fezes e no local de descanso dos animais. No caso de animais que não descansam em contato com o solo, o ponto do local de descanso foi trocado pelo ponto no centro do recinto.

3.3 Exames moleculares

3.3.1 Recuperação de oocistos das amostras de solo

A recuperação de oocistos de *T. gondii* das amostras de solo foi realizada de acordo com o método de flotação de sacarose proposto por Ramirez et al. (2006) para *Cryptosporidium* e utilizado para o diagnóstico molecular de *T. gondii* por Gotteland et al. (2014).

Um código foi designado às replicatas para identificação e cada amostra foi analisada separadamente. As amostras, coletadas em tubos Falcon de 50 mL, foram dispersas pela adição de 10 mL de água deionizada esterilizada em autoclave por 15 minutos, sendo então agitadas em vortex por 1 minuto. Em seguida, o mix de solo resultante foi sobreposto com 20 mL de solução fria (4°C) de açúcar (500g Dextrose e 6,5g de cristais de fenol em 320 ml de água deionizada, s.g = 1.2) e centrifugado a 1800 rcf por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante do mix foi removido e 35 mL de água destilada foi adicionada. A mistura foi centrifugada novamente a 1800 rcf por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em 200 µL de água destilada. A amostra foi, então, encaminhada para a etapa de extração de DNA.

3.3.2 Extração do DNA

A extração do DNA a partir das amostras de solo foi realizada com 3 diferentes kits de extração de acordo com a disponibilidade em laboratório. Foram utilizados o Kit comercial de Extração Kasvi Mini Spin, o Kit de Extração de DNA Cellco e o Kit Norgen Biotek Corp. Blood DNA isolation mini kit, seguindo-se as recomendações de cada fabricante. O DNA extraído das amostras foi mantido a -20°C até o momento do uso.

Antes de começar o procedimento e após o seu término, a bancada utilizada para a realização da extração foi limpa com hipoclorito de sódio. No procedimento do Kit comercial de Extração Kasvi Mini Spin, o Tampão de Eluição S foi aquecido a 56 °C no banho seco em quantidade suficiente para o trabalho, sendo usado 200µL em cada amostra. Em cada tubo de 1,5mL foram adicionados 25µL de Proteinase K e 200µL da amostra biológica. Cada tubo foi identificado corretamente e em seguida, agitados no vortex por 20 segundos. Depois, foram adicionados 200µL de Tampão de Lise em cada amostra seguido por agitação no vortex para homogeneizar a solução. As amostras foram colocadas em banho seco a 56°C por 15 minutos e em seguida, foram adicionados 200µL de etanol (100%) em cada amostra, que foram agitadas em vortex.

As amostras foram transferidas para um tubo Spin S, presente no kit e depois, foram adicionados 500µL de Tampão de Lavagem SI e elas foram centrifugadas a 11.000 rcf por 1 minuto. O tubo de coleta foi descartado e um novo tubo foi colocado no tubo Spin S. As amostras foram novamente centrifugadas a 11.000 rcf por 1 minuto. O filtrado foi descartado e o tubo de coleta reutilizado. Depois, foram adicionados 600µL de Tampão de Lavagem SII e as amostras foram novamente centrifugadas a 11.000 rcf por 1 minuto. O tubo de coleta foi descartado e o tubo Spin S foi colocado sobre um novo tubo de 1,5mL. Em seguida, foram adicionados 200µL de Tampão de Eluição S previamente aquecido a 56°C em cada amostra, que foram novamente centrifugadas a 11.000 rcf por 1 minuto. As amostras foram quantificadas e conservadas em freezer até o momento da cPCR.

3.3.3 Quantificação do DNA

Para verificar a quantidade de DNA presente em cada amostra, todas foram submentidas ao aparelho de quantificação (quantificador NanoVue Plus® da GE Healthcare, Bioscience/UK) do laboratório de Sanidade Animal da Agência Paulista de

Tecnologia dos Agronegócios – APTA, Bauru. Para tanto, calibrou-se o aparelho de quantificação utilizando-se 2µL de água ultrapura na cavidade indicada. Após a calibração, acrescentou-se 2µL de cada amostra de DNA extraído e adicionou-se a leitura para a obtenção dos resultados, ou seja, da quantidade de DNA de cada amostra. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda eletromagnética equivalente a 260nm, enquanto proteínas absorvem luz à 280nm. A estimativa da pureza de DNA na amostra foi verificada pela relação de absorbância $^{260}/_{280}$. Valores desta reação entre 1,8 a 2,0 são considerados ótimos para DNA. De acordo com Silveira et al. (2010) os valores acima de 1,8 podem indicar excesso de proteínas.

3.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) a partir de amostras de solo para *Toxoplasma gondii*

A PCR foi realizada nas seguintes condições: cada tubo de reação de 0,2mL recebeu tampão de PCR (50mM KCl, 20mM de Tris-HCl), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1U de Taq-polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen®), 0,2µM de cada *primer*, 1µL da amostra testada e 8,3µL de água ultrapura (MIX-PCR). Desta forma, cada tubo irá apresentar 11µL do MIX-PCR e 1µL do produto de extração do DNA. Foi realizada uma cPCR para amplificação do fragmento repetitivo de 529 pb, que consiste em 200-300 cópias no genoma de *T. gondii*, para garantir a qualidade de amplificação do DNA extraído, com a utilização dos *primers* TOX4 e TOX5, cujo perfil de ciclagem está de acordo com Homan et al. (2000), com modificações.

Os *primers* que foram utilizados e as condições de amplificação em termociclador Mastercycler Pro gradiente (Eppendorf®), estão descritos abaixo (Quadro 2):

Quadro 2. <i>Primers</i> utilizados e seus respectivos perfis de ciclagem.			
Amplificação	Primer	Ciclo	Referência
529 pb	TOX4: (5'-CGC TGC AGG GAG GAA GAC GAA AGT TG-3') TOX5: (5'-CGC TGC AGA CAC AGT GCA TCT GGA TT-3')	1x 94°C -7min; 35x (94°C -1min; 55°C -1min; 72°C -1min); 1x (72°C - 10min)	Homan et al., 2000

3.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2 µL de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo TBE 1X (0,1M Tris, 0,09M de ácido bórico e 0,001M de EDTA). A identificação dos produtos amplificados foi feita em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Syber Safe® (Invitrogen) 0,1µL/mL. A voltagem utilizada será de 100V por 80 minutos. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o LowRanger 100bp DNA Ladder (Norgen) e o tamanho dos fragmentos amplificados, foram comparados visualmente com os padrões de peso molecular das cepas padrão utilizadas como controles positivos com o uso de luz UV e a imagem capturada pelo sistema Major Science™, a qual foi documentada utilizando-se o software Vision Works LS.

3.3.6 Controles

Como controles positivos foram utilizadas cepas RH de *T. gondii*, cedida pelo Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ-UNESP-Botucatu, enquanto a água mili-Q estéril foi o controle negativo.

4. RESULTADOS

4.1 Local da coleta do material biológico

O Parque Zoológico Municipal de Bauru, localizado no interior do estado de São Paulo, situa-se nas coordenadas 22°20' de latitude sul e 49°01' de longitude oeste. Possui 20 alqueires de área, uma média de 210.000 visitantes por ano, mais de 880 animais e 227 espécies diferentes.

4.2 Tamanho amostral, procedência dos animais e colheitas de material biológico

Devido a imprevistos que não compete a pesquisa, o início das coletas apresentou um pequeno atraso por conta da divergência de horários para as devidas reuniões com os médicos veterinários do zoológico, a fim de se obter as autorizações para o início das coletas e anuência do diretor do Zoo, para que se pudesse definir as possíveis datas para o início das coletas. Portanto, após as devidas autorizações, as coletas iniciaram-se no início do mês de abril de 2019 e terminaram no final de abril de 2019, totalizando em oito dias de coletas e com 128 amostras de solo.

Foi necessário coletar amostras com mais de 5g por ponto, no caso da existência de pedras que alterassem a quantidade de amostra necessária. As coletas foram feitas no momento de limpeza dos recintos pelos tratadores, evitando alterar a rotina dos funcionários e animais. As Figuras 1, 2, 3 e 4 correspondem às coletas feitas. As amostras de solo foram identificadas em ordem numérica, representando o número do recinto e o ponto de coleta dentro do recinto. Tais anotações são importantes para identificação do exato local contaminado e estabelecimento de relações entre os dados obtidos.

Em uma caixa isotérmica, os tubos previamente identificados e colheres esterilizadas foram levados ao zoológico, separados em sacos de zip-lock para facilitar a identificação dos tubos de cada recinto. Com o auxílio do tratador responsável pelo setor, as amostras foram coletadas em seus respectivos tubos Falcon de 50mL, trocando de colher a cada ponto coletado dentro do recinto, evitando a contaminação das amostras e futura dificuldade de interpretação de dados.

Cada recinto recebeu um número de identificação, de 1 a 30. Os pontos de coleta dentro do recinto foram separados em quatro: 1– local próximo a água do animal; 2– local próximo a comida do animal; 3- local próximo às fezes do animal e 4- local de descanso dos animais (ou centro do recinto, em casos onde o animal não fica em contato com o solo como os macacos). Dessa forma, cada amostra foi identificada com um código composto por dois números: o primeiro, que indica o número do recinto e o segundo número, que indica o ponto de coleta dentro do recinto. Temos como exemplo a amostra número 2.3: o número dois corresponde ao recinto 2, pertencente ao Bugio Ruivo (*Alouatta fusca*); e o número três corresponde ao local próximo as fezes do Bugio.

Após a coleta, os tubos foram fechados e acondicionados em caixa isotérmica, mantidos em condições de refrigeração até a chegada ao laboratório e armazenados em freezer a -20°C até o momento do processamento para a realização das provas moleculares.



Figura 1. Em “A” coleta de área de estacionamento, próximo a uma área de construção e do estacionamento; “B” coleta do solo da praça de alimentação. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 2. Coleta realizada pelo tratador no recinto dos macacos neotropicais. Em “A” coleta do solo no recinto do Macaco Barrigudo; “B” coleta do solo no recinto do Bugio. Fonte: arquivo pessoal



Figura 3. Coleta realizada pelo tratador no recinto do Pavão verde. Fonte: arquivo pessoal



Figura 4. Coleta no recinto do canguru vermelho. Fonte: arquivo pessoal

4.3 Recuperação de oocistos

No laboratório, ao chegar da coleta, as amostras foram mantidas em freezer a -20°C . Para realização do processo de recuperação dos oocistos, foi realizado o preparo da solução fria de açúcar: em um Erlenmeyer com capacidade para 1000mL de solução foram adicionados 500g de Dextrose e 6,5g de cristais de fenol em uma capela de exaustão de gases, devido ao fato do ácido fenólico ser uma substância altamente tóxica; depois, foram adicionados 320mL de água deionizada. A solução foi agitada com o auxílio de um agitador magnético e em seguida, refrigerada a temperatura de 6°C .



Figura 5. Preparo da solução fria de açúcar em capela de exaustão de gases. Fonte: arquivo pessoal.

A recuperação de oocistos de *T. gondii* das amostras de solo foi realizada de acordo com o método de flotação de sacarose proposto por Ramirez et al. (2006) para *Cryptosporidium* (Figuras 6, 7 e 8) e utilizado para o diagnóstico molecular de *T. gondii* por Gotteland et al. (2014). Após a execução do método, as amostras foram conservadas em refrigerador até a realização da etapa de extração de DNA.



Figura 6. Execução do processo de recuperação de oocistos em laboratório. E etapa com amostras após adição de solução fria de açúcar. Fonte: arquivo pessoal



Figura 7. Execução do processo de recuperação de oocistos em laboratório. Em “A” amostras após primeira centrifugação e adição de água deionizada; em “B”, amostras após segunda centrifugação com formação do pellet. Fonte: arquivo pessoal



Figura 8. Execução do processo de recuperação de oocistos – amostra após primeira centrifugação, mostrando a separação entre o solo no substrato e a amostra sobrenadante. Fonte: arquivo pessoal

4.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em todas as 128 amostras. Os resultados de quantificação de DNA a partir de amostras de solo coletadas em oito recintos de primatas neotropicais podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Extração e quantificação de DNA a partir de amostras de solo coletadas em oito recintos de primatas neotropicais do Zoológico de Bauru. 2019. As duas amostras destacadas em vermelho foram positivas à PCR para *T. gondii*.

Amostra	Relação 260/280	Concentração de DNA
1.1	1,593	231,0
1.2	1,605	373,0
1.3	1,632	41,0
1.4	1,590	247,5
2.1	1,622	265,0
2.2	1,614	298,0

2.3	1,723	18,5
2.4	1,637	299,5
3.1	1,622	74,0
3.2	1,587	282,5
3.3	1,761	19,5
3.4	1,621	425,0
4.1	2,167	26,0
4.2	1,639	271,5
4.3	1,658	63,5
4.4	1,621	178,5
5.1	1,621	678
5.2	1,575	212,5
5.3	1,623	273,5
5.4	1,563	176,0
6.1	2,088	27,5
6.2	1,681	41,0
6.3	1,679	59,0
6.4	1,609	336,5
7.1	1,517	295,5
7.2	1,976	22,5
7.3	1,914	31,5
7.4	1,680	152,5
8.1	1,623	129,0
8.2	1,891	66,5
8.3	1,650	593
8.4	1,753	91,5
9.1	1,718	28,0
9.2	2,543	4,5
9.3	2,394	4,0
9.4	1,683	12,0

10.1	1,590	31,0
10.2	2,000	3,3
10.3	1,594	20,0
10.4	1,641	16,0
11.1	1,538	24,0
11.2	1,586	11,1
11.3	1,581	107,5
11.4	1,531	2,5
12.1	1,714	6,0
12.2	1,758	11,2
12.3	-5,500	1,1
12.4	2,342	4,5
13.1	1,688	19,5
13.2	1,652	54,5
13.3	1,632	55,5
13.4	1,633	138,0
14.1	1,597	53,5
14.2	1,715	23,5
14.3	1,561	44,5
14.4	1,680	8,2
15.1	1,659	19,0
15.2	1,621	20,5
15.3	1,534	16,0
15.4	1,634	67,0
16.1	1,492	13,4
16.2	1,604	38,5
16.3	1,613	85,5
16.4	1,588	40,5
17.1	1,686	43,0
17.2	1,614	190,5

17.3	1,619	25,5
17.4	1,600	20,0
18.1	1,370	9,2
18.2	1,667	100,0
18.3	1,664	104,0
18.4	1,524	96,0
19.1	1,641	221,5
19.2	1,647	198,5
19.3	1,685	45,5
19.4	1,656	231,0
20.1	1,613	110,5
20.2	1,620	40,5
20.3	1,633	255,5
20.4	1,537	146,0
21.1	1,105	2,1
21.2	1,195	4,9
21.3	860	2,2
21.4	1,397	84,5
22.1	1,597	107,0
22.2	1,541	75,5
22.3	1,604	903
22.4	1,623	92,5
23.1	1,641	351,0
23.2	1,533	149,5
23.3	1,602	94,5
23.4	1,543	190,5
24.1	1,671	6,6
24.2	1,658	65,5
24.3	1,719	12,6
24.4	1,679	22,0

25.1	1,657	11,4
25.2	1,778	4,8
25.3	2,040	2,6
25.4	1,629	18,0
26.1	1,705	8,9
26.2	2,172	3,2
26.3	1,898	5,6
26.4	1,957	4,5
27.1	1,684	12,0
27.2	2,170	3,3
27.3	1,594	20,0
27.4	1,714	5,7
28.1	1,585	11,2
28.2	1,688	19,5
28.3	1,492	13,4
28.4	1,534	16,0
29.1	1,680	8,3
29.2	1,715	9,0
29.3	1,718	27,0
29.4	1,535	24,5
30.1	1,681	40,0
30.2	1,636	55,5
30.3	1,590	32,5
30.4	1,562	44,0
31.1	1,629	19,0
31.2	1,679	22,5
31.3	1,620	34,6
31.4	1,719	12,4
32.1	1,654	17,0

32.1	1,685	14,5
32.3	1,540	27,5
32.4	1,715	10,1

A concentração de DNA da maioria das amostras se mostrou suficiente para a realização das provas moleculares. As amostras marcadas em vermelho são as positivas.

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) e Eletroforese

Foram realizadas em 128 amostras de solo a técnica de PCR utilizando-se os *primers* TOX4 e TOX5 segundo Homan et al. (2000), a fim de verificar a presença de DNA para o protozoário *Toxoplasma gondii*, conforme descrito no item 5.3.4.

Posteriormente, foi realizada a eletroforese tendo-se como resultado 126 amostras de solo negativas e duas amostras positivas para *Toxoplasma gondii*, como pode ser observado nas Figuras 9, 10 e 11.



Figura 9. Amostras de solo coletadas de oito recintos dos animais das espécies: *Ateles marginatus*, *Alouatta fusca*, *Ateles paniscus*, *Alouatta caraya*, *Alouatta belzebul*, *Lagothrix lagothricha*, *Leontopithecus rosalia*, *Leontopithecus chrysomelas*, alocados no Zoológico de Bauru. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb – Linha 1 (L1). Controle positivo – Linha 33 (33): *Toxoplasma gondii*. Controle negativo – Linha 34 (L34): água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 10. Amostras de solo coletadas de três recintos dos animais das espécies *Callicebus personatus*, *Saguinus fuscicollis* e *Saguinus labiatus*, alocados no Zoológico de Bauru. Todas as amostras foram negativas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Gel de agarose a 1,5% corado com Syber Safe. Marcador de peso molecular 100 pb – Linha 1. Controle positivo – Linha 14: *Toxoplasma gondii*. Controle negativo – Linha 15: água ultrapura. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 11. Amostras de solo coletadas de onze recintos dos animais das espécies *Pavo cristatus* (pavão de ombros negros), *Pavo cristatus* (pavão azul), *Pavo cristatus* (pavão arquelim), *Pavo cristatus alba*, *Pavo muticus*, *Threskiornis arthropicus*, *Coscoroba coscoroba*, *Syrigma subulatrix*, *Theristicus caudatus*, *Eudocimus ruber*, *Macropus rufus*, *Puma yagouaroundi*, *Puma concolor*, *Leopardus pardalis*, *Panthera tigris tigris*, *Panthera leo*, *Panthera onca*, *Papio hamadryas*, *Mandrillus sphinx*, *Erythrocebus pata*, *Papio papio*, Praça de alimentação e estacionamento, alocados no Zoológico de Bauru. A amostra localizada na linha 29, identificada por 27.4 e a amostra localizada na linha 38, identificada por 30.2, foram fracamente positivas ao teste com gene codificador de fragmento de 529 pb de *Toxoplasma gondii*. Todas as outras amostras foram negativas ao teste. Gel de agarose a 1,5% corado com Syber

Os resultados demonstraram que as amostras 27.4 e 30.2 de solo procedentes, respectivamente, dos recintos das espécies de macacos africanos: *Papio papio* (Babuíno comum) e *Papio hamadryas* (Babuíno Sagrado), foram fracamente positivos à PCR para *T. gondii*, como mostra a Figura 11. A amostra 27.4 corresponde ao centro do recinto do Babuíno Comum e a amostra 30.2 corresponde ao local próximo à comida do Babuíno Sagrado. As amostras procedentes dos outros recintos foram todas negativas à PCR para *T. gondii*.

5. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma zoonose amplamente disseminada, inclusive na fauna selvagem, nas formas de vida livre e em cativeiro (DUBEY, 2012; MINERVINO, 2010; PENA, 2011). Diversos estudos demonstraram que animais em cativeiro possuem uma alta soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* (ATTADEMO, 2016; CANFRANCO, 2013; CANO-TERRIZA, 2019; MIVERNINO, 2017; SILVA, 2001a; SILVA, 2001b).

Porém, poucos estudos com amostras de solo de recintos de animais de zoológicos foram realizados até o momento. Isso pode ocorrer devido ao fato de o estudo molecular com amostras de solo ainda não ser bem desenvolvido e haver uma falta de trabalhos científicos com a elaboração de protocolos para processamento molecular deste tipo de amostra. Por ser um tipo de amostra que está exposta ao ambiente externo, pode haver a influência de diversos inibidores presentes no solo, o que torna a análise dessas amostras um desafio a ser superado pela comunidade científica.

O solo contaminado com oocistos esporulados de *T. gondii* é um fator de risco para os animais locados em zoológicos. Não há informação sobre a procedência da areia colocada nos recintos dos animais, que poderia já estar contaminada antes do contato com o ambiente do zoológico, porém há a informação de que a areia utilizada nos recintos não era autoclavada, o que pode facilitar a contaminação e a disseminação da infecção. Destacamos que em 2013, ocorreram casos de toxoplasmose no Parque Zoológico Municipal de Bauru - SP, causando o óbito de algumas espécies animais, destacando-se os primatas não humanos africanos e

pinguins, os quais apresentaram cistos de *T. gondii* em tecido cerebral enviado a exame patológico, realizado no Laboratório de Patologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Araçatuba-SP.

As amostras positivas foram procedentes dos recintos dos Macacos Africanos das espécies de Babuíno Comum (*Papio papio*) e Babuíno Sagrado (*Papio hamadryas*). A frente dos recintos é composta por um vidro, as laterais são compostas de paredes de concreto e a parte superior do recinto é fechada com uma grade. Um tecido para fazer sombra foi colocado na área superior na frente dos recintos. Os recintos podem ser observados nas Figuras 12, 13, 14 e 15.



Figura 12. Recintos dos Macacos Africanos locados no Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP.

Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 13. Recinto da espécie *Papio hamadryas* (Babuino Sagrado) locado no Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP. Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 14. Recinto da espécie *Papio papio* (Babuino Comum) locado no Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP. Fonte: Arquivo Pessoal



Figura 15. Recintos dos Macacos Africanos locados no Parque Zoológico Municipal de Bauru – SP.

Fonte: Arquivo Pessoal

A amostra 30.2 corresponde ao local próximo a comida da espécie *Papio hamadryas* (Babuíno Sagrado). A alimentação desses animais era composta de frutas e verduras, bem como ração, a qual era armazenada a granel, além do fornecimento de carne crua. Nesse caso, existe a possibilidade de os alimentos estarem contaminados com oocistos esporulados – como visto por Marchioro et al. (2016), que encontrou contaminação por *T. gondii* em amostras de alface lisa, alface crespa, chicória, rúcula e salsa – e assim, contaminarem o solo, já que os vegetais consumidos pelos primatas eram jogados no chão do recinto.

A amostra 27.4 corresponde ao centro do recinto da espécie *Papio papio* (Babuíno Comum). Nesse caso, os vários modos de transmissão do agente, seja pela água contaminada por oocistos esporulados, seja pelos próprios animais do zoo ou por gatos ferais que adentram e circulam pelo parque, ou até mesmo pela oferta de verduras e frutas que pudessem conter oocistos esporulados, possibilitariam a contaminação do solo desse recinto.

O abastecimento de água é proveniente de água canalizada pelo sistema de abastecimento de água e esgoto da cidade de Bauru – SP, o que diminui o risco da contaminação via água, já que para estar contaminada, a água deveria necessariamente estar em contato com felídeos que estivessem liberando oocistos.

Outro fator de risco para os primatas seria a presença de gatos domésticos ferais, que poderiam ter acesso aos recintos e contaminar o solo através da eliminação de oocistos pelas fezes (CAMPS et al., 2008); porém esta possibilidade é remota, devido a estrutura do recinto, que torna o acesso de gatos domésticos muito dificultosa.

Dessa forma, a areia do recinto da espécie *Papio papio* (Babuíno Comum) estava possivelmente contaminada previamente, como ocorreu no caso dos pinguins em 2013, tendo em vista não haver qualquer tratamento da areia colocada nos recintos destes animais, como esterilização em autoclave, o que seria indicado.

Assim, deve-se também atentar para uma maior preocupação com a higienização de alimentos oferecidos aos animais, como uma lavagem adequada dos vegetais oferecidos, assim como verificado em trabalho relatado por Pinto-Ferreira et al. (2019), em que se verificou a contaminação de hortaliças oferecidas para consumo humano em um restaurante universitário e o surgimento de casos agudos de toxoplasmose. Ainda, como prevenção para esta zoonose, a possibilidade de se implantar uma forma de tratamento térmico ou químico para a areia utilizada nos recintos, a fim de se destruir prováveis oocistos esporulados nesta areia.

Portanto, sugere-se realizar o planejamento de projetos para a prevenção de futuros problemas com outros animais e funcionários do Parque Zoológico Municipal de Bauru - SP, bem como promover atividades de educação em saúde, sobre as principais doenças zoonóticas em ambiente do zoológico, direcionado aos trabalhadores que realizam o manejo da alimentação e dos animais, para que se possa prevenir o risco da toxoplasmose, bem como de outras doenças zoonóticas.

