

Investigação parasitológica e molecular de *Toxoplasma gondii* em urina e saliva de felinos (*Felis catus*) infectados experimentalmente

Parasitological and molecular investigation of *Toxoplasma gondii* in urine and saliva of experimentally infected cats (*Felis catus*)

Investigación parasitológica y molecular de *Toxoplasma gondii* en orina y saliva de gatos (*Felis catus*) infectados experimentalmente

Recebido: 31/05/2020 | Revisado: 03/06/2020 | Aceito: 04/06/2020 | Publicado: 16/06/2020

Weslen Fabricio Pires Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5122-5512>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: weslenteixeira@hotmail.com

Maria Eduarda Gonçalves Tozato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7436-4742>

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Brasil

E-mail: m.eduardatozato@gmail.com

Giovana Pavão Vital

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4474-2255>

Universidade Estadual Paulista (Unesp),

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Brasil

E-mail: giovana.pavao@yahoo.com.br

Welber Daniel Zanetti Lopes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8009-8436>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: wdzlopes@hotmail.com

Samea Fernandes Joaquim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5663-9538>

Universidade Estadual Paulista (Unesp),

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Brasil

E-mail: sameajoaquin@gmail.com

Amanda Leal de Vasconcellos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7504-0440>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: amanda-vet@hotmail.com

Flávia Carolina Fávero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8109-3963>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: flaviafaverovet@zootecnista.com.br

Lívia Mendonça Pascoal

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4900-5334>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: liviapascoal@ufg.br

Gustavo Felippelli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4665-2253>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: gusvetfelippelli@gmail.com

Helio Langoni

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5127-0762>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: helio.langoni@unesp.br

Kátia Denise Saraiva Bresciani

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8767-8855>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: bresciani@fmva.unesp.br

Alvimar José da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1581-8927>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: cpar@asbyte.com.br

Resumo

O objetivo do estudo foi investigar a presença de *Toxoplasma gondii* em amostras de urina e saliva colhidas de felinos experimentalmente infectados, fato inédito na literatura consultada. Seis felinos machos, sorologicamente negativos (IgG) para *T. gondii*, foram distribuídos em dois grupos, sendo quatro inoculados com 2×10^5 taquizoítos (Cepa RH) via subcutânea (GI), e dois mantidos como controle (GII). Anteriormente à inoculação (dias -7 e 0) e no 7º, 14º, 21º, 28º, 42º, 56º e 70º dia pós-inoculação (DPI), os felinos foram anestesiados com tiletamina +

zolazepam (na dose de 15 mg/kg, via intramuscular), sendo colhidas amostras de urina, saliva e sangue. Nas amostras sanguíneas obtidas após a inoculação, pesquisou-se a presença de anticorpos anti-*T. gondii* (IgG) pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). A parasitemia pelo *T. gondii* foi avaliada por meio de inoculações intraperitoneais em camundongos albinos (bioensaio). A pesquisa do *T. gondii* nas amostras de urina e saliva foram realizadas pelas técnicas de nested PCR e bioensaio em camundongos. Todos os felinos inoculados com *T. gondii* (GI) soroconverteram à infecção toxoplásmica, diferentemente dos felinos do não inoculados (GII), que permaneceram negativos durante todo estudo. Diagnosticou-se parasitemia pelo *T. gondii* em todos felinos do grupo I, totalizando cinco eventos entre o 7° e 42° DPI. Em nenhuma amostra de urina e saliva dos felinos GI e GII, diagnosticou-se a presença de *T. gondii*. Observou-se que felinos infectados experimentalmente com taquizoítos da cepa RH (isolado I) de *T. gondii*, podem não eliminar formas infectantes do parasito pela urina e saliva.

Palavras chave: Gatos; Imunofluorescência; Protozoário; Toxoplasmose.

Abstract

The present study aimed to investigate the presence of *Toxoplasma gondii* in urine and saliva samples collected from experimentally infected cats, an unprecedented fact in consulted literature. Six felines, males, serologically negative (IgG) for *T. gondii* were selected and divided into two experimental groups. Four cats were inoculated with 2×10^5 tachyzoites (RH strain) (Group I), and two cats were kept as control group (Group II). Before inoculation (days -7 and 0) and on the 7th, 14th, 21th, 28th, 42th, 56th and 70th post inoculation days (PID), all animals were anesthetized with tiletamine hydrochloride and zolazepam (dosage of 15 mg/Kg) for sampling of urine, saliva and blood. Detection of serological titers was performed by indirect immunofluorescence (IIF) and the detection of the protozoan in the bloodstream of cats (parasitemia) was performed by mouse bioassay. The detection of *T. gondii* in urine and saliva samples was performed using nested PCR and mouse bioassay. All cats inoculated with *T. gondii* (GI) seroconverted, different from felines of the GII (control), which remained negative throughout the study. *T. gondii* parasitemia was diagnosed in all cats in group I, totaling five events between the 7th and 42nd PID. It was not possible to detect *T. gondii* in urine and saliva from infected and control group with nested PCR or mouse bioassay. It was observed that felines experimentally infected with tachyzoites of the strain RH (isolate I) of *T. gondii*, may not eliminate infectious forms of the parasite through urine and saliva.

Keywords: Cats; Immunofluorescence; Protozoan; Toxoplasmosis.

Resumen

El objetivo del estudio fue investigar la presencia de *Toxoplasma gondii* en muestras de orina y saliva tomadas de gatos infectados experimentalmente, un hecho sin precedentes en la literatura consultada. Se distribuyeron seis felinos machos serológicamente negativos (IgG) para *T. gondii* en dos grupos, cuatro fueron inoculados con 2×10^5 taquizoitos (Cepa RH) por vía subcutánea (GI), y dos se mantuvieron como controles (GII). Antes de la inoculación (días -7 y 0) y en el 7°, 14°, 21°, 28°, 42°, 56° y 70° día posterior a la inoculación (DPI), los gatos fueron anestesiados con tiletamina + zolazepam (a una dosis de 15 mg / kg, por vía intramuscular), y se recogieron muestras de orina, saliva y sangre. En las muestras de sangre obtenidas después de la inoculación, se investigó la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* (IgG) por la reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI). La parasitemia de *T. gondii* se evaluó mediante inoculaciones intraperitoneales en ratones albinos (bioensayo). La búsqueda de *T. gondii* en muestras de orina y saliva se realizó mediante PCR anidada y bioensayo en ratones. Se encontró que todos los gatos inoculados con *T. gondii* (GI) seroconvirtieron a infección toxoplásmica, a diferencia de los gatos no inoculados (GII), que permanecieron negativos durante todo el estudio. Se diagnosticó parasitemia por *T. gondii* en todos los gatos del grupo I, totalizando cinco eventos entre el 7 ° y 42 ° DPI. En ninguna muestra de orina y saliva de los felinos GI y GII, se diagnosticó la presencia de *T. gondii*. Se observó que los felinos infectados experimentalmente con taquizoitos de la cepa RH (aislado I) de *T. gondii*, pueden no eliminar las formas infecciosas del parásito a través de la orina y la saliva.

Palabras claves: Gatos; Inmunofluorescencia; Protozoos; Toxoplasmosis.

1. Introdução

A presença dos felinos no ambiente urbano é extremamente relevante para a epidemiologia da toxoplasmose humana e animal. Uma vez que esses animais são os únicos hospedeiros definitivos do *Toxoplasma gondii* presentes neste ambiente, consequentemente realizam a gametogonia levando a produção e excreção de oocistos em suas fezes (Dubey, 2017), proporcionando assim a manutenção do ciclo urbano deste parasito (Wilking et al., 2016).

As três formas evolutivas do *T. gondii* são: os oocistos, os bradizoítos e os taquizoítos. Os dois primeiros desempenham um importante papel na disseminação desta protozoonose por meio de infecções por via oral de hospedeiros intermediários e definitivos. Já os taquizoítos são formas infectantes que se multiplicam rapidamente nos hospedeiros, parasitando qualquer célula e tecido, sendo também encontrados em líquidos orgânicos. Sua presença geralmente é observada na fase aguda da infecção, sendo responsáveis pela transmissão vertical durante a gestação, representando assim, um grave problema em Saúde Pública (Dubey, 2010).

A presença de formas infectantes do *T. gondii* em fluídos corporais como: sangue (Abreu et al., 2001), leite (Vitor et al., 1991; Bresciani et al., 2001) e sêmen (Lopes et al., 2009; Santana et al., 2010) já foram descritas em diferentes espécies animais.

O *T. gondii* foi também isolado em amostras de saliva (Vitor et al., 1991; Bresciani et al., 2001) e urina (Vitor et al., 1991; Rocha et al., 1993; Abreu et al., 2001; Bresciani et al., 2001) de inúmeras espécies, porém não existem relatos da pesquisa do parasito em amostras de urina e saliva obtidas de felinos infectados.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi pesquisar a presença de formas infectantes do *T. gondii* em amostras de urina e saliva colhidas de gatos primoinfectados com a cepa RH (isolado tipo I), fato inédito na literatura consultada.

2. Material e Métodos

A realização deste estudo foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ FCAV/ UNESP, Campus Jaboticabal, SP, sob protocolo nº. 024137/13.

2.1. Obtenção dos taquizoítos de *T. gondii* e padronização dos inócuos

Foi utilizada a cepa “RH” (isolado tipo I), mantida no CPPAR-Centro de Pesquisas em Sanidade Animal, pertencente à FCAV/UNESP - Campus de Jaboticabal, SP, Brasil.

Para a obtenção do inóculo de *T. gondii*, foram utilizados dez camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) que receberam, via intraperitoneal, taquizoítos de *T. gondii* da referida cepa. Decorridos dois dias da inoculação, os camundongos foram eutanasiados e os taquizoítos foram obtidos por meio de lavados intraperitoneais realizados com 1,0 mL de solução fisiológica estéril e posterior aspiração do exsudato. Este conteúdo foi submetido a

três lavagens por centrifugação com solução fisiológica, sendo após avaliada sua concentração por meio de microscopia óptica (objetiva de 40X) (Costa, 1979).

Dos dez camundongos inoculados para produção dos taquizoítos, apenas quatro apresentaram uma solução de taquizoítos isenta de células inflamatórias em seus lavados peritoneais, sendo extraída uma solução de 7,8 mL (taquizoítos/exsudato peritoneal/solução fisiológica), contendo 1.177.500 taquizoítos por mL. Os inócuos foram padronizados com taquizoítos extraídos no dia da inoculação dos felinos. A padronização foi realizada por meio de quantificação dos taquizoítos em câmara de Neubauer sendo o número de parasitos ajustados com solução fisiológica.

Cada felino do grupo I foi inoculado, por via subcutânea, com 169,85 µL (adicionados a 500 µL de solução fisiológica), totalizando 200.000 (2×10^5) taquizoítos por inóculo.

2.2. CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E INOCULAÇÃO DOS FELINOS

Foram utilizados (SRD), com idade entre um a quatro anos, dóceis e saudáveis, provenientes do município de Jaboticabal, SP. Todos os felinos selecionados foram submetidos à pesquisa de anticorpos (IgG) anti-*T. gondii* em triplicata por meio da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Camargo, 1964), sendo selecionados apenas os animais sorologicamente negativos (título IgG < 16). Além disso, os felinos selecionados foram submetidos a avaliações clínicas, sendo apenas animais saudáveis incluídos no estudo.

Durante todo período experimental, os animais selecionados foram mantidos individualmente em gaiolas metálicas numeradas, providas de comedouro, bebedouro, plataforma para descanso e brinquedos. Antes da inoculação esses animais passaram por um período de aclimação (30 dias) às condições de alojamento, nutrição (ração comercial e água potável fornecidas “*ad libitum*”) e manejo propostos neste estudo, sendo previamente vacinados contra raiva, clamidiose, rinotraqueíte, panleucopenia e calicivirose e desverminados com praziquantel (20m/kg) e pamoato de pirantel (230mg/kg).

Após o período de aclimação, os felinos foram distribuídos, por sorteio, em dois grupos experimentais (GI e GII). No dia “zero” (D0) os animais pertencentes ao GI (felinos TG1, TG2, TG3 e TG4), foram inoculados, via subcutânea (região dorsal) com 2×10^5 taquizoítos de *T. gondii* (cepa “RH” isolado tipo I), utilizando-se uma seringa de 1mL e

agulha (0,80mm x 30mm 21G), após prévia desinfecção local com álcool iodado (0,1%). Nos felinos pertencentes ao GII (C1 e C2) foi administrada solução fisiológica (placebo) nas mesmas condições utilizadas para inoculação do GI.

2.3. Observações clínicas

Durante todo período experimental, os felinos foram submetidos diariamente a observações gerais de saúde, visando detectar possíveis alterações nos sistemas digestivo, nervoso, locomotor, cardiorrespiratório, urinário, pele e anexos.

2.4. Resposta Imune humoral

A resposta imune humoral de cada felino foi avaliada por meio da RIFI (Camargo, 1964) em amostras sorológicas obtidas dos felinos GI e GII anteriormente à inoculação (dia -7 e 0) e no 7º, 14º, 21º, 28º, 42º, 56º e 70º dia pós-inoculação (DPI). Para esta etapa experimental, as amostras sanguíneas (1mL) foram colhidas por venopunção femural e acondicionadas em tubos estéreis (desprovidos de anticoagulante), sendo as alíquotas sorológicas obtidas por meio de centrifugação a 1500rpm por 10 minutos. As amostras consideradas positivas (título IgG > 64) foram submetidas a titulações de anticorpos (IgG) anti-*T. gondii* por meio de diluições seriadas e realização da RIFI.

2.5. Determinação da parasitemia

A parasitemia por *T. gondii* foi determinada em camadas leucocitárias obtidas de amostras sanguíneas colhidas anteriormente à inoculação (dia -7 e 0) e no 7º, 14º, 21º, 28º, 42º, 56º e 70º DPI. Inicialmente as amostras sanguíneas (1mL) foram colhidas dos felinos pertencentes aos grupos I e II por meio de venopunção femural, sendo acondicionadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após centrifugação (1500rpm por 10 min) das amostras sanguíneas, as camadas leucocitárias foram aspiradas com

auxílio de ponteira e pipeta automática com capacidade de 200 µL, sendo cada uma delas imediatamente inoculadas em camundongos para realização do bioensaio (Costa et al., 1977).

2.6. Colheitas amostrais de urina e saliva para bioensaio

As colheitas de urina e saliva foram realizadas anteriormente à inoculação (dia -7 e 0) e no 7°, 14°, 21°, 28°, 42°, 56° e 70° DPI. Após a obtenção, estas amostras foram acondicionadas em tubos plásticos de 2 mL, devidamente esterilizados. Para a colheita, os gatos foram sedados com cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoetil® 50 – Virbac), na dose de 15 mg/Kg, sendo durante e após a anestesia, monitorados todos os parâmetros clínicos dos felinos (temperatura retal, frequências respiratória e cardíaca).

Para a colheita de urina, utilizou-se sonda número 4, lubrificada com vaselina, que foi introduzida na uretra de cada felino, sendo a urina aspirada diretamente da bexiga com auxílio de uma seringa de 20 mL. As amostras obtidas foram acondicionadas em tubos plásticos estéreis de 15 mL e submetidas a centrifugação a 1500rpm por 10 min para obtenção dos sedimentos urinários. As colheitas de saliva foram realizadas com auxílio de pipeta e ponteira de 1000 µl, sendo as amostras, de aproximadamente 1mL, aspiradas diretamente da cavidade bucal dos animais.

Após, as amostras de urina e saliva foram divididas em duas alíquotas equivalentes, sendo uma mantida em temperatura ambiente e a outra armazenada a -20°C, para o bioensaio em camundongos e a pesquisa de *T. gondii* por nested PCR, respectivamente.

2.7. Bioensaio em camundongos para detecção de *T. gondii* nas amostras de urina e saliva

Cada amostra de urina e saliva, imediatamente após a colheita, foi diluída em 0,5mL de PBS (pH 7,2) autoclavado e inoculada via intraperitoneal com auxílio de seringa de 3mL e agulha (30 x 0,8mm) em um grupo contendo cinco camundongos. Após a inoculação, todos os camundongos foram avaliados periodicamente durante 42 dias, sendo os mortos avaliados imediatamente quanto a presença de taquizoítos no peritônio, e os sobreviventes eutanasiados

após o período pré-estabelecido (42 dias) para pesquisa de cistos teciduais e anticorpos contra o *T. gondii* (Costa et al., 1977).

2.8. Detecção de *T. gondii* nas amostras de urina e saliva por nested PCR

Todas as amostras de urina e saliva foram submetidas a extração de DNA por meio do IllustrabloodPrep Mini spin kit (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda®, Brasil), segundo recomendações do fabricante.

As amostras de DNA obtidas foram submetidas a ciclos de amplificação por meio da nested PCR (Silva et al., 2009) utilizando-se como oligonucleotídeos iniciadores fragmentos do gene codificador da *subunidade18S* do RNA ribossômico (Tabela 1) resultando na amplificação final de uma região contendo 290 pares de base (pb).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na nested PCR.

Reação	Oligonucleotídeos iniciadores	
Primária	Tg18s48F	5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC3'
	Tg18s359R	5'GTTACCCGTCCTGCCCAC3'
Secundária	Tg18s58F	5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3'
	Tg18s348R	5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3'

Como controle positivo, utilizou-se uma amostra de DNA extraído de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*

Após a nested PCR, 10µL de cada amostra foram homogeneizados com 3µL de solução de azul de bromofenol e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x, adicionado de 2µL de brometo de etídio. O produto da amplificação foi visualizado sob luz ultra-violeta, utilizando-se marcador de peso

molecular (Life Technologies, EUA) em cada gel confeccionado, para melhor identificação das bandas específicas.

2.9. MEDIDAS DE SEGURANÇA PESSOAL

Todo o pessoal envolvido neste estudo possuía conhecimentos sobre prevenção, controle e riscos de infecção pelo *T. gondii*, sendo adotados em todos procedimentos experimentais medidas de segurança pessoal como o uso de equipamentos de proteção individual: luvas, jalecos, gorros, propés, máscaras e óculos de proteção.

3. Resultados e Discussão

Todos os felinos pertencentes ao grupo I (inoculados com taquizoítos de *T. gondii*) soroconverteram após a inoculação (títulos IgG anti-*T. gondii* ≥ 64). Verificou-se a soroconversão, com título de 64, em dois felinos (TG2 e TG4) sete dias após a inoculação (7° DPI). Nos demais felinos (TG1 e TG3) foi verificada título de 256, quatorze dias após a inoculação (14° DPI). O presente estudo avaliou a resposta imune humoral contra *T. gondii* até o 70° DPI, sendo possível observar uma alta atividade dos anticorpos da classe IgG até a última data experimental. É sabido que as imunoglobulinas G são anticorpos de fase crônica, responsáveis pela resposta imunológica por longos períodos após a infecção pelo *T. gondii* (Dubey, 1986).

O título sorológico máximo (IgG) anti-*T. gondii*, foi diagnosticado no felino RH3 (título de 1024), em cinco datas experimentais (21°, 28°, 42°, 56° e 70° DPI). Nos demais felinos pertencentes ao grupo I (inoculados com *T. gondii*), a recíproca sorológica máxima diagnosticada foi de 256. Tais flutuações nos perfis imunológicos entre os felinos infectados (GI), possivelmente estão associadas à capacidade de resposta de cada indivíduo (Sharma, 1990). Por não terem sido utilizados felinos geneticamente homólogos, parece coerente o surgimento de tais oscilações nos perfis sorológicos observados no presente estudo.

Quando analisada as camadas leucocitárias dos felinos por meio do bioensaio em camundongos, foi observada a ocorrência de parasitemia pelo *T. gondii* nos gatos GI entre o 7° e o 42° DPI (nove pontos), sendo a maioria deles (oito pontos) diagnosticados até o 28°

DPI. A maior ocorrência de parasitemia nos primeiros dias após a infecção dos felinos, possivelmente se deu pelo fato deste período compreender a fase aguda da doença, caracterizada pela presença dessas formas parasitárias na corrente sanguínea de indivíduos infectados (Dubey, 2017).

