HILDA FÁTIMA DE JESUS PENA

**Isolamento e caracterização biológica e genotípica de
Toxoplasma gondii (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do
estado de São Paulo**

São Paulo
2004

HILDA FÁTIMA DE JESUS PENA

**Isolamento e caracterização biológica e genotípica de
Toxoplasma gondii (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do
estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari

São Paulo
2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1430 FMVZ	<p>Pena, Hilda Fátima de Jesus</p> <p>Isolamento e caracterização biológica e genotípica de <i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo / Hilda Fátima de Jesus Pena. – São Paulo : H. F. J. Pena, 2004.</p> <p>126 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.</p> <p>1. <i>Toxoplasma gondii</i>. 2. Isolados. 3. Genótipos. 4. Caracterização. 5. Molecular. 5. Gatos. I. Título.</p>
-----------------	--

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* em gatos no Estado de São Paulo, Brasil", protocolo nº295/2003, utilizando 355 camundongos, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun" da Comissão de Bioética.

(We certify that the Research "Isolation and biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from cats from São Paulo State, Brazil", protocol number 295/2003, utilizing 355 mice, under the responsibility of Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun" meeting.)

São Paulo, 22 de outubro de 2004

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome do autor: PENA, Hilda Fátima de Jesus

Título: Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

*À memória de meu pai e a minha
mãe:*

Ouro de mina.

Ao Fernando:

Que foi tudo para mim

Quando eu mais precisei,

Que me envolveu completamente de amor

Quando eu mais precisei.

A você, meu amor.

À vida:

Por sua beleza,

Por sua generosidade.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela confiança no meu trabalho, pela amizade e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Rodrigues Martins Soares pela paciência em ensinar os fundamentos da biologia molecular e, principalmente, pela amizade e pelo bom humor.

Aos médicos veterinários Paulo Eduardo Garcia Costa, Andréa M. Andrade, Pedro Henrique Candini, Rita de Cássia Maria Garcia, Lúcia Eiko, Leandro Boca, Luís Flávio Vani Amaral, Rafael Dhosualdo, Helder Tambellini, às técnicas Ana Nery e Silvana e à Marinalva, pela ajuda na obtenção dos felinos e na colheita de material. Sem eles, este trabalho realmente não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain pela atenção e disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (VPS-USP) para a realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Amaku pela realização da análise estatística.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Aos amigos Silvio e Alessandra pela agradável convivência e incentivo.

À amiga Adriana Cortez pelo apoio, sugestões e ajuda no seqüenciamento de amostras.

Ao Sr. Renato Caravieri, técnico do laboratório de Doenças Parasitárias, pelo auxílio neste trabalho, mas, principalmente, pela amizade e convívio em todos esses anos.

À médica veterinária residente Daniela Pontes Chiebao pelo auxílio neste trabalho e agradável convivência.

Aos estagiários Rafael, Michael, Ana, Micaela e Felipe pela ajuda neste trabalho e pelo convívio.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ/USP, pela atenção e pela ajuda com as normas bibliográficas.

A todos os funcionários, estagiários e colegas que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho.

À D. Isolina e ao Sr. Luís pelo acolhimento e carinho nesses anos.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). Processo n. 2003/02069-6.

*“O caminho para a sabedoria
Bem, é direto e simples de expressar:
errar,
errar
e errar novamente...
Mas menos,
menos
e menos...”*