6. CONCLUSÃO

A detecção de amostras positivas indica contaminação do solo dos recintos dos macacos africanos por oocistos esporulados de *T. gondii*, os quais podem ser procedentes a partir da água contaminada durante a lavagem dos alimentos oferecidos aos animais e/ou contato dos alimentos com o solo contaminado a partir de fezes de gatos domésticos. Os resultados revelam a necessidade de um monitoramento sorológico para toxoplasmose nos animais do Zoo, em especial nos primatas não humanos, o cuidado na lavagem e manipulação dos alimentos oferecidos aos animais, bem como a utilização de areia autoclavada nos recintos. A realização de atividades de educação em saúde direcionadas à equipe do Zoo, com orientação sobre as principais doenças zoonóticas, seria recomendado.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; SILVA, K. F.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, S. T. Z.; BORTOLLI, C. P.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI, S. M.; ALEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *Journal of Parasitology*, v. 96, n. 5, p. 1007-1009, 2010.
- ATTADEMO, F. L. N.; RIBEIRO, V. O.; SOARES, H. S.; LUNA, F. O.; SOUSA, G. P.; FREIRE, A. C. B.; GENNARI, S. M.; ALVES, L. C.; MARVULO, M. F. V.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive antillean manatee (*Trichechus manatus*) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 47, n. 2, p. 423-426, 2016.
- BARROS, M.; CABEZÓN, O.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S.; RIBAS, M. P.; ESCOBAR, L. E.; RAMOS, B.; VOGEL-MEDINA, G. *Toxoplasma gondii* infection in wild mustelids and cats across an urban-rural gradient. *PLoS ONE*, n. 13, v. 6, 2018.
- BARTOVÁ, E.; LUKASOVÁ, R.; VODICKA, R.; VÁHALA, J.; PAVLACIK, L.; BUDIKOVÁ, M.; SEDLAK, K. Epizootological study on *Toxoplasma gondii* in zoo animals in the Czech Republic. *Acta Tropica*, 2018.
- BEZERRA, R. A.; GINÉ, G. A. F.; MACIEL, B. M.; GAIOTTO, F. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Identification and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in free-ranging bristle-spined porcupine (*Chaetomys subspinosus*), a threatened arboreal mammal from the Brazilian Atlantic Forest. *Parasites & Vectors*, v. 8, n. 277, 2015.
- BEZERRA, M. J. G.; KIM, P. C. P.; MORAES, É. P. B. X.; SÁ, S. G.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; SILVA, J. G.; ALVES, B. H. L. S.; MOTA, R. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of naturally infected goats in the Northeast of Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013.
- BRAGA, C. F.; SILVA, A. V.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. Infecção toxoplásmica causa hipertrofia da parede do cólon de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 63, n. 2, p. 340-347, 2011.
- CABRAL, A. D.; D'AURIA, S. R. N.; CAMARGO, M. C. G. O.; ROSA, A. R.; SODRÉ, M. M.; GALVÃO-DIAS, M. A.; JORDÃO, L. R.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. J. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in bats from São Paulo city, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 206, p. 293-296, 2014.
- CAMPS, S.; DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J. A. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in Zoo Animals in Selected Zoos in the Midwestern United States. *J. Parasitol.*, v. 94, n. 3, p. 648-653, 2008.
- CANO-TERRIZA, D.; ARMERÍA, S.; CABALLERO-GÓMEZ, J.; DÍAZ-CAO, J. M.; JIMÉNEZ-RUIZ, S.; DUBEY, J. P.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive nonhuman primates in zoos in Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 65, p. 54-57, 2019.

CAÑON-FRANCO, W. A.; ARAÚJO, F. A. P.; LÓPEZ-OROZCO, N.; JARDIM, M. M. A.; KEID, L. B.; DALLA-ROSA, C.; CABRAL, A. D.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild small felids from Brazil: Molecular detection and genotypic characterization. *Veterinary Parasitology*, v. 197, p. 462-469, 2013.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma gondii* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, p. 83-89, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Parasites - Toxoplasmosis. 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/index.html>>. Acesso em 03 ago. 2021.

CHEN, R.; LIN, X.; HU, L.; CHEN, X.; TANG, Y.; ZHANG, J.; CHEN, M.; WANG, S.; HUANG, C. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Zoo Wildlife and pet birds in Fujian, China. *Iran J Parasitol*, v. 10, n. 4, p. 663-668, 2015.

COMMODARO, A. G.; CHIASSON, M.; SUNDAR, N.; RIZZO, L. V.; BELFORT, R. J.; GRIGG, M. E. Elevated *Toxoplasma gondii* infection rates for retinas from eye banks, Southern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 4, 2015.

COSTA, D. G. C.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. S. A.; SANTANA, S. C.; MAGALHÃES, F. J. R.; LIMA FILHO, C. D. F.; RIBEIRO, V. O.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; DUBEY, J. P.; SILVA, J. C. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from the Fernando de Noronha, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 98, n. 3, p. 679-680, 2012.

DOS SANTOS, T. R.; NUNES, C. M.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MOURA, A. B.; LOPES, W. D. Z.; COSTA, A. J.; BRESCIANI, K. D. S. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples from public schools. *Veterinary Parasitology*, v. 171, p. 53-57, 2010.

DU, F.; FENG, H. L.; NIE, H.; TU, P.; ZHANG, Q. L.; HU, M.; ZHOU, Y. Q.; ZHAO, J. L. Survey on the contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in the soil of public parks of Wuhan, China. *Veterinary Parasitology*, v. 184, p. 141-146, 2012.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of animals and humans. 2 ed. Maryland: CRC 374 Press, 2010. 313 p.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONE, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, v. 10, p. 1-50, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; NESS, S. L.; KWOK, O. C. H.; CHOUDHARY, S.; MITTEL, L. D.; DIVERS, T. J. Seropositivity of *Toxoplasma gondii* in domestic donkeys (*Equus asinus*) and isolation of *T. gondii* from farm cats. *Veterinary Parasitology*, v. 199, p. 18-23, 2014.

FELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 4, p. 190-196, 2010.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

FERNANDES, E. F. T. S.; FERNANDES, M. F. T. S.; KIM, P. C. P.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; DE SOUZA NETO, O. L.; SANTOS, A. S.; DE MORAES, É. P. B. X.; DE MORAIS, E. G. F.; MOTA, R. A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 98, n. 3, p. 690-691, 2012.

FERREIRA, A. I. C.; BRANDÃO DE MATTOS, C. C.; FREDERICO, F. B.; MEIRA, C. S.; ALMEIDA JR, G. C.; NAKASHIMA, F.; BERNARDO, C. R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; DE MATTOS, L. C. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol. Infect.*, v. 142, p. 142-148, 2014.

FERREIRA, É. C.; MARCHIORO, A. A.; GUEDES, T. A.; MOTA, D. C. G. A.; GUILHERME, A. L. F.; DE ARAÚJO, S. M. Association between seropositivity for *Toxoplasma gondii*, scholastic development of children and risk factors for *T. gondii* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 107, p. 390-396, 2013.

FLEGR, J.; PRANDOTA, J.; SOVICKOVÁ, M.; ISRAILI, Z. H. Toxoplasmosis – A global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 2014.

FOURNIER, G. F. S. R.; LOPES, M. G.; MARCILI, A.; RAMIREZ, D. G.; ACOSTA, I. C. L.; FERREIRA, J. I. G. S.; CABRAL, A. D.; DE LIMA, J. T. R.; PENA, H. F. J.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from forest fragments of the municipality of Natal, northeastern Brazil. *Braz. J. parasitol.*, v. 23, n. 4, p. 501-508, 2014.

GENNARI, S. M.; ESMERINI, P. O.; LOPES, M. G.; SOARES, H. S.; VITALIANO, S. N.; CABRAL, A. D.; PENA, H. F. J.; HORTA, M. C.; CAVALCANTE, P. H.; FORTES, K. P.; VILLALOBOS, E. M. C. Occurrences of antibodies to *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules and horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2015.

GOMEZ-RIOS, A.; ORTEGA-PACHECO, A.; GUTIERREZ-BLANCO, E.; ACOSTA-VIANA, K. Y.; GUZMAN-MARIN, E.; GUIRIS-ANDRADE, M. D.; HERNANDEZ-CORTAZAR, I. B.; LÓPEZ-ALONSO, R.; CRUZ-ÁLDAN, E.; JIMÉNEZ-COELLO, M. *Toxoplasma gondii* in captive wild felids of Mexico: its frequency and capability to eliminate oocysts. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 2019.

GOTTELAND, C.; CHAVAL, Y.; VILLENA, I.; GALAN, M.; GEERS, R.; AUBERT, D.; POULLE, M. L.; CHARBONNEL, N.; GILOT-FROMONT, E. Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology*, v. 141, p. 259-268, 2013.

GOTTELAND, C.; GILOT-FROMONT, E.; AUBERT, D.; POULLE, M-L.; DUPUIS, E.; DARDÉ, M-L.; FORIN-WIART, M-A.; RABILLOUD, M.; RICHE, B.; VILLENA, I. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in a rural area: influence of cats and land use. *Veterinary Parasitology*, 2014.

GUO, M.; DUBEY, J. P.; HILL, D.; BUCHANAN, R. L.; GAMBLE, H. R.; JONES, J. L.; PRADHAN, A. K. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *Journal of Food Protection*, v. 78, n. 2, p. 457-476, 2015.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International Journal for Parasitology*, v. 20, p. 69-75, 2000.

KAWAZOE, U.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii* In: NEVES, D. P. et al. *Parasitologia Humana*, Atheneu, 2012. p. 177-187.

KIM, K. The Epigenome, Cell Cycle and Development in *Toxoplasma*. *Annual Review of Microbiology*. Florida: 2018.

KORNACKA, A.; CYBULSKA, A.; BIÉ, J.; GOZDZIK, K.; MOSKWA, B. The usefulness of direct agglutination test, enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in wild animals. *Veterinary Parasitology*, v. 228, p. 85-89, 2016.

LÉLU, M.; GILOT-FROMONT, E.; AUBERT, D.; RICHAUME, A.; AFONSO, E.; DUPUIS, E.; GOTTELAND, C.; MARNEF, F.; POULLE, M. L.; DUMÈTRE, A.; THULLIEZ, P.; DARDÉ, M. L.; VILLENA, I. Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Veterinary Parasitology*, v. 183, p. 59-67, 2011.

LI, M.; MO, X-W.; WANG, L.; CHEN, H.; LUO, Q-L.; WEN, H-Q.; ZHANG, A-M.; DU, J.; LU, F-L.; LUN, Z-R.; SHEN, J-L. Phylogeny and virulence divergency analyses of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 133, 2014.

LU, J.; ZHOU, D. H.; CHEN, J.; ZHANG, N. Z.; WANG, R. A.; WNEG, Y. B.; ZHU, X. Q. Characterization of the *Toxoplasma gondii* hsp60 gene sequences from different hosts and geographical locations. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 3, p. 6906-6911, 2014.

MAI, K.; SHARMAN, P. A.; WALKER, R. A.; KATRIB, M.; SOUZA, D.; MCCONVILLE, M. J.; WALLACH, M. G.; BELLI, S. I.; FERGURSON, D. J. P.; SMITH, N. C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*: Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 281-289, 2009.

MARCHIORO, A. A.; TIYO, B. T.; COLLI, C. M.; SOUZA, C. Z.; GARCIA, J. L.; GOMES, M. L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. First detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the fresh leafs of vegetables in South America. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v. 16, n. 9, 2016.

- MARTINEZ, V. O.; LIMA, F. W. M.; CARVALHO, C. F.; MENEZES-FILHO, J. A. *Toxoplasma gondii* infection and behavioral outcomes in humans: a systematic review. *Parasitology Research*, 2018.
- MELO, R. P. B.; ALMEIDA, J. C.; LIMA, D. C. V.; PEDROSA, C. M.; MAGALHÃES, F. J. R.; ALCÂNTRA, A. M.; BARROS, L. D.; VIEIRA, R. F. C.; GARCIA, J. L.; MOTA, R. A. Atypical *Toxoplasma gondii* genotype in feral cats from the Fernando de Noronha Island, northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2016.
- MINERVINO, A. H. H.; CASSINELLI, A. B. M.; SOUZA, A. J. S.; ALVES, M. M.; SOARES, M. C. P.; FERREIRA, D. A. C.; PEREIRA, W. L. A.; GENNARI, S. M. Detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in captive non-human primates in the Amazon region, Brazil. *J Med Primatol*, 2017.
- MINERVINO, A. H. H.; SOARES, H. S.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; NEVES, K. A. L.; PENA, H. F. J.; ORTOLANI, E. L.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Captive Wild Mammals and Birds in Brazil. *Journal of zoo and Wildlife Medicine*, v. 41, n. 3, p. 572-574, 2010.
- MORIKAWA, V. M.; ZIMPEL, C. K.; PAPLOSKI, I. A. D.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; ROMALDINI, A. H. C. N.; OKUDA, L. H.; BIONDO, A. W.; DE BARROS FILHO, I. R. Occurrences of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in Barbary sheep at Curitiba zoo, Southern Brazil. *Braz. J. parasitol.*, v. 23, n. 2, p. 255-259, 2014.
- MUÑOZ-ZANZI, C. A.; FRY, P.; LESINA, B.; HILL, D. *Toxoplasma gondii* oocyst – specific antibodies and source of infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 10, p. 1591-1593, 2010.
- MURADIAN, V.; FERREIRA, L. R.; LOPES, E. G.; ESMERINI, P. O.; PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M. A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 98, n. 1, p. 128-134, 2012.
- NING, H. R.; SI-YANG, H.; WANG, J. L.; XU, Q. M.; ZHU, X. Q. Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* Strains from Different Hosts and Geographical Regions by Sequence Analysis of GRA20 Gene. *Korean J Parasitol*, v. 53, n. 3, p. 345-348, 2015.
- PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P. SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2nd Edition. *Conservation International: Occasional Papers in Conservation Biology*, n. 6, 2012.
- PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 1385–94, 2009.

PENA, H. J. F.; MARVULO, M. F. V.; HORTA, M. C.; SILVA, M. A.; SILVA, J. C. R.; SIQUEIRA, D. B.; LIMA, P.-A. C. P.; VITALIANO, S. N.; GENNARI, S. M. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from a red-headed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 175, p. 377-381, 2011.

PENA, H. F. J.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Research in Veterinary Science*, v. 81, p. 58-67, 2006.

PINTO-FERREIRA, F.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; MONICA, T. C.; MARTINS, F. D. C.; DE MATOS, R. L. N.; MAREZE, M.; NINO, B. D. L.; NARCISO, S. G.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T. Investigation and environmental analysis of samples from outbreak of toxoplasmosis at Research institution in Londrina, Paraná, Brazil, 2016. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 2019.

RAMIREZ, N. E.; SREEVATSAN, S. Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Veterinary Parasitology*, v. 163, p. 201-213, 2006.

RIVETTI Jr, A. V.; CAXITO, F. A.; RESENDE, M.; LOBATO, Z. I. P. Avaliação sorológica para *Toxoplasma gondii* pela imunofluorescência indireta e detecção do vírus da imunodeficiência felina pela nested PCR em felinos selvagens. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 60, n. 5, p. 1281-1283, 2008.

ROBERT-GAGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, p. 264-296, 2012.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 44, p. 805-8014, 2012.

SCHLÜTER, D.; DÄUBENER, W.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U.; LÜDER, C. Animals are key to human toxoplasmosis. *International Journal of Medical Microbiology*: Germany, 2014.

SILVA, A. L.; ANDRADE, O. R.; CARNEIRO, V. A. C. A.; VITOR, A. W. R. Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. *PLOS ONE*, v. 9, n. 2, 2014.

SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; ADANIA, C. H.; FERREIRA NETO, J. S. Risk factors associated with sero-positivity to *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 78, p. 286-295, 2007.

SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C. H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; FERREIRA-NETO, J. S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 102, p. 217-224, 2001a.

SILVA, J. C. R.; OGASSAWARA, S.; MARVULO, M. F. V.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* antibodies in exotic wild felids from brazilian zoos. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 32, n. 3, p. 349-351, 2001b.

SILVA, M. A.; PENA, H. F. J.; SOARES, H. S.; AIZAWA, J.; OLIVEIRA, S.; ALVES, B. F.; SOUZA, D. S.; MELO, R. P. B.; GENNARI, S. M.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from free-ranging and captive birds and mammals in Pernambuco state, Brazil. *Braz J Vet Parasitol*, 2018.

ULLMAN, L. S.; DA SILVA, R. C.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; DOS SANTOS, L. C.; HOFFMANN, J. L.; MOREIRA, N.; GUIMARAES, A. M. S.; MONTAÑO, P.; LANGONI, H.; BIONDO, A. W. Serological survey of *Toxoplasma gondii* in captive Neotropical felids from Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 172, p. 144-146, 2010.

VITALIANO, S. N.; SOARES, H. S.; PENA, H. F. J.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from Southeast Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 45, n. 1, p. 197-199, 2014.

WANG, M.; MENG, P.; YE, Q.; PU, Y. H.; YANG, X. Y.; LUO, J. X.; ZHANG, N. Z.; ZHANG, D. L. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil in Northwestern China using a new semi-nested PCR assay. *BMC Veterinary Research*, n. 10, v. 238, 2014.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nature Reviews: Immunology*, v. 14, p. 109-121, 2014.