A infecção toxoplásmica dos gatos experimentais (GI) após a inoculação de taquizoítos do parasito pode ser comprovada pela soroconversão dos felinos e pela detecção de surtos parasitêmicos exercidos pelo *T. gondii* por meio da bioensaio em camundongos, elucidando a eficiência da metodologia de inoculação com taquizoítos adotada no presente estudo. É importante relatar que nenhum animal pertencente ao grupo controle (GII) apresentou anticorpos (IgG) contra *T. gondii*, bem como, não foram diagnosticadas por meio do bioensaio em camundongos a ocorrência de parasitemia nesses animais. Tais fatos, comprovam a eficiência das medidas de controle implementadas no presente estudo, o que permitiu pesquisar a presença de formas infectantes de *T. gondii* em amostras de urina e saliva obtidas de gatos domésticos sabidamente infectados ou não com o referido parasito.

Referente aos métodos de colheitas amostrais, optou-se por utilizar apenas animais machos na condução deste estudo, devido principalmente a possibilidade do surgimento de oscilação hormonal inerente ao ciclo estral de gatas, como descrito por Nascimento & Santos (2003), que eventualmente poderia influenciar na resposta imunológica dos animais e consequentemente alterar os resultados do estudo. Além de tal fator, a utilização de felinos machos também facilitou a obtenção das amostras urinárias por meio de sondagem uretral, procedimento mais laborioso em fêmeas.

Em todas as datas pré-estabelecidas no delineamento experimental, foi possível a obtenção amostral (urina e saliva) de todos os felinos (GI e GII), com exceção do felino TG1 no 56° DPI e 70° DPI, totalizando 104 amostras analisadas (52 de urina e 52 de saliva). Durante as observações clínicas diárias de saúde, foi constatado no 49° DPI que o felino TG1 apresentava disúria decorrente de uma obstrução uretral, o que levou a reagudização da infecção toxoplásmica, e consequentemente, a sua exclusão do estudo por medidas de bem-estar animal.

A associação farmacológica (Zoetil® 50 – Virbac) utilizada para contenção química dos felinos no momento das colheitas amostrais, foi adotada por proporcionar uma indução imediata com retorno anestésico dos animais de forma gradativa e segura. Durante a anestesia, todos os felinos apresentaram quadros de sialorreia, comuns durante os protocolos anestésicos com fármacos dissociativos (Gunkel & Lafortune, 2007). Visto como desvantagem dos

anestésicos dissociativos, a ocorrência de sialorreia em felinos anestesiados com a associação tiletamina (125,0 mg) e zolazepam (125,0 mg), contribuiu para as colheitas amostrais de saliva realizadas no presente estudo.

A presença de formas infectantes de *T. gondii* não foi observada em nenhuma amostra de urina e saliva dos felinos pertencentes aos grupos I e II durante todo período experimental, fato comprovado por meio da técnica molecular (nested PCR) e bioensaio em camundongos. É importante relatar que não foram encontrados na bibliografia consultada relatos da pesquisa de *T. gondii* na urina e saliva de felinos primoinfectados.

Embora não tenha sido diagnosticada neste estudo a presença de *T. gondii* em amostras biológicas de urina e saliva de felinos, o referido parasito já foi detectado em urina (Vitor et al., 1991; Rocha et al., 1993; Abreu et al. 2001; Bresciani et al., 2001) e saliva (Vitor et al., 1991; Bresciani et al., 2001), de diferentes hospedeiros intermediários.

A comprovação da presença de formas infectantes em líquidos orgânicos de hospedeiros intermediários, nos motivou a idealização deste estudo. Já que atualmente, é sabido que a infecção pelo *T. gondii* em diferentes espécies animais é atribuída a ingestão de oocistos esporulados ou cistos teciduais do parasito, às infecções congênitas, e a transmissão sexual (Bresciani et al., 2001., Lopes et al. 2009). Embora exista a necessidade da realização de novos estudos, a comprovação da eliminação de formas infectantes de *T. gondii* em amostras biológicas de urina e saliva em diferentes espécies de hospedeiros intermediários (Vitor et al., 1991; Rocha et al., 1993; Abreu et al. 2001; Bresciani et al., 2001) deve ainda ser melhor avaliada como possível fator de risco para a infecção pelo parasito.

É sabido que a disseminação de oocistos no meio ambiente e conseqüentemente a manutenção do ciclo urbano do *T. gondii* é unicamente atribuída aos gatos domésticos (Dubey et al. 2004; Wilking et al., 2016). Porém, ainda existem dúvidas quanto ao papel das amostras biológicas (urina, saliva, leite e sêmen) destes animais na disseminação da toxoplasmose.