Piet Hein

RESUMO

PENA, H. F. J. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo.** [Isolation and biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* (Nicolle; Manceaux, 1909) from cats from São Paulo state, Brazil]. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O *Toxoplasma gondii* apresenta uma estrutura populacional clonal. A análise genotípica do *locus SAG2* foi realizada para determinar a ocorrência de diferentes linhagens de *T. gondii* (tipos I, II e III) em gatos domésticos. Amostras de soro de 237 gatos de 15 municípios no estado de São Paulo foram testadas para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* através do teste de aglutinação modificado (MAT). Anticorpos ($\text{MAT} \geq 25$) foram encontrados em 84 (35,4%) dos 237 gatos. Com os tecidos (cérebro, coração, língua e musculatura esquelética) de 71 gatos positivos foram realizados bioensaios em camundongos (cinco camundongos por grupo) sendo obtidos 47 isolados. A análise de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP) sobre produtos do *locus SAG2* amplificados pela PCR revelou que 34 isolados (72,4%) eram do tipo I, 12 (25,5%) eram do tipo III e um (2,1%) apresentava infecção mista (tipo I e tipo III). Não houve isolado do tipo II. A maioria dos isolados do tipo I (23/34) causou o óbito de todos os camundongos infectados e a maioria dos isolados do tipo III (7/12) não levou ao óbito nenhum camundongo infectado. Foram encontrados cistos no cérebro dos camundongos infectados em todos os 47 isolados. A determinação genotípica também foi feita diretamente das amostras primárias dos gatos (homogeneizados de tecidos) usando a *nested*-PCR-RFLP. A caracterização do *locus SAG2* foi bem sucedida em 80,4% (37/46) das amostras testadas. Os genótipos obtidos das amostras primárias foram idênticos aos dos isolados correspondentes. O genótipo misto foi confirmado pelo seqüenciamento direto de DNA dos produtos da PCR obtidos do isolado e da amostra primária do gato. Amostras dos cinco camundongos infectados com este isolado foram seqüenciadas. Três camundongos se infectaram com o genótipo tipo III, um com o genótipo tipo I e o outro com o genótipo misto, demonstrando que infecções mistas podem originar diferentes padrões de infecção em um hospedeiro.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Isolados. Genótipos. Caracterização. Molecular. Gatos.

ABSTRACT

PENA, H. F. J. **Isolation and biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from cats (Nicolle; Manceaux, 1909) from São Paulo state, Brazil.** [Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo]. 2004. 126 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Toxoplasma gondii has a clonal population structure. Genotypic analysis of the *SAG2* locus was performed to determine the occurrence of the different lineages of *T. gondii* (types I, II and III) in domestic cats. Antibodies to *T. gondii* were determined in serum samples of 237 cats from 15 counties in São Paulo state, Brazil, by the modified agglutination test (MAT). Antibodies (MAT $\geq$ 25) were found in 84 (35.4%) of 237 cats. Tissues (brain, heart, tongue and skeletal muscle) of 71 of the positive cats were bioassayed in mice (five mice per group). Forty-seven isolates were obtained. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in PCR-amplified *SAG2* products revealed that 34 isolates (72.4%) were type I, 12 (25.5%) were type III and one (2.1%) was mixed with type I and type III. There was no type II isolate. Most of the type I isolates (23/34) killed all infected mice and most of the type III isolates (7/12) killed no infected mice. Tissue cysts were found in mice infected with all 47 isolates. The genotype determination was also made directly from primary samples from cats (tissue homogenates) using nested-PCR-RFLP analysis. Characterization of the *SAG2* locus was successful in 80.4% (37/46) of the samples tested. Genotypes obtained from primary samples were the same as those from the corresponding isolates. The mixed genotype was confirmed by direct DNA sequencing of PCR products from the isolate and from the cat primary sample and samples from the five mice infected with this isolate were sequenced. Three had type III genotype, one had type I, and one had type I + type III, demonstrating that mixed infections can originate different patterns of infection in a host.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Isolates. Genotypes. Characterization. Molecular. Cats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema representativo do *locus SAG2* mostrando a localização dos “primers” usados na *nested-PCR* para amplificação de fragmentos nas regiões 5’ e 3’ do *locus* e os sítios polimórficos de restrição usados para identificação dos genótipos de *Toxoplasma gondii*. Adaptado de Howe et al. (1997). 57
- Figura 2 – Mapa do estado de São Paulo indicando a localização de 11 municípios e o número correspondente de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – VPS - FMVZ - USP. 71
- Figura 3 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5’ com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3’ com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números dos gatos correