

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA - MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Aline Ludwig

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS APICOMPLEXA EM
TECIDOS DE BUGIO RUIVO (*Alouatta guariba clamitans*)**

Santa Maria, RS,
2020

Aline Ludwig

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS APICOMPLEXA EM TECIDOS
DE BUGIO RUIVO (*Alouatta guariba clamitans*)**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área da Saúde Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Especialista em Medicina Veterinária Preventiva - Ênfase em Doenças Infeciosas e Parasitárias.**

Orientadora: Prof. Dr. Fernanda Silveira Flores Vogel

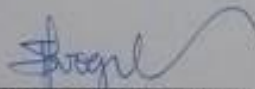
Santa Maria, RS
2020

Aline Ludwig

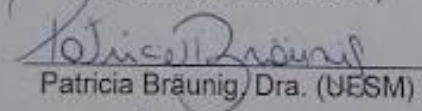
**DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS APICOMPLEXA EM TECIDOS
DE BUGIO RUIVO (*Alouatta guariba clamitans*)**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área da Saúde Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Medicina Veterinária Preventiva - Ênfase em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

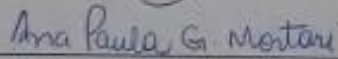
Aprovado em 26 de fevereiro de 2020:



Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)



Patricia Bräunig, Dra. (UESM)



Ana Paula Gnocato Mortari, Mestre (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

RESUMO

DETECÇÃO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS APICOMPLEXA EM TECIDOS DE BUGIO RUIVO (*Alouatta guariba clamitans*)

AUTORA: Aline Ludwig

ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel

Neospora caninum, *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp. são protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Apicomplexa. Esses parasitos possuem ciclo heteroxeno, necessitando de hospedeiro definitivo (em que ocorre reprodução sexuada) e hospedeiro intermediário (reprodução assexuada) e por isso possuem a característica de afetar um grande número de hospedeiros durante o ciclo de vida. O bugio ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) é um primata não humano bastante presente e bem distribuído no Brasil e na América do Sul em geral. Devido à expansão das cidades e com isso a possibilidade de contato entre humanos e animais selvagens e também devido à similaridade genética entre bugios e humanos, diversos patógenos podem ser compartilhados entre humanos e primatas não humanos. Existe uma carência de estudos sobre protozoários em bugios ruivos no Brasil. Portanto, o objetivo desse estudo foi pesquisar, através de Reação em Cadeia da Polimerase, a presença de ácidos nucleicos (DNA) de *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Sarcocystis* spp. em amostras de coração, pulmão, fígado, baço, encéfalo e intestino de seis *A. guariba clamitans* provenientes da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. As análises permitiram a detecção de DNA de protozoários Apicomplexa em tecidos dos seis animais do estudo: *T. gondii* dois dos animais e *Sarcocystis* spp. quatro animais. Ainda, foi possível fazer determinação genotípica de *T. gondii*, sugerindo genótipo atípico. Os resultados encontrados são importantes pois reforçam a importância de bugios como hospedeiros de protozoários com caráter zoonótico e apontam para a circulação de genótipo atípico de *T. gondii* na região central do Rio Grande do Sul.

Palavras chave: Bugio Ruivo. Toxoplasma. Sarcocystis. Genótipo atípico.

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION OF APICOMPLEXA PROTOZOA IN TISSUES FROM *ALOUATTA GUARIBA CLAMITANS*

AUTHOR: Aline Ludwig

ADVISOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Neospora caninum, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. are obligate intracellular protozoa belonging to the phylum Apicomplexa. These parasites have heteroxene cycle, requiring definitive host (where sexual reproduction occurs) and intermediate host (asexual reproduction) and therefore have the characteristic of affecting a large number of hosts during the life cycle. The brown howler monkey (*Alouatta guariba clamitans*) is a very present nonhuman primate and well distributed in Brazil and South America in general. Due to the expansion of cities and thus the possibility of contact between humans and wildlife and also due to the genetic similarity between howler monkeys and humans, several pathogens can be shared between humans and nonhuman primates. There is a lack of studies on protozoa in brown howler monkeys in Brazil. Therefore, the aim of this study was to investigate, through Polymerase Chain Reaction, the presence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* spp. in samples of heart, lung, liver, spleen, brain and intestine from six *A. guariba clamitans* from central Rio Grande do Sul, Brazil. The analyzes allowed the detection of DNA of Apicomplexa protozoa in tissues of the six animals of the study: *T. gondii* in two of the animals and *Sarcocystis* spp. in the other four animals. Also, it was possible to make genotypic determination of the *T. gondii* sample, suggesting an atypical genotype. The results are important because they reinforce the importance of howler monkeys as hosts of protozoa with zoonotic character and point to the circulation of atypical *T. gondii* genotype in the central region of Rio Grande do Sul.

Key words: Brown howler monkey. *Toxoplasma*. *Sarcocystis*. Atypical genotype.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.2 PROPOSIÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 <i>Neospora caninum</i>	10
2.2 <i>Sarcocystis</i> spp.	11
2.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	14
2.4 BUGIO RUIVO (<i>Alouatta guariba clamitans</i>).....	17
2.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS APICOMPLEXA.....	18
3 MANUSCRITO	21
4 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

Os materiais e métodos, resultados e discussão que fazem parte desta monografia estão apresentados sob a forma de artigo científico e encontram-se na seção MANUSCRITO, assim como as referências citadas no artigo. O manuscrito será submetido à Acta Parasitologica e está redigido de acordo com as normas da revista. As referências bibliográficas encontradas no final deste trabalho referem-se às citações contidas nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA.

1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do filo Apicomplexa apresentam papel importante como agentes etiológicos, determinando diferentes enfermidades, tanto em animais como em humanos (CORLISS, 1994). Neste filo estão incluídos os gêneros *Besnoitia*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Neospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma*. Este filo caracteriza-se pela presença de uma estrutura chamada complexo apical, localizada no pólo anterior do corpo dos parasitos, que contém elementos estruturais e secretores e é destinada à fixação e penetração nas células hospedeiras (BAUM et al., 2008; GUBBELS & DURAISINGH, 2012).

Os gêneros *Neospora*, *Sarcocystis* e *Toxoplasma* são protozoários obrigatoriamente intracelulares que apresentam ciclo de vida heteroxeno, necessitando de hospedeiros intermediários (herbívoro ou onívoro) e hospedeiros definitivos (geralmente carnívoros) para completarem seu ciclo (TENTER, 1995). No hospedeiro intermediário, acontecem os estágios de reprodução assexuada, enquanto no hospedeiro definitivo ocorre a reprodução sexuada desses protozoários (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Sabe-se que a saúde dos animais silvestres tem sido prejudicada pela fragmentação e degradação de habitats, pelo isolamento de populações, e pela maior proximidade com humanos e seus animais domésticos (DASZAK et al., 2000). Além disso, a semelhança filogenética entre primatas não humanos e humanos permite a susceptibilidade a vários agentes etiológicos em comum (BENNETT et al., 1995).

Os animais do gênero *Alouatta* são conhecidos popularmente como bugios, barbados, roncadores e guaribas, são primatas neotropicais amplamente distribuídos na América do Sul e são os mais bem estudados (NEVILLE et al., 1988; MENDES, 1989). No entanto, são poucos os estudos parasitológicos relacionados diretamente ao *Alouatta guariba clamitans* (bugio ruivo), seja em ambiente natural ou cativeiro (HIRANO et al., 1997).

Considerando a importância destes patógenos para a saúde animal e para a saúde pública, além da carência de estudos regionais sobre endoparasitas em primatas, este trabalho teve por objetivo avaliar, através de detecção molecular, a

presença de *T. Gondii*, *N. caninum* e *Sarcocystis* spp. em tecidos de bugio ruivo oriundos da região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

1.2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a presença de protozoários apicomplexa em tecidos de bugio ruivo.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) dos protozoários *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. e *Neospora caninum* em encéfalo, pulmão, fígado, coração, baço e intestino de seis *Alouatta guariba clamitans* (bugio ruivo) por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

- Determinar o genótipo de *T. gondii* presente nos tecidos de *Alouatta guariba clamitans* pela técnica de Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Neospora caninum*

A ocorrência do gênero *Neospora* foi reconhecido pela primeira vez em 1984 em cães da Noruega (BJERKÅS et al., 1984) e descrito como um novo gênero e espécie (*Neospora caninum*) em 1988 por DUBEY et al.(1988). O gênero *Neospora* compreende duas espécies: *N. caninum* e *N. hughesi*, este último tendo apenas equinos como hospedeiros intermediários. Atualmente, são reconhecidos como hospedeiros definitivos deste gênero os cães (MCALLISTER et al., 1998), coiotes (GONDIM et al., 2004) e dingos (*Canis lupus dingo*) (KING et al., 2010).

Os hospedeiros definitivos excretam oocistos do protozoário nas fezes, que após esporulação são ingeridos pelos hospedeiros intermediários. A infecção pós-natal pode ser observada quando há o consumo de água e alimento contaminados com oocistos do hospedeiro definitivo. Nos hospedeiros intermediários, ocorrerá a formação de cistos teciduais, com o ciclo completando-se quando algum hospedeiro definitivo ingerir tecidos do hospedeiro intermediário que contenham os cistos (PARÉ et al., 1996; SARTOR et al., 2005).

O ciclo do protozoário envolve três estágios infecciosos: bradizoítos, taquizoítos e oocistos contendo esporozoítos. Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários e definitivos, enquanto os oocistos se desenvolvem apenas nos hospedeiros definitivos, e são excretados junto às fezes destes animais. Os oocistos se tornam infectantes após esporulação no meio ambiente. (DUBEY, 2003).

O protozoário *N.caninum* é um parasita intracelular obrigatório, importante agente causador de abortos em bovinos em todo mundo (DUBEY & LINDSAY, 1996). Em cães o parasito é responsável por desordens neurológicas severas (DUBEY et al., 1988; DUBEY et al., 1999). Ocasionalmente pode causar infecções clínicas em equinos, caprinos, ovinos, cervos, búfalos e galinhas.

Além disso, anticorpos para *N. caninum*, foram encontrados em raposas, coiotes, camelos, veados, cervo, zebra, búfalo africano, gazela, alce, impala, javali-africano, corça, bison, entre outros (DUBEY, 2003; LINDSAY et al., 1999; GONDIM, 2006). Por meio de técnicas moleculares, DNA de *N. caninum* foi detectado em

capivaras no Paraná (TRUPPEL et al., 2010) e raposas da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2015), no Brasil.