4. Conclusão

Felinos primoinfectados experimentalmente com taquizoítos da cepa RH (isolado I) de *T. gondii* não eliminaram formas evolutivas infectantes do parasito em amostras de urina e saliva. Há ainda a necessidade de realização de novos estudos com a utilização de isolados do

parasito e inóculos diferentes para comprovação do real papel de tais amostras biológicas desses animais como fator de risco na epidemiologia da toxoplasmose.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

Abreu, C. D.; Navarro, I. T.; Balarin, M. R. S.; Bracarense, A. P. F. R. L.; Marana, E. R. M.; Trapp, S. M., Fuginaka, C. A.; Prudêncio, L. B.; Matos, M. R. & Tsurtsui, V. (2001). Aspectos clínicos, patológicos e sorológicos da toxoplasmose experimental em cães jovens. *Semina: Ciências Agrárias*, 22(2), 123-130.

Bresciani, K. D. S., Toniollo, G. H., Costa, A. J. D., Sabatini, G. A., & Moraes, F. R. D. (2001). Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. *Ciência Rural*, 31(6), 1039-1043.

Camargo, M. E. (1964). Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6(3), 117-18.

Costa, A. J.; Araujo, F. G.; Costa, J. O.; Lima, J. D.; & Nascimento, E. (1977). Experimental infection of bovines with oocysts of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of parasitology*, 212-218.

Costa, A.J. (1979) Toxoplasmose congênita natural em bovinos e infecção experimental de vacas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909. (Tese de Doutorado) São Paulo, Universidade de São Paulo, 1979. 88p.

Dubey, J. P. (2017). Schizogony and gametogony of oocyst-deficient T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology*, 245, 160-162.

Dubey, J. P., Navarro, I. T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R. L., Kawabata, H. H., ... & Lehmann, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil:

seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *Journal of Parasitology*, 90(4), 721-726.

Dubey, J.P. (1986) Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 189;166-170.

Dubey, J.P. (2010) *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd edition. Boca Raton, Florida: CRC Press. p.313.

Dubey, J. P. (2017). Schizogony and gametogony of oocyst-deficient T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology*, 245, 160-162.

Gunkel, C. & Lafortune, M. (2007). Felids. In: West, G. et al. *Zoo animal and wildlife immobilization and Anesthesia*. 1 ed. Ames: Blackwell Publishing. pp. 443-457.

Lopes, W. D. Z.; Costa, A. J.; Souza, F. A.; Rodrigues, J. D. F.; Costa, G. H. N.; Soares, V. E. & Silva, G. S. (2009). Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Animal reproduction science*, 111(2-4), 312-319.

Nascimento, E. F & Santos, R. L. (2003) *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 2 ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan. 133p.

Rocha, R. J., Tafuri, W. L., & Chiari, C. A. (1993). Eliminação de *Toxoplasma gondii* pela urina de camundongos durante a fase aguda da infecção experimental. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35(4), 307-313.

Santana, L. F.; Costa, A. J. D.; Pieroni, J.; Lopes, W. D. Z.; Santos, R. S.; Oliveira, G. P. D., Mendonça, R.P. & Sakamoto, C. A. M. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19(3), 179-182.

Sharma, S. D. (1990). Immunology of toxoplasmosis. *Modern parasite biology: cellular, immunological, and molecular aspects.*, 184-199.

Silva, R. C.; Su, C. & Langoni, H. (2009). First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moule, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. *Veterinary parasitology*, 165(3-4), 332-336.

Vitor, R. W. D. A.; Pinto, J. B.; & Chiari, C. D. A. (1991). Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. 43(2), 147-543.

Wilking, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T., & Seeber, F. (2016). Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Scientific reports*, 6, 22551.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Weslen Fabricio Pires Teixeira - 20%

Maria Eduarda Gonçalves Tozato -15%

Giovana Pavão Vital - 15%

Welber Daniel Zanetti Lopes - 5%

Samea Fernandes Joaquim - 5%

Amanda Leal de Vasconcellos - 5%

Flávia Carolina Fávero - 5%

Lívia Mendonça Pascoal - 5%

Gustavo Felippelli - 5%

Helio Langoni - 5%

Kátia Denise Saraiva Bresciani - 5%

Alvimar José da Costa - 10%