O espectro de hospedeiros de *N. caninum* na fauna silvestre tem aumentado significativamente, o que dificulta o controle da transmissão do parasito para animais domésticos como bovinos e cães, uma vez que algumas espécies de animais silvestres cohabitam com animais domésticos (GONDIM et al., 2004). O primeiro diagnóstico de neosporose na vida selvagem ocorreu em um Veado-de-cauda-preta (*Odocoileus hemionus columbianus*) da Califórnia encontrado morto na natureza (WOODS et al., 1994).

Atualmente, não há evidências de potencial zoonótico de *N. caninum*, embora os anticorpos em humanos tenham sido encontrados em pacientes normais e imunocomprometidos em diferentes partes do mundo (DUBEY et al., 2017).

Com relação aos primatas não humanos, as informações são limitadas quanto à ocorrência e à importância da infecção pelo protozoário. Entretanto, há relatos de infecção experimental por *Neospora* em macacos (BARR et al., 1994; HO et al., 1997) e recentemente Costa e colaboradores (2018) reportaram um caso brasileiro de neosporose em macaco da noite (*Aotus azarae infulatus*).

2.2 *Sarcocystis* spp.

O gênero *Sarcocystis* pertence ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, e possui mais de 100 espécies que infectam mamíferos, aves, marsupiais e animais pecilotérmicos (DUBEY & LINDSAY, 2006). Existem algumas diferenças no ciclo de vida e patogenicidade das espécies que constituem esse gênero, no entanto a formação de cistos teciduais é uma aptidão que diz respeito a todas elas, e sendo assim é a principal característica do gênero *Sarcocystis* (TENTER, 1995).

Este gênero foi isolado pela primeira vez em 1843, pelo cientista suíço Miescher, a partir de cistos filiformes em um rato. Apenas em 1882 surgiu o nome do gênero *Sarcocystis*, o qual deriva do grego *sarkos*, que significa carne e *kystis*, que significa cisto (DUBEY, 1983).

Sarcocystis apresenta um ciclo heteroxeno, necessitando de hospedeiros definitivos e intermediários para completar seu ciclo biológico (MORÉ et al., 2013). Os estágios assexuados desenvolvem-se no hospedeiro intermediário, que, na natureza, é frequentemente a presa. Enquanto os estágios sexuados desenvolvem-

se apenas no hospedeiro definitivo (DUBEY & LINDSAY, 2006). Uma variedade de carnívoros, especialmente canídeos e felídeos, répteis, aves de rapina e marsupiais americanos estão incluídos como hospedeiros definitivos (DUBEY, 2001).

O hospedeiro definitivo ingere tecidos contendo cistos maduros de *Sarcocystis*. Esses cistos liberam os bradizoítos que penetram na mucosa do intestino delgado e se transformam em gametas masculino (microgametas) e feminino (macrogametas). Os microgametas liberados se movem ativamente para a periferia do macrogameta e após a fertilização, desenvolve-se uma parede em volta do zigoto, o que determina a formação do oocisto. (GUÇLU, 2004). O processo de gametogonia e fertilização pode ocorrer em até 24 horas (DUBEY e LINDSAY, 2006). Os oocistos do gênero *Sarcocystis* esporulam na lâmina própria do intestino do hospedeiro, e se dividem em dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Esse oocisto esporulado será liberado nas fezes do hospedeiro definitivo, sendo a fase infectante para o hospedeiro intermediário (GUÇLU, 2004). Os oocistos são primeiramente liberados nas fezes entre 7 e 14 dias após a ingestão do cisto (DUBEY, 1976).

A infecção nos hospedeiros intermediários ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos, dando início ao ciclo assexuado (DUBEY e LINDSAY, 2006). Os esporozoítos dentro dos esporocistos se rompem no intestino delgado e 7 a 15 dias após a inoculação é formada a primeira geração de esquizontes. Estes esquizontes podem se desenvolver em uma variedade de células, incluindo células endoteliais vasculares, células neuronais, dependendo da espécie de *Sarcocystis*. A segunda geração de esquizontes ocorre de 19 a 46 dias após a inoculação (DUBEY et al., 1989). O número de gerações de esquizogonia e o tipo de célula hospedeira em que esquizogonia pode ocorrer variam com cada espécie de *Sarcocystis* (DUBEY e LINDSAY, 2006).

Os merozoítos resultantes da formação dos esquizontes penetram nas células musculares e se encistam (sarcocisto). Os cistos se desenvolvem em qualquer parte do tecido muscular, no entanto, os órgãos afetados com mais frequência são o coração, esôfago, diafragma e a língua (DOMENIS et al., 2011).

O sarcocisto consiste de uma parede que rodeia os bradizoítos. A estrutura e espessura da parede variam entre as espécies de *Sarcocystis* (DUBEY et al., 1989). Estes cistos se tornam infecciosos aproximadamente 75 dias após a infecção, mas há considerável variação entre espécies. Sarcocistos imaturos contendo apenas

merócitos e esquizontes não são infecciosos para o hospedeiro definitivo (DUBEY e LINSLEY, 2006). Os sarcocistos variam em tamanho e forma, dependendo da espécie do parasito. Alguns sempre permanecem microscópicos, variando de longos e estreitos a curtos e largos, enquanto outros tornam-se macroscópicos, com aparência filamentosa e globular (DUBEY, 1992).

Os cistos de *Sarcocystis* spp. no músculo normalmente não causam sinais clínicos, ao passo que a maturação dos esquizontes de segunda geração pode ser acompanhada por doença grave, frequentemente resultando em morte (ROMMEL, 1985). Sendo a gravidade da doença e dos sinais clínicos mais frequentes variáveis de acordo com o grau de infecção, no entanto a infecção pelo *S. hominis* em bovinos foi ocasionalmente associado à miosite eosinofílica e a presença de *S. hirsuta* macroscópica leva a condenação de partes da carcaça bovina (WOUDA et al., 2006).

O protozoário pode causar uma doença debilitante podendo levar à morte e tem como sinais clínicos febre, anorexia, prostração, palidez das mucosas, corrimento nasal e ocular, dispneia, salivação e opstótono. Além desses sinais clínicos observados tanto em animais jovens como em adultos, pode ser encontrado em fêmeas, queda da produção leiteira, retenção de placenta e nascimentos de animais fracos (LOPES, 2004). Os animais sobreviventes à infecção geralmente se recuperam rapidamente (ROMMEL, 1985).

Humanos são hospedeiros definitivos de *S. hominis* e *S. suihominis* e também podem ser hospedeiros intermediários acidentais de várias outras espécies. Os sintomas variam com a espécie infectante e o órgão parasitado. (DUBEY et al., 1989).

Sarcocystis spp. são geralmente encontrados nos tecidos de diversos mamíferos, aves e répteis. *Sarcocystis* spp. já foi detectado em muitas espécies silvestres e os primatas podem servir como hospedeiros intermediários e definitivos, dependendo das espécies de *Sarcocystis* (FRENKEL, 1997). Existem vários relatos de cistos de *Sarcocystis* spp. encontrados em primatas (MANDOUR, 1969; KARR, 1975; MEHLHORN & HEYDORN, 1978; KAN et al., 1979; HERNANDEZ-JUAREGUI et al., 1983; KIMURA et al., 1987; YANG et al., 2005). Porém, não há informações na literatura sobre sarcocistose em primatas no Brasil.

2.3 *Toxoplasma gondii*

O gênero *Toxoplasma* foi primeiramente descrito por Splendore (1908), que isolou o parasita em um coelho de laboratório em São Paulo, no Brasil, classificando-o como *Toxoplasma cuniculli*. No mesmo período Nicolle & Manceaux (1908) no Instituto Pasteur de Túnis na Tunísia descreveram em um roedor da África do Sul, e classificaram inicialmente como *Leishmania gondii* e em 1909, reclassificaram como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909).

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae (DUBEY et al., 2002). Na década de 1970 foram descritos os hospedeiros definitivos e intermediários de *T. gondii* (FRENKEL et al., 1970). O protozoário tem como hospedeiro definitivo os felídeos (domésticos e selvagens) e como hospedeiros intermediários animais de sangue quente, dos quais incluem pássaros, herbívoros, primatas e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), além de mamíferos marinhos (baleias e golfinhos) (DUBEY, 2002). Acredita-se que *T. gondii* provavelmente pode infectar todos os animais de sangue quente, incluindo humanos, e é prevalente na maior parte do mundo (DUBEY, 2008).

Existem três estágios de infecção de *T. gondii*: taquizoítos, bradizoítos e oocistos. Os taquizoítos são o estágio de multiplicação rápida do protozoário, responsáveis pela fase aguda da infecção, ocorrendo a invasão de vários tecidos pelos taquizoítos, sendo estes, capazes de atravessar barreiras teciduais como a hematoencefálica e placentária, atingindo o feto. Os bradizoítos são considerados como o estágio latente do parasito, a fase que marca o início da infecção crônica, na qual sua multiplicação diminui drasticamente e o parasito pode manter a infecção por um longo período em cistos teciduais (DUBEY, 1998). Os felídeos são os únicos hospedeiros que apresentam a forma sexuada, dessa maneira excretam oocistos que contaminam areia e solo e quando esporulados são fontes duradouras de infecção (ARAUJO et al., 1998).

A fase de taquizoítos ocorre dentro de 8 a 12 dias pós-infecção, com a invasão de vários tecidos (TENTER et al., 2000). O taquizoito entra na célula hospedeira por penetração ativa da membrana celular. Dentro dessa célula forma-se um vacúolo parasitóforo que o protege do sistema imune do hospedeiro (DUBEY &

LINDSAY, 2006). O taquizoíta multiplica-se assexuadamente por divisões binárias repetidas até a célula hospedeira se romper. Depois de um número desconhecido de divisões, taquizoítos de *T. gondii* dão origem a outro estágio chamado cisto tecidual e passam a ser denominados bradizoítos (DUBEY & LINDSAY, 2006).

A partir da formação destes cistos, começa a fase crônica da infecção. Os cistos crescem, porém permanecem dentro da célula. Eles variam em tamanho de 5 a 70 μ m e estão repletos de bradizoítos. Os cistos teciduais podem se desenvolver em diversos órgãos e tecidos, como os pulmões, fígado e rins. No entanto, são mais prevalentes no tecido muscular esquelético e cardíaco, e no sistema nervoso central, incluindo cérebro e os olhos (DUBEY et al., 1998).

Os felídeos, hospedeiros definitivos, podem infectar-se através da ingestão dos bradizoítos (cistos) de tecidos de roedores, por carne crua de outras espécies animais, pela ingestão de oocistos esporulados ou ainda por meio de transmissão transplacentária (DUBEY, 2003). Os felídeos liberam oocistos nas fezes 3 a 10 dias após a ingestão de bradizoítos, sendo necessários, mais de 18 dias quando ingerem oocistos (DUBEY, 1998). Os hospedeiros intermediários podem se infectar por três vias, sendo: ingestão de oocistos esporulados; ingestão de cistos teciduais viáveis, e infecção transplacentária (FRENKEL, 1971).

Os oocistos são liberados nas fezes e estão presentes no solo, onde são necessárias condições ideais de umidade, oxigenação e temperatura para que ocorra a esporulação, podendo então o oocisto permanecer infectante por até 18 meses (FRENKEL, 1971). O hábito que os felinos tem de cobrir suas fezes, aumenta ainda mais as condições de sobrevivência do oocisto no ambiente. Geralmente, cerca de 1% dos gatos em uma população são encontrados liberando grande quantidade de oocistos, além disso essa forma do parasita é eliminada por um curto período (1 a 2 semanas) na vida do gato (DUBEY & BEATTIE, 1988). Ainda assim, a grande quantidade de oocistos liberados nesse período é capaz de assegurar a contaminação generalizada do ambiente (HILL & DUBEY, 2002).

O parasita *T. gondii* é a única espécie deste gênero, porém existem diferenças genotípicas entre os isolados. Os primeiros estudos demonstravam haver três linhagens clonais (I,II,III), sendo que os tipos II e III são geralmente associados com a doença em animais e o tipo I é predominantemente encontrado em humanos (HOWE & SIBLEY, 1995; KHAN et al., 2006). No entanto hoje sabe-se da grande

diversidade genética do protozoário, com genótipos recombinantes entre as três linhagens, denominados atípicos (SOUSA & RUBENS, 2014).

No Brasil, existem muitas cepas atípicas (DUBEY & SU, 2009). Esta situação pode estar relacionada a vários fatores, como a distribuição geográfica, o clima tropical, fauna rica e diversas rotas de transmissão possíveis (FERREIRA et al., 2008). Quatro genótipos com ampla circulação e descritos em diferentes hospedeiros no Brasil foram propostos como linhagens clonais brasileiras. Estas linhagens são denominadas BRI, BRII, BRIII e BRIV e são distintas das linhagens arquetípicas tipos I, II e III (PENA et al., 2008). Segundo Gilbert et al. (2008), no Brasil existe uma predominância de cepas virulentas de *T. gondii* em comparação com a Europa.

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais estudados, pela sua importância tanto em medicina humana, quanto veterinária. As condições ambientais, os hábitos culturais de uma população ou etnias e a própria fauna constituem alguns dos fatores que podem explicar a variabilidade desta infecção em diferentes áreas geográficas de um determinado país (DUBEY, 2009). Sua considerável disseminação ao redor do mundo se deve a alta capacidade de adaptação nas diferentes regiões e facilidade de transmissão por diversas formas (DUBEY & SU, 2009).

Em humanos imunocompetentes as formas assintomáticas da infecção constituem a maioria dos casos e figuram como acometimentos benignos, geralmente de cura espontânea. Uma manifestação frequente e importante é a toxoplasmose ocular. Em gestantes, a infecção congênita pode causar abortos, má formação fetal, coriorretinite, hidrocefalia ou microcefalia, calcificações cerebrais e alteração neurológica. (TENTER et al., 2000).

Nos animais de produção, a toxoplasmose tem como principal característica os distúrbios reprodutivos, e gera perdas econômicas, principalmente em ovinos, caprinos e suínos, que são consideradas as espécies mais susceptíveis (GARCIA et al., 1999). Diversas espécies de aves também são infectadas pelo parasito, entretanto, na maioria das vezes, a infecção cursa de forma assintomática (DUBEY, 2002).

Em suínos, animais extremamente sensíveis à infecção por *T. gondii*, a importância está relacionada principalmente às perdas reprodutivas e às implicações em saúde pública, uma vez que a ingestão de cistos em carne crua ou mal cozida é

uma importante via de transmissão de *T. gondii* para o homem (FIALHO & ARAÚJO, 2003).

Um estudo sorológico conduzido com animais silvestres atropelados, atendidos em um hospital veterinário em São José do Rio Preto, no Brasil detectou anticorpos para *T. gondii* em seis de 26 animais testados, incluindo bugio preto (*Alouatta caraia*) (DA SILVA et al., 2014). Existem muitos relatos de toxoplasmose em primatas do Novo Mundo (HESSLER et al., 1971; CUNNINGHAM et al., 1992; VON BRACK et al., 1995; BOUER et al., 1999; EIPHANIO et al., 2000, 2001, 2003).

Toxoplasmose é normalmente considerada aguda e fatal para muitos primatas (EIPHANIO et al., 2000). Em estudo com 33 primatas, morte sem sinais clínicos ocorreu em 43,7% dos casos. Os achados clínicos mais comuns foram mal-estar, dispneia, hipotermia e secreção serossanguinolenta ou espumosa; pneumonia e hepatite foram as lesões mais encontradas (EIPHANIO et al., 2003). Os achados de anticorpos contra *T. gondii* em algumas espécies de capuchinhos e bugios na natureza indica que alguns desses primatas do Novo Mundo sobrevivem à exposição ao *T. gondii* (DUBEY et al., 2012).

2.4 BUGIO RUIVO (*Alouatta guariba clamitans*)

Os primatas do gênero *Alouatta* são animais arborícolas de grande porte, com corpo maciço e longa pelagem. Possuem espessa e vasta barba sob a face nua e pele negra, hipertrofia do osso hioide, acentuada nos machos, cauda preênsil e esquizodactilia (AURICCHIO, 1995). São conhecidos no Brasil ainda como bugios, barbados, roncadores e guaribas, e são os primatas neotropicais mais bem estudados (NEVILLE et al., 1988; MENDES, 1989). O gênero é composto por catorze espécies, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o México (SERIO-SILVA et al., 2005) até o Rio Grande do Sul, no Brasil (PRINTES et al., 2001).

Entre os representantes deste grupo está *Alouatta guariba clamitans*, que é endêmico da Mata Atlântica e ocorre no Brasil desde o Espírito Santo até a bacia do rio Camaquã no Rio Grande do Sul (HIRSCH et al., 1991; RYLANDS et al., 2000; PRINTES et al., 2001). A subespécie é considerada como próximo de ameaça, ou

seja, com perigo de extinção em médio prazo, pela União Internacional de Conservação da Natureza- IUCN (MENDES, 2008).

Os bugios alimentam-se de frutos, sementes, talos, pecíolos, botões, flores, inclusive pólen e néctar (NEVILLE et al., 1988). Porém, folhas maduras e novas constituem a maior parte de sua dieta, podendo chegar a mais de 50% (BICCA-MARQUES & CALEGARO-MARQUES, 1995), sendo caracterizados como os mais folívoros dentre os primatas neotropicais (MILTON, 1980).

A elevada densidade populacional humana da região centro-sul do Brasil e a extensiva destruição do hábitat, resultante do processo histórico de ocupação, reduziram a ampla distribuição original do bugio-ruivo para umas poucas populações remanescentes que se encontram restritas a fragmentos florestais isolados (áreas de mata fechada que permanecem intactas em meio a uma plantação ou uma área desmatada) (SANTOS et al., 1987; CHIARELLO & GALETTI, 1994; RIBEIRO & BICCA-MARQUES, 2005).

Os bugios por serem arborícolas são menos suscetíveis a infecções do que os primatas terrestres, pois os primatas terrestres possuem maior probabilidade de entrar em contato com formas infecciosas que se encontram no solo (GILBERT 1994). Entretanto, fragmentos florestais com insuficiência de comida forçam os macacos a irem para o chão para passar de um fragmento a outro, aumentando a probabilidade de infecção (SANTA CRUZ et al., 2000)

Devido à ampla distribuição dos bugios e ao grande contato primata – humano, eles possuem uma grande importância zoonótica, pois podem ser potenciais dispersores de parasitos aumentando os riscos sanitários para o homem (SANTA CRUZ et al., 2000).

Estudos acerca das infecções parasitárias presentes em primatas são importantes pois podem fornecer importantes informações sobre as relações evolutivas, ecológicas e para a conservação de espécies (MENDES, 1989; STUART & STRIER, 1995). Isso devido à possibilidade de compartilhamento de agentes etiológicos entre o homem e os primatas não humanos em decorrência de nosso alto grau de parentesco (GREINERT et al., 2007).

2.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS APICOMPLEXA

As técnicas moleculares têm grande utilidade para a identificação de agentes infecciosos em tecidos, secreções, excreções e fluidos corporais de animais, trazendo informações que não podem ser obtidas por meio dos testes imunológicos ou morfológicos (SINGH, 1997).

As técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as suas variantes com base em alterações na sequência nucleotídica, tem sido utilizadas e consideradas sensíveis e a rápidas para determinar diversidade genética entre muitos parasitas, auxiliando de forma fundamental em estudos filogenéticos, taxonômicos, e no mapeamento epidemiológico (GONZALEZ et al., 2006). Para obtenção de maior especificidade de diagnóstico é possível realizar a Nested-PCR, a qual consiste de duas amplificações consecutivas. Essa técnica é importante para detecção e identificação em situações nas quais a PCR simples não é suficiente para chegar a um diagnóstico conclusivo (HECKEROTH & TENTER, 1999).

A PCR é altamente específica, mas em alguns casos, é difícil realizar extração de DNA e atingir as concentrações desejadas nas amostras, o que limita a sensibilidade da técnica (ALFONSO et al., 2009). Os cistos de protozoários apicomplexa são distribuídos aleatoriamente nos tecidos dos hospedeiros (PIERGILI, 2004). Além disso, a estrutura da parede dos cistos compreende uma barreira que dificulta a ruptura dos cistos, reduzindo significativamente o rendimento de DNA extraídos deles (TENTER, 1995; NANTAVISAI et al. 2007; BABAEI et al. 2011). A etapa de extração de DNA é, portanto, muito importante para o sucesso da detecção molecular. Estudos mostraram que utilização de kit comercial com modificações na etapa de lise foi adequado para extração de DNA de cistos de *Sarcocystis* spp. (MOREÉ et al., 2011; BRÄUNIG et al., 2016).

Para detecção de DNA de *T. gondii* vários genes alvos são usados, como gene SAG1, gene B1 (LIN et al., 2000), 18S DNA ribossomal (KIJLSTRA et al., 2008). Atualmente, muitos estudos utilizam a sequência não codificadora repetitiva de 529 pares de base que apresenta de 200 a 300 cópias no genoma do parasito, sendo altamente específico do ponto de vista analítico (HOMAN et AL., 2000). Esse é um dos alvos mais usados em detecção molecular de *T. gondii*.

A técnica ainda mais utilizada e aceita na comunidade científica para a caracterização genética das linhagens de *T. gondii* é a Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos (RFLP) (HOWE & SIBLEY, 1995). A PCR-RFLP utiliza endonucleases de restrição, as quais são uma classe de enzimas que cortam ou

digerem apenas DNA dupla fita quando ocorre uma sequência específica de quatro ou mais bases. Dessa forma, a técnica é capaz de detectar pequenas variações em um gene, quando essas variações criam um sítio capaz de ser digerido por enzimas de restrição, ou quando excluem a existência de sítios de restrição (HOWE & SIBLEY, 1995; SINGH, 1997).

O alvo de diagnóstico molecular e diferenciação entre as espécies de *Sarcocystis* mais comum é a pequena subunidade do gene de RNA ribossomal (18S rDNA), que é repetitiva e demonstra ter variabilidade considerável entre as espécies de *Sarcocystis* (MORÉ et al., 2013). Outras regiões alvo do DNA ribossomal, como ITS1 ou o gene 28S rRNA; bem como gene da subunidade I do citocromo C oxidase mitocondrial (CoxI) também são usadas para detectar espécies de *Sarcocystis* (GJERDE, 2016).

Para *Neospora caninum*, sequências do gene NC5 do protozoário são bastante utilizadas como alvo para PCR. O par de primer Np21 / Np6, que tem como alvo gene NC5, foi considerado sensível suficiente para detectar um único parasita misturado em 2mg de tecido cerebral (YAMAGE et al., 1996).

3 MANUSCRITO

Molecular detection of Apicomplexa protozoa in tissues from *Alouatta guariba clamitans*

Ludwig, Aline^{1*}; Murer, Laurete²; dos Santos, Helton Fernandes²; Ludwig, Adriana³; Sangioni, Luis Antonio¹; Vogel, Fernanda Silveira Flores¹

¹Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias/Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

³Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brasil.

* lineludwig09@gmail.com

ORCID ID:

Ludwig, Aline: 0000-0002-0904-4953

Murer, Laurete: 0000-0002-4977-7676

Dos Santos, Helton Fernandes: 0000-0002-8690-3993

Ludwig, Adriana: 0000-0001-9170-7156

Sangioni, Luis Antonio 0000-0002-2364-1084

Vogel, Fernanda Silveira Flores: 0000-0003-1351-9912

RUNNING TITLE - Apicomplexa protozoans in brown howler monkey.

Abstract

Purpose: The genus *Neospora*, *Sarcocystis*, and *Toxoplasma* are heteroxene protozoa of the Apicomplexa phylum and affect a large number of animals throughout their life cycle. *Alouatta guariba clamitans* (brown howler monkey) is a primate species widely distributed in South America. In primates, protozoan infections are common, but there are few studies in Brazil. Due to the scarcity of studies on these protozoa in primates in Brazil, the goal of this study was to investigate, through molecular detection, *Neospora caninum*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma gondii* in *Alouatta guariba clamitans* tissues.

Methods: DNA extraction was performed from tissue samples from the heart, brain, liver, spleen, lung and intestine of six *Alouatta guariba clamitans* from the Central Region of Rio Grande do Sul, Brazil. After, we performed conventional PCR to detect DNA from *N. caninum*, *Sarcocystis* spp and *T. gondii*. Positive sample for *T. gondii* was genotypically characterized by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) .

Results: The research showed the presence of *Sarcocystis* DNA in the tissues of four animals belonging to at least two species and *T. gondii* DNA from an atypical genotype was detected in two animal.

Conclusion: The presence of apicomplexan protozoans in all tested samples highlight the importance of brown howler monkeys as maintainers of pathogens in nature.

KEYWORDS- Brown howler monkey. *Sarcocystis*. *Toxoplasma*. Genotyping.

Introduction

The Apicomplexa phylum comprises several genera of pathogenic parasites [1] as *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Sarcocystis* spp. These apicomplexan parasites have heteroxenous life cycle infecting multiple hosts and predator-prey relationships facilitate their transmission. In the intermediate hosts (often herbivorous or omnivorous), infectious stages are formed by tissue cysts that can be ingested by the definitive host (usually a carnivorous predator) [2].

Protozoal infections in nonhuman primates are common and native populations of primates host an amazing diversity of parasites and infectious agents, reinforcing the role of wild animals as reservoirs for zoonosis [3, 4].

Primates from genus *Alouatta* are the New World monkeys most widely distributed and *Alouatta guariba clamitans* (brown howler monkey) is endemic at the Atlantic Forest in Brazil and Argentina [5]. Because of this wide distribution, howler monkeys have great zoonotic importance, becoming a potential parasite carrier.

There are few studies about endoparasites in primates in Brazil; therefore this study aimed to evaluate the presence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp., and *Neospora caninum* in different tissues of *Alouatta guariba clamitans* increasing the knowledge about protozoa infecting local primates.

Material and methods

Samples

Tissue samples of *Alouatta guariba clamitans* (brown howler monkey) were obtained after necropsy at the Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Silvestres from the Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias from

Universidade Federal de Santa Maria. All animals came from a wild fauna maintainer located in Santa Maria, Rio Grande do Sul and were sent for necropsy after death. There is no information about the time and place of birth and how long they lived in the maintainer. Fragments of brain, heart, liver, lung, spleen and intestine were collected from six brown howler monkeys arising from the central region of Rio Grande do Sul in Southern Brazil (n=35, since the brain of one animal was not provided). The samples were stored at -20°C until the processing.

DNA extraction

An amount of 20 to 50 mg of collected tissues was macerated for DNA extraction using Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), following the instructions of the manufacturer, with modification in the lysis step according to Moré et al. (2011) [6]. Conventional polymerase chain reaction (PCR) technique was performed for molecular detection of DNA from each protozoans.

Molecular detection of *Toxoplasma gondii*

For detection of *T. gondii* DNA PCR was performed using a 529-base pairs (bp) genetic marker that repeats approximately 300 times in the *T. gondii* genome, thus presenting high sensitivity [7] using the primer forward (Tox4) 5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3' and primer reverse (Tox5) 5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3'. The reaction was run in a final volume of 25 µl mixture containing 2.5 µl 10X PCR Buffer with MgCl₂, 10 mM dNTP, 10 pmol of each primer, 0,7 U JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich), 100 ng DNA. DNA from *T. gondii* RH and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively. Amplification was conducted in a thermal with initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 seconds at 95°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C and a final extension of 5 min at 72°C. Amplification products

were visualized in transilluminator after 1.5% agarose gel electrophoresis using gel red as DNA dye.

Determination of *T. gondii* genotype was performed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using six genetic markers, SAG1, SAG3, BTUB, GRA6, L358 and PK1 as previously described [8, 9]. DNA target sequences were first amplified by PCR-multiplex using external primers of all markers, followed by a nested PCR using internal primers individually for each marker. The nested PCR products were then cleaved by restriction enzymes under certain specific temperature and time conditions. The primers sequences and enzymes are described in Su et al., 2010 [9]. Positive controls of type I (GTI), II (PTG) and III (CTG) strains were used in the reactions. After that, samples were submitted to 2.5-3% agarose gel electrophoresis and visualized in Ultraviolet light transilluminator. The images were compared with controls for genotype determination.

Molecular detection of *Neospora caninum*

PCR was performed using a primer set for specific amplification of *N. caninum* Nc-5 gene: forward (Np21), 5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3'; and reverse (Np6), 5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3' with a 328 bp expected product according to Yamage et al. (1996) [10]. The reaction was conducted containing 25µl final volume using 0.7 U JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich); 2.5 µl 10X PCR Buffer with MgCl₂; 5 pmol from each primer, 6 mM dNTPs and 50 ng template DNA. For amplification of the genetic material in a thermal cycler, a protocol was performed using 35 cycles, with initial denaturation 95°C for 5 minutes, denaturation 95°C for 1 minute, annealing 50°C for 1 minute, extension 72°C for 1 minute, followed by final extension at 72°C for 10 minutes. Amplification products were

visualized in transilluminator after 1.5% agarose gel electrophoresis. DNA from *N. caninum* NC1 and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively.

Amplification and sequencing of apicomplexan 18S rRNA

The presence of *Sarcocystis spp* and potentially other apicomplexan were detected by amplification of 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA). Nested PCR of 18S rRNA was performed using the general primers for Apicomplexa, external primers Tg18s48F (5'CCATGCATGTCTAAGTATAAGC-3') and Tg18s359R (5'-GTTACCCGTCCTACTGCCAC-3'), and internal primers Tg18s58F (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC-3') and Tg18s348R (5'-TGCCACGGTAGTCCAATAC-3') [11]. The PCR mix contained 25 mM of external primers or 50 mM of internal primers. It also contained 0.7 U JumpStart Taq DNA Polymerase; 2.5 µl 10X PCR Buffer with MgCl₂, 10 mM dNTP and 50 ng DNA. Amplifications were conducted with initial denaturation for 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 45 seconds at 94°C, 45 seconds at 55°C, 45 seconds at 72°C and a final extension of 3 min at 72°C. Amplification products were visualized in transilluminator after 1.5% agarose gel electrophoresis. Amplification can generate distinct amplicon sizes, such as about 290 bp product for *Sarcocystis neurona*, *N. caninum*, *Hammondia hammondi* and *T. gondii*, and 310 bp for other *Sarcocystis spp*. As this test is not species-specific, the nested-PCR amplicons were subjected to sequencing for genus confirmation. The amplified DNA product was purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and subjected to DNA sequencing by ACTGene - Sequencing Service, Brazil, with internal forward and reverse primers. The sequences obtained were filtered by quality using Staden

Package[12] and the identity of the sequences was confirmed using blastn [13] against the Genbank nucleotide collection. Sequences identified as *Sarcocystis spp* were aligned using MUSCLE [14] and the alignment was visualized in the Genedoc 2.7 [15].

Results and discussion

The most common parasite found in New World primates are nematodes, followed by protozoa. Among primates, *Alouatta* is one of the most studied genera, although parasitological knowledge is still limited. Therefore, parasitologic screenings, both by morphological and molecular analysis, are crucial to improve our understanding in this field. [16]. In this study, we performed molecular detection of three protozoan genus in six different tissues from six brown howler monkeys. All animals were infected by at least one parasite. PCR results are shown in Table 1 and the genetic sequencing analysis is shown in Table 2.

N. caninum DNA was not detected in any of the samples tested in this study (thus, the results were omitted from Table 1). There is little information in the literature about the occurrence and importance of *N. caninum* in primates. However, experimental infection in non-human primates by *Neospora* has been confirmed [17, 18] and a case of natural infection in Night Monkey (*Aotus azarae infulatus*) has been reported [19]. The differential diagnosis is relevant due to the similarity of tachyzoites, the close phylogenetic relationship between *T. gondii* and *N. caninum* [20], and the lack of information on the consequences of neosporosis in primates.

T. gondii DNA was found in one animal (animal 4) with the specific primers and in two (animals 4 and 5) with the 18S rRNA marker. The identity of *T. gondii* sequences was confirmed by blastn. Although, both genes are repeated in the

genome, differences in amplification sensitivity among primers is expected mainly if a low amount of parasite DNA is present in the sample [21, 22].

T. gondii is widespread in the world, affecting man and many warm-blooded animals [23]. In the present study, this parasite was found in two brown howler monkey. New World Monkeys, like howler monkeys, in general, are very susceptible to toxoplasmosis [24–26] and the disease is often acute and fatal [27]. The presence of infected herbivores indicates environmental contamination by oocysts. In the natural environment, wild felids (definitive hosts) cohabit with other animals and may spread *T. gondii* to the wild population [28].

The *T. gondii* genotypic analysis of animal 4 suggested an atypical genotype since different markers indicated distinct genotypes: SAG1 = type 1; SAG3 = type 1; PK1 = type 1; BTUB = type 1; GRA6 = type 1, L358 = type 3. This finding is consistent with previous studies that show a large circulation of atypical genotypes in Brazil, different than what is found in North America and Europe [29–32]. Recently, an outbreak of fatal toxoplasmosis in chickens in Rio Grande do Sul (Brazil) has been reported, and the genotype has been characterized as atypical [33]. An atypical genotype also seems to be responsible for the recent largest Brazilian outbreak of human toxoplasmosis in Santa Maria, Rio Grande do Sul [34]. Moreover, atypical genotype has been reported in primates in Argentina [35].

Sarcocystis spp. DNA was detected in four animals, as could be confirmed by Blastn of the amplified fragment of the 18S rRNA gene. At least two different species of *Sarcocystis* were detected. Sequencing results from animals 1, 2 and 3 showed 99.4% similarity with *S. gigantea* and from animal 6 indicated 99.3% similarity with *S. neurona*. The alignment of the sequences clearly stated the difference in size and composition sequence of animal 6 sequence and the others (76% identity)

(Supplementary figure 1). The 18S rRNA was previously confirmed as a powerful tool for species-specific differentiation of the ovine *Sarcocystis* species [36]. Thus, we can state the presence of *S. gigantea* and *S. neurona* or very closely related species infecting *Alouatta guariba clamitans*.

Sarcocystis spp. has already been detected in many wildlife species and primates may serve as both intermediate and definitive hosts, depending on the species of *Sarcocystis*. There are several reports of *Sarcocystis* spp. cysts found in primates [37–44]; however, to the best of our knowledge, this is the first report of *Sarcocystis* spp. infection in primates in Brazil.

Felids are the definitive hosts of *S. gigantea* and the known intermediate hosts are small ruminants [45] so this is the first report of molecular detection of the species in primates. Macroscopic cysts of *S. gigantea* were previously detected in sheep in southern Brazil [46], confirming the circulation of this protozoan in the region. In the three animals in our study that *S. gigantea* was detected, no cysts were found during necropsy.

Molecular analysis confirmed *S. neurona* in one animal. *Didelphis* sp. opossums are the definitive host of *S. neurona* and several intermediate and/or accidental hosts are known, such as domestic cat, raccoon, seal, otter, armadillo, horses [47]. In horses it causes myeloencephalitis; and this condition has also been reported in a rhesus monkey [48]. Positive serology for *S. neurona* has also been reported in other primates [49].

Alouatta spp. are herbivores, their diet is basically composed of leaves, fruits and flowers [50] thus, they become infected by ingesting oocyst present in water or food contaminated with definitive host feces. Also, geophagy has already been reported in these animals [50] and this habit can increase the contact of animals with

feces contaminated with oocysts. It is important to note that the animals from this study lived in a wild fauna maintainer, in which there were also several other species of animals, including wild felids. This environment may have provided the source of infection for brown howler monkeys.

The natural habitat of howler monkeys is fragmented and, at the same time, cities have expanded, increasing the contact between these animals and humans contributing to the transmission of many diseases [51]. Toxoplasmosis and sarcocystosis are zoonoses; therefore, studies focused on the presence and consequences of these protozoa in primates are important to understand the role of brown howler monkeys in the epidemiology of *T. gondii*, *N. caninum* and *Sarcocystis*.

In conclusion, our analyses detected the presence of *Sarcocystis* spp. and *T. gondii* DNA in samples of brown howler monkeys from the Central Region of Rio Grande do Sul. Even with the small sample size and the lack of information about animals history, our findings are much relevant because it confirms the role of brown howler monkeys as hosts of protozoa with zoonotic potential and also by reinforcing the circulation of atypical *T. gondii* genotypes in southern Brazil. Further studies should be conducted in order to confirm the epidemiological role of *A. guariba clamitans* in the life cycle of these protozoans.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Adl SM, Leander BS, Simpson AGB, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge

- DJ, Mann DG, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Smirnov A V, Spiegel F (2007) Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol* 56:684–9 . <https://doi.org/10.1080/10635150701494127>
2. David Sibley L (2003) Recent origins among ancient parasites. *Vet Parasitol* 115:185–98 . [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00206-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00206-1)
 3. Nunn CL, Altizer SM (2005) The global mammal parasite database: An online resource for infectious disease records in wild primates. *Evol Anthropol Issues, News, Rev* 14:1–2 . <https://doi.org/10.1002/evan.20041>
 4. da Silva AV, de Moraes Gimenes Bosco S, Langoni H, Bagagli E (2006) Study of *Toxoplasma* infection in Brazilian wild mammals: serological evidence in *Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758 and *Euphractus sexcinctus* Wagler, 1830. *Vet Parasitol* 135:81–3 . <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.08.013>
 5. Culot L, Pereira LA, Agostini I, de Almeida MAB, Alves RSC, Aximoff I, Bager A, Baldovino MC, Bella TR, Bicca-Marques JC, Braga C, Brocardo CR, Campelo AKN, Canale GR, Cardoso J da C, Carrano E, Casanova DC, Cassano CR, Castro E, Cherem JJ, Chiarello AG, Cosenza BAP, Costa-Araújo R, Silva NC da, Di Bitetti MS, Ferreira AS, Ferreira PCR, Fialho M de S, Fuzessy LF, Garbino GST, Garcia F de O, Gatto CAFR, Gestich CC, Gonçalves PR, Gontijo NRC, Graipel ME, Guidorizzi CE, Espíndola Hack RO, Hass GP, Hilário RR, Hirsch A, Holzmann I, Homem DH, Júnior HE, Júnior GS-S, Kierulff MCM, Knogge C, Lima F, de Lima EF, Martins CS, de Lima AA, Martins A, Martins WP, de Melo FR, Melzew R, Miranda JMD, Miranda F, Moraes AM, Moreira TC, de Castro Morini MS, Nagy-Reis MB, Oklander L, de Carvalho Oliveira L, Paglia AP, Pagoto A, Passamani M, de Camargo Passos F, Peres CA, de Campos Perine MS, Pinto MP, Pontes ARM, Port-Carvalho M,

- Prado BHS do, Regolin AL, Rezende GC, Rocha A, Rocha JDS, de Paula Rodarte RR, Sales LP, Santos E Dos, Santos PM, Bernardo CSS, Sartorello R, Serra L La, Setz E, de Almeida E Silva AS, Silva LH da, Silva PBE da, Silveira M, Smith RL, de Souza SM, Srbek-Araujo AC, Trevelin LC, Valladares-Padua C, Zago L, Marques E, Ferrari SF, Beltrão-Mendes R, Henz DJ, da Veiga da Costa FE, Ribeiro IK, Quintilham LLT, Dums M, Lombardi PM, Bonikowski RTR, Age SG, Souza-Alves JP, Chagas R, Cunha RGT da, Valença-Montenegro MM, Ludwig G, Jerusalinsky L, Buss G, de Azevedo RB, Filho RF, Bufalo F, Milhe L, Santos MM Dos, Sepulvida R, Ferraz D da S, Faria MB, Ribeiro MC, Galetti M (2019) ATLANTIC-PRIMATES: a dataset of communities and occurrences of primates in the Atlantic Forests of South America. *Ecology* 100:e02525 . <https://doi.org/10.1002/ecy.2525>
6. Moré G, Abrahamovich P, Jurado S, Bacigalupe D, Marin JC, Rambeaud M, Venturini L, Venturini MC (2011) Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet Parasitol* 177:162–5 . <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.036>
 7. Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H (2000) Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30:69–75 . [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00170-8)
 8. Su C, Zhang X, Dubey JP (2006) Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36:841–848 . <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>
 9. SU C, SHWAB EK, ZHOU P, ZHU XQ, DUBEY JP (2010) Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma*

- gondii. *Parasitology* 137:1–11 . <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>
10. Yamage M, Flechtner O, Gottstein B (1996) *Neospora caninum*: Specific Oligonucleotide Primers for the Detection of Brain “Cyst” DNA of Experimentally Infected Nude Mice by the Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Parasitol* 82:272 . <https://doi.org/10.2307/3284160>
 11. da Silva RC, Su C, Langoni H (2009) First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. *Vet Parasitol* 165:332–6 .
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.016>
 12. Staden R, Beal KF, Bonfield JK (2000) The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132:115–30 . <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:115>
 13. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36:W5-9 .
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
 14. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–7 .
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
 15. Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DWI (1997) Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *EMBNEWNEWS* 4:
 16. Solórzano-García B, Pérez-Ponce de León G (2018) Parasites of Neotropical Primates: A Review. *Int J Primatol* 39:155–182 .
<https://doi.org/10.1007/s10764-018-0031-0>
 17. Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG (1994) Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab Invest* 71:236–42

18. Ho MS, Barr BC, Tarantal AF, Lai LT, Hendrickx AG, Marsh AE, Sverlow KW, Packham AE, Conrad PA (1997) Detection of *Neospora* from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. *J Clin Microbiol* 35:1740–5
19. Costa TLC, Iglesias GA, Rosa JMA, Bento HJ, Rondelli LAS, Furlan F, Morgado TO, Dutra V, Corrêa SHR (2018) Detecção molecular de *Neospora caninum* em macaco-da-noite (*Aotus azarae*) de vida livre no estado do Mato Grosso: relato de caso. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 70:1227–1232 .
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9900>
20. Dubey JP, Lindsay DS (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67:1–59 . [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01035-7)
21. Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S (2000) Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:634–44
22. Cresti S, Ciacci C, Donati E, Giordano I, Tordini G, Barberi A (2001) Evaluation of PCR methods for 5S-rDNA and p30 genes to detect *Toxoplasma gondii* in blood and other clinical samples. *New Microbiol* 24:171–4
23. Dubey JP (1986) Toxoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 189:166–70
24. Nery-Guimarães F, Franken AJ (1971) Toxoplasmose em primatas não humanos: II - Tentativas de infecções experimentais em *Macacca mulatta*, *Cebus apella* e *Callithrix jacchus*; e pesquisa de anticorpos em várias espécies de platyrrhinus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 69:97–111 .
<https://doi.org/10.1590/S0074-02761971000200005>
25. Molina CV, Catão-Dias JL, Ferreira Neto JS, Vasconcellos SA, Gennari SM, do Valle RDR, de Souza GO, de Moraes ZM, Vitaliano SN, Strefezzi RDF, Bueno

- MG (2014) Sero-epidemiological survey for brucellosis, leptospirosis, and toxoplasmosis in free-ranging *Alouatta caraya* and *Callithrix penicillata* from São Paulo State, Brazil. *J Med Primatol* 43:197–201 .
<https://doi.org/10.1111/jmp.12112>
26. Santos S V, Strefezzi RF, Pissinatti A, Kanamura CT, Takakura CFH, Duarte MIS, Catão-Dias JL (2014) Detection of *Toxoplasma gondii* in two southern Woolly spider monkeys (*Brachyteles arachnoides*-Geoffroy, 1806) from the Rio de Janeiro primate center, Brazil. *J Med Primatol* 43:125–9 .
<https://doi.org/10.1111/jmp.12093>
27. Epiphanio S, Sinhorini IL, Catão-Dias JL Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. *J Comp Pathol* 129:196–204 .
[https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(03\)00035-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(03)00035-5)
28. Dubey JP, Jones JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 38:1257–78 .
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>
29. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C (2008) Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 38:561–9 .
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>
30. Dubey JP, Su C (2009) Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:190–5 .
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000200011>
31. Silva LA, Andrade RO, Carneiro ACA V., Vitor RWA (2014) Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. *PLoS One* 9:e90237 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090237>

32. SHWAB EK, ZHU X-Q, MAJUMDAR D, PENA HFJ, GENNARI SM, DUBEY JP, SU C (2014) Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141:453–461 .
<https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>
33. Vielmo A, Pena HFJ, Panziera W, Bianchi RM, De Lorenzo C, Oliveira S, Alves BF, Gennari SM, Pavarini SP, de Barros CSL, Driemeier D (2019) Outbreak of toxoplasmosis in a flock of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). *Parasitol Res* 118:991–997 .
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06233-w>
34. Minuzzi CE, Portella LP, Bräunig P, Sangioni LA, Ludwig A, Ramos LS, Pacheco L, Silva CR, Pacheco FC, Menegolla IA, Farinha LB, Kist PP, Breganó RM, Nino B de SL, Cardoso Martins FD, Monica TC, Ferreira FP, Britto I, Signori A, Medici KC, Freire RL, Garcia JL, Navarro IT, Difante CM, Flores Vogel FS (2020) Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. *PLoS One* 15:e0228442 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228442>
35. Pardini L, Dellarupe A, Bacigalupe D, Quiroga MA, Moré G, Rambeaud M, Basso W, Unzaga JM, Schares G, Venturini MC (2015) Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). *Parasitol Int* 64:587–590 .
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.08.009>
36. Heckerth AR, Tenter AM (1999) Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep. *Int J Parasitol* 29:1331–49 . [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00111-3](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00111-3)

37. Mandour AM (1969) *Sarcocystis nesbitti* n. sp. from the rhesus monkey. *J Protozool* 16:353–4 . <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02281.x>
38. Karr SL, Wong MM (1975) A survey of *Sarcocystis* in nonhuman primates. *Lab Anim Sci* 25:641–5
39. Mehlhorn H, Heydorn AO (1978) The sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure. *Adv Parasitol* 16:43–91 .
[https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60572-2](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60572-2)
40. Kan SP, Prathap K, Dissanaiké AS (1979) Light and electron microstructure of a *Sarcocystis* sp. from the Malaysian long-tailed monkey, *Macaca fascicularis*. *Am J Trop Med Hyg* 28:634–42
41. Hernández-Jáuregui P, Silva-Lemoine E, Girón-Rojas H A case of sarcocystic myocarditis in a rhesus monkey. Light and electron microscopic study. *Arch Invest Med (Mex)* 14:139–44
42. Kimura T, Ito J, Suzuki M, Inokuchi S (1987) *Sarcocystis* found in the skeletal muscle of common squirrel monkeys. *Primates* 28:247–255 .
<https://doi.org/10.1007/BF02382574>
43. Yang Z-Q, Wei C-G, Zen J-S, Song J-L, Zuo Y-X, He Y-S, Zhang H-F, Attwood SW, Chen X-W, Yang G-C, Zhou X, Quan X, Li C-Y, Han D, Liu A-W, Lin P (2005) A taxonomic re-appraisal of *Sarcocystis nesbitti* (Protozoa: Sarcocystidae) from the monkey *Macaca fascicularis* in Yunnan, PR China. *Parasitol Int* 54:75–81 . <https://doi.org/10.1016/j.parint.2004.12.004>
44. Lane JH, Mansfield KG, Jackson LR, Diters RW, Lin KC, MacKey JJ, Sasseville VG (1998) Acute fulminant sarcocystosis in a captive-born rhesus macaque. *Vet Pathol* 35:499–505 .
<https://doi.org/10.1177/030098589803500604>

45. Levine ND, Tadros W (1980) Named species and hosts of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *Syst Parasitol* 2:41–59 .
<https://doi.org/10.1007/BF00015094>
46. Minuzzi CE, Cezar AS, Bräunig P, Portella LP, Rodrigues F de S, Sangioni LA, Vogel FSF (2019) Occurrence of *Sarcocystis gigantea* macrocysts and high frequency of *S. tenella* microcysts in sheep from southern Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 15:100256 . <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.12.002>
47. Elsheikha HM (2009) Has *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Sporozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae) cospeciated with its intermediate hosts? *Vet Parasitol* 163:307–314 . <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.019>
48. Anderson DC, Dubey JP, Klumpp SA, McClure HM (1994) Encephalomyelitis Due to a *Sarcocystis Neurona*-Like Protozoan in a Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*) Infected with Simian Immunodeficiency Virus. *Am J Trop Med Hyg* 51:332–338 . <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.332>
49. Yabsley MJ, Jordan CN, Mitchell SM, Norton TM, Lindsay DS (2007) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis neurona*, and *Encephalitozoon cuniculi* in three species of lemurs from St. Catherines Island, GA, USA. *Vet Parasitol* 144:28–32 .
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.020>
50. BICCA-MARQUES, J. C.; CALEGARO-MARQUES C (1994) Feeding behavior of the black howler monkey (*Alouatta caraya*) in a seminatural forest. *Acta Biol Leopoldensia* 16:69–84
51. Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg Infect Dis* 4:149–58 . <https://doi.org/10.3201/eid0402.980202>

Table 01. Results of PCR for detection of *T. gondii* marker and 18S rRNA gene.

Animals	<i>T. gondii</i> marker						18S rRNA gene					
	Heart	Brain	Liver	Spleen	Intestine	Lung	Heart	Brain	Liver	Spleen	Intestine	Lung
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
4	+	NA	+	-	-	+	+	NA	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Note: NA Tissue not available; + Positive; - Negative.

Table 02. Result of blastn searches of sequenced samples. Only the first hit is shown.

Animals/sample	ID	Species	Coverage/Identity (%)
1/brain	MK420020.1	<i>Sarcocystis gigantea</i> isolate OS13	100/99.4
2/heart	MK420020.1	<i>Sarcocystis gigantea</i> isolate OS13	100/99.4
3/brain	MK420020.1	<i>Sarcocystis gigantea</i> isolate OS13	100/99.4
4/heart	KX008033.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Tg10	100/100
5/heart	KX008033.1	<i>Toxoplasma gondii</i> isolate Tg10	100/100
6/brain	AH009986.2	<i>Sarcocystis neurona</i>	100/99.3

Supplementary figure 1:

Supplementary Figure 1: Alignment of *Sarcocystis* spp. sequences amplified from different samples.

```

An6_Brain : AATACAGTACCGTCGAAAGCTGATAGGTCAGAAACTTGAATGATCCTATCGCCGACC----AAAAGGCCATA----ATG : 70
An1_Brain : AATACAGTACCGTCGAAAGCTGATAGGTCAGAAACTTGAATGATCCTATCGCCCAATCACCAGAAATGATTATAATATGATG : 79
An2_Heart : AATACAGTACCGTCGAAAGCTGATAGGTCAGAAACTTGAATGATCCTATCGCCCAATCACCAGAAATGATTATAATATGATG : 79
An3_Brain : AATACAGTACCGTCGAAAGCTGATAGGTCAGAAACTTGAATGATCCTATCGCCCAATCACCAGAAATGATTATAATATGATG : 79
AATACAcTACCGTCGAAAGCTGATAGGTCAGAAACTTGAATGATCtATCGCCaAtCaccgAAAtGatTATAaatgATG

0          *          100         *          120          *          140          *          1
An6_Brain : CGATCCGTTTCGGTTACTATGAATCACCTG-----AGGACCACCCGAAAGGTGG-----GTTGGTTCGTAT : 130
An1_Brain : CGATCCGTTTCGGTTACTATGAATCACCTTCTCTTTTGACACCACCACPARAAAGTGATGGCGCACTGTTGGTTCGTAT : 158
An2_Heart : CGATCCGTTTCGGTTACTATGAATCACCTTCTCTTTTGACACCACCACPARAAAGTGATGGCGCACTGTTGGTTCGTAT : 158
An3_Brain : CGATCCGTTTCGGTTACTATGAATCACCTTCTCTTTTGACACCACCACPARAAAGTGATGGCGCACTGTTGGTTCGTAT : 158
CGATCCGTTTCrGTTACTATGAATCACCTTctc tttgacAccACCACta AAaGTGatggcgcactGTTGGTTCGTAT

60          *          180          *          200          *          220          *
An6_Brain : CTAATAAACACTACCTTCCACGAGGGAAGA-----GGCATTGTGCGCATGTATTAGCCATAGAATTACCACGG : 198
An1_Brain : CTAATAAACACTACTGTACAAATCATAAATAATATGATTATACAGTATTGTGCGCATGTATTAGCCATAGAATTACCACGG : 237
An2_Heart : CTAATAAACACTACTGTACAAATCATAAATAATATGATTATACAGTATTGTGCGCATGTATTAGCCATAGAATTACCACGG : 237
An3_Brain : CTAATAAACACTACTGTACAAATCATAAATAATATGATTATACAGTATTGTGCGCATGTATTAGCCATAGAATTACCACGG : 237
CTAATAAACACTACTgTaCaAtcAtaatAaAtatgattatacaGtAtTGTGCGCATGTATTAGCCATAGAATTACCACGG

240          *          260          *          280          *          300          *
An6_Brain : TTATCCATGTAGTAAA---GACCATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTTCGCAGTTTCGCCGTATAAAA : 272
An1_Brain : TTATCCATGTAGTAAAAATCGACTATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTTCGCAGTTTCGCCGTATAAAA : 315
An2_Heart : TTATCCATGTAGTAAAAATCGACTATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTTCGCAGTTTCGCCGTATAAAA : 315
An3_Brain : TTATCCATGTAGTAAAATCGACTATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTTCGCAGTTTCGCCGTATAAAA : 315
TTATCCATGTAGTAAAaatcGACTATCAAATAAACTATAACTGTTTTAATGAGCCATTTCGCAGTTTCGCCGTATAAAA

```

Note: The order of samples is: animal 6/ brain, animal 1/Brain, animal 2/heart and animal 3/brain. Polymorphic positions were identified in the sequences from animals 1 and 2 (position 90, R= A or G; position 129, R= A or G) and animal 3 (position 90, R= A or G; position 112, Y= C or T).

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Foi possível a detecção de DNA de protozoários apicomplexa em amostras dos seis animais testados, sendo *Sarcocystis* spp. em quatro animais e *T. gondii* em dois animais;

- Não foi encontrado DNA de *N. caninum* nas amostras de bugio ruivo testadas;

- A classificação genotípica de *T. gondii* sugere a presença de genótipo atípico em bugios da Região Central do Rio Grande do Sul;

- Os resultados encontrados ressaltam a importância de trabalhos envolvendo esses protozoários em primatas no Brasil.

REFERÊNCIAS

ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; JIMENEZ, N. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental Parasitology**, v.122, n.3, p.203-207, 2009.

ARAUJO, W. N. et al., Toxoplasmose: uma zoonose – realidades e riscos. **Cães e Gatos**. v.79, n.1, p. 20-27, 1998.

AURICCHIO, P. Primatas do Brasil. São Paulo: **Terra Brasilis**. 1995. 168p.

BABAEI, Z. et al. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. **Experimental Parasitology**. V.128, p.159–162, 2011.

BARR, B. C. et al. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p.236-242, 1994.

BAUM, J. et al. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. **Trends Parasitology**. V.24, n.12, p.557–563, 2008.

BENNETT, B.T.; ABEE, C.R.; HENRICKSON, R. Nonhuman Primates in biomedical research. **Biological and Management. Academic Press**, Inc. p. 341-410, 1995.

BICCA-MARQUES, J. C.; CALEGARO-MARQUES, C. Ecologia alimentar do gênero *Alouatta* LACÉPEDE, 1799 (PRIMATES, CEBIDAE). **Cadernos UFAC**, v.3, p.23-49, 1995.

BJERKAS, L.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 70, n. 2, p. 271- 274, 1984.

BOUER, A. et al. Outbreak of toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. **Folia Primatologica**, v.70, n.5, p.282–285, 1999.

BRÄUNIG, P. et al. DNA extraction methods and multiple sampling to improve molecular diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle hearts. **Parasitology Research**. v.115, n.10, p.3913–3921, 2016.

CHIARELLO, A. G.; GALETTI, M. Conservation of the brown-howler monkey in south-east Brazil. **Oryx**, v. 28, n. 1, p. 37-42, 1994.

CORLISS, J. O. An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**. v. 33, p. 1-51, 1994.

COSTA, T. L. C. et al. Detecção molecular de *Neospora caninum* em macaco-da-noite (*Aotus azarae*) de vida livre no estado do Mato Grosso: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.70, n.4, p.1227-1232, 2018.

CUNNINGHAM, A. A.; BUXTON, D.; THOMSON, K. M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Comparative Pathology**, v.107, n.2, p.207–219, 1992.

DA SILVA ET AL. Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild animals in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.20,n.41, 2014.

DA SILVA, R. C.; SU, C; LANGOI, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moule´ , 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**. V.165, n.3-4,p.332–336, 2009.

DASZAK, P., CUNNINGHAM, A.A., HYATT, A.D. Emerging infectious disease of wildlife - Threats to biodiversity and human health. **Science**. V.287, p.443-449, 2000.

DOMENIS, L. et al. Detection of a morphogenetically novel *Sarcocystis hominis*-like in the context of a prevalence study in semi-intensively bred cattle in Italy. **Parasitology Research**. v. 109, p. 1677–1687, 2011.

DUBEY J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.) **Parasitic protozoa**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1992. cap. 1, p. 1 - 131.

DUBEY, J. P. et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.9., p.1269-1285, 1988.

DUBEY, J. P. et al. Neosporosis in animals. Boca Raton: **CRC Press**; 1. Ed. 2017.

DUBEY JP, SPEER CA, FAYER R. Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton (FL): **CRC Press**; 1989.

DUBEY, J. P. A review of Sarcocystis of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n.10, p. 1061-1078, 1976.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n.2, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of Toxoplasma gondii. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, n.8, p.1160–1163, 1999.

DUBEY, J. P. Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. **Korean Journal Parasitology**, v.41, n.1, p.1-16, 2003.

DUBEY, J. P. Sarcocystis peromysci n. sp. and S. idahoensis in deer mouse (Peromyscus maniculatus) in Montana. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, n. 5, p. 1180-1182, 1983.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis of animals and humans, 2. ed. Boca Raton:**CRC, Press**, p. 1-318, 2009.

DUBEY, J.P. et al. Neonatal Neospora caninum infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, p.1259-1263, 1988.

DUBEY, J.P. et al. Toxoplasma gondii isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The Journal of Parasitology**, v.89, p.851-853, 2003.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**. V.22, n.3, p.645-671, 2006.

DUBEY, J. P. et al Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. V.139, n. 11, p.1375–1424, 2012.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of Animals and Man. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 1988.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States. **International Journal of Parasitology**. v.38, n.11, p.1257-78, 2008.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of Neospora caninum and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p. 1–59, 1996.

DUBEY, J. P. et al. A review of Sarcocystis neurona and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**. v. 95, p. 89–131, 2001.

EPIPHANIO, S., et al. Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.31, p.231–235, 2000.

EPIPHANIO, S., et al. Toxoplasmosis in a wild caught Black Lion Tamarin (*Leontopithecus chrysopygus*). **Veterinary Record**, v.149, p.627–628, 2001.

EPIPHANIO, S.; SINHORINI, I. L.; CATÃO-DIAS, J. L. Pathology of Toxoplasmosis in Captive New World Primates. **Journal Comparative Pathology** V.129, P.196–204, 2003.

FERREIRA, I. M., et al. Toxoplasma gondii: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR–RFLP markers. **Experimental Parasitology**. v.118, p.221–227, 2008.

FIALHO, C. G.; ARAUJO, F. A. P. Detecção de anticorpos para Toxoplasma gondii em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n.5 p. 893-897, 2003.

FRENKEL, J. K. et al. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**. v. 167, p. 893-896, 1970.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis. Mechanisms of infection, laboratory diagnosis and management. **Current Topics in Pathology**. v. 54, p. 29-75, 1971.

FRENKEL, J. K: Sarcocystosis. In: **Pathology of Infectious Diseases**. 1997.

GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná - Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n.1, p. 91-97, 1999.

GILBERT, K.A. Parasitic infection in red howling monkeys in forest fragments. **Neotropical Primates**. v.2, n.2, p.10-12, 1994.

GILBERT, R.E., et al., Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.8, p.277, 2008.

GJERDE, B. Molecular characterisation of *Sarcocystis bovifelis*, *Sarcocystis bovini* n. sp., *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis cruzi* from cattle (*Bos taurus*) and *Sarcocystis sinensis* from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Parasitology Research** v.115, p.1473–1492, 2016.

GONDIM, L. F. P. et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.34, n.2, p.159-161, 2004.

GONDIM, L. F. P. *Neospora caninum* in wildlife. **TRENDS in Parasitology**. V.22, N.6, 2006.

GONZALEZ, L. M, et al., Differential molecular identification of Taeniid spp. and *Sarcocystis* spp. cysts isolated from infected pigs and cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 95–101, 2006.

GREINERT, J.A. et al. Levantamento de parasitos intestinais de bugios-ruivos, *Alouatta guariba clamitans*, mantidos em cativeiro no Centro de Pesquisas

Biológicas de Indaial, Santa Catarina. **A Primatologia no Brasil**. Porto Alegre, RS. In: J. C. Bicca- Marques (ed.). 2007.

GUBBELS, M. J; DURAISINGH, M. T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **International Journal Parasitology** v.42, n.12, p. 1071–1081, 2012.

GUÇLU, F. et al., Differential identification of cattle *Sarcocystis* spp. by random amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.155, p.440-444, 2004.

HECKEROTH, A. R., TENTER, A. M., Comparison of immunological and Molecular Methods for the Diagnosis of Infections Pathogenic *Sarcocystis* species in Sheep. **Tokai journal of experimental and clinical medicine**, v.23, n. 6, p.293-302, 1999.

HERNANDEZ-JUAREGUI, P.; SILVA-LEMOINE, E.; GIRON-ROJAS, H. A case of sarcocystic myocarditis in a rhesus monkey: light and electron microscopic study. **Archive Investigation Medicine (Mex)** v.14, p.139-144, 1983.

HESSLER, J. R.; WOODARD, J. C.; TUCEK, P. C. Lethal toxoplasmosis in a woolly monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.159, n.11 p.1588–1594, 1971.

HILL, D.; DUBEY, J.P., *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection** v.8, n.10, p.634-40, 2002.

HIRANO, Z.M.B. et al. Comportamento e hábitos dos bugios (*Alouatta fusca*, Primata, Cebidae), do Morro Geisler (Indaial, SC, Brasil). **Dynamis Blumenau**. v.5, n.19, p.19-47, 1997.

HIRSCH A. et al. Estudo comparativo das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (Platyrrhini, Atelidae) e sua distribuição geográfica na América do Sul. In: Rylands, A. B.; Bernardes, A. T. (Org.). **A Primatologia no Brasil**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1991. p. 239–262.

HO, M.S.Y. et al. Detection of *Neospora* from tissues of experimentally infected Rhesus Macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1740-1745, 1997.

HOMAN, W. L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELEER, J. D.; 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. 30, p. 69-75, 2000.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D., *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infection Disease**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

KAN, S. P.; PRATHAP, K.; DISSANAIKE, A.S. Light and electron microstructure of a *Sarcocystis* sp. from the Malaysian long-tailed monkey *Macaca fascicularis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V.28, n.4, p.634– 42, 1979.

KARR JR SL, WONG MM. A survey of *Sarcocystis* in nonhuman primates. **Laboratory Animal Science** v.25, n.5, p.641– 645, 1975.

KHAN, A. et al., Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. **Genome Research**, v. 16, p. 1119-1125, 2006.

KIJLSTRA, A. et al. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 183-190, 2008.

KIMURA, T.; SUZUKI, J. M.; INOKUCHI, J. *Sarcocystis* Found in the Skeletal Muscle of Common Squirrel Monkeys. **Primates**. v.28, n.2, p.247-255, 1987.

KING, J. S. et al. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. V.40, n.8, p.945–950, 2010.

LANE JH, MANSFIELD KG, JACKSON LR, DITERS RW, LIN KC, MACKAY JJ, SASSEVILLE VG. Acute fulminant sarcocystosis in a captive-born rhesus macaque. **Veterinary Pathology** v.35: p.499-505, 1998.

LIN, M. et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4121-4125, 2000.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P.; DUNCAN, R. B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, n. 82, p. 327-333, 1999.

LOPES, C. W. G., O gênero *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882) (apicomplexa: sarcocystidae), uma questão a ser reavaliada no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13.p.14-16, 2004.

MANDOUR, A. M. *Sarcocystis nesbitti* n.sp. from the rhesus monkey. **Journal of Protozoology** v.16, p.353–354, 1969.

MCALLISTER, M. M. et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, n.9, p.1473-1478, 1998.

MEHLHORN, H.; HEYDORN, A. O. Sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure. **Advances in Parasitology**. V.16, p.43– 92, 1978.

MENDES, S. L. Estudo ecológico de *Alouatta fusca* (Primates: Cebidae) na Estação Biológica de Caratinga, MG. **Revista Nordestina de Biologia**. V.6, n.2, p.71-104, 1989.

MENDES, S.L. et al. 2008. *Alouatta guariba*. In: IUCN (Ed.), 2015 **IUCN Red List of Threatened Species**, version 2010.2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39916A10284881.en>. Acesso em 30 de dezembro de 2019.

MILTON, K. The foraging strategy of Howler Monkeys a study in Primate economics. **Columbia University Press**, 1980, 165p.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. V.12, p.1965-1976, 2004.

MORÉ, G. et al. Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. **Veterinary Parasitology**,v.197, p.85– 94. 2013.

NANTAVISAI, K. et al.Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.581–583, 2007.

NASCIMENTO, C. O. M. et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* DNA in brain tissue from hoary foxes (*Pseudalopex vetulus*) in Brazil. **Acta Tropica** v.146, p.60-65, 2015.

NEVILLE, M. K. et al. The Howling Monkeys, Genus *Alouatta*. p. 349-453. In: MITTERMEIER, R. A., A. B. RYLANDS, A.. COIMBRA-FILHO & G. A. B. FONSECA (eds.). **Ecology and Behavior of Neotropical Primates** v. 2. Washington, DC, World Wildlife Fund, 1988, 610p.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 148, p. 369-372, 1909.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L., Sur une infection à corps de Leishman (ou organism voisins) du *gondi*. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris.**, v. 147, p. 736-766, 1908.

PARÉ, J. et al. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.60, n.2, p.133-139, 1996.

PENA, H.F.J. et al., Population structure and mousevirulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.5, p.561-569, 2008.

PESCADOR C. A. et al. Perdas reprodutivas associadas com infecção por *Toxoplasma gondii* em caprinos no sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.27, n.167-171, 2007.

PIERGILI, F.D. Problems and limitations of conventional and innovative methods for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. **Parasitologia**, v.46, p.177-181,2004.

PRINTES, R. C. et al. *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940: a new southern limit for the species and for Neotropical primates. **Neotropical Primates**, v. 9, p. 118-121, 2001.

RIBEIRO, S.; BICCA-MARQUES, J. C. Características da paisagem e sua relação com a ocorrência de bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans*, Cabrera, 1940; Primates, Atelidae) em fragmentos florestais no Vale do Taquari, RS. **Natureza e Conservação**, v. 3, n. 2, p. 65- 78, 2005.

ROMMEL, M. Sarcocystosis of domestic animals and humans. **In Practice**. v. 7, n. 5, p. 158-160, 1985.

RUAS, J.L. et al., Prevalência de Sarcocystis spp. (LANKESTER, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7 n 3, p.227-230, 2001.

RYLANDS, A. B. et al. An assessment of the diversity of new world monkeys. **Neotropical Primates**, v. 8, p. 61-93, 2000.

SANTA CRUZ, A. et al. Habitat Fragmentation and Parasitism in Howler Monkeys (*Alouatta caraya*). **Neotropical Primates**. v.8, n.4, p. 146-148, 2000.

SANTOS, I. B. et al. The distribution and conservation status of primates of southern Bahia, Brazil. **Primate Conservation**, v. 8, p. 126–142, 1987.

SARTOR, I. F. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros e de corte da região de Presidente Prudente, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.4, p.413-418, 2005.

SERIO-SILVA, J. C. et al. Mapping primate populations in the Yucatán peninsula, México: a first assessment. In.: ESTRADA, A.; GARBER, P. A.; PAVELKA, M.; LUECKE, L. (Ed.). *New Perspectives in The Study of Mesoamerican Primates: distribution, ecology, behavior and conservation*. New York: **Springer**, 2005, p. 489-511.

SINGH, B., Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v.27, p.1135-1145, 1997.

SOUSA, W.; BELFORT, J., RUBENS, J. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. Editora **FIOCRUZ**: Rio de Janeiro. 2014. 214p.

SPLENDRE, A. Un nuovo protooz parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'umo. Nota prelininare pel, **Revista Social Ciência e Medicina**, v. 03, p. 109, 1908.

STUART, M.D.; STRIER, K.B. Primates and Parasites: A Case for a Multidisciplinary Approach. **Internaciolal Journal of Primatology**, v.16, n.4, p.111-11, 1995.

TENTER, A.M. et al. Toxoplasma gondii: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

TENTER, A. M. Current research on Sarcocystis species of domestic animals. **International Journal of Parasitology**. V.25, p.1311-1330, 1995.

TRUPPEL J. H. et al. Detection of Neospora caninum DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitology International** .v.59,n.3, p.376-379, 2010.

VON BRACK, M.; WOHLSEIN, P.; KAUP, F. J. Toxoplasmosis in non-human primates. **Verhandlungsbericht des Internationalen Symposium uber die Erkrankungen der Zootiere**, v.37, p.183–188, 1995.

WOODS, L.W. et al. Systemic neosporosis in a California blacktailed deer (Odocoileus hemionus columbianus). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. V.6, n.4, p.508–510, 1994.

WOUDA, W.; SNOEP, J. J.; DUBEY, J. P. Eosinophilic Myositis due to Sarcocystis hominis in a Beef Cow. **Journal of Comparative Pathology** v.135, n.4,p.249-253,2006.

YAMAGE, M. et al. Neospora caninum: specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v.82, p.272-279, 1996.

YANG, Z. et al. A taxonomic re-appraisal of Sarcocystis nesbitti (Protozoa: Sarcocystidae) from the monkey Macaca fascicularis in Yunnan, PR China. **Parasitology International**. v.54, n.1, p.75– 81, 2005.

YANG, Z.Q. et al. Characterization of Sarcocystis species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation in the 18S rRNA gene: a cost- effective and simple technique or routine species identification. **Experimental Parasitology**. V.102, n.3-4, p. 212–217, 2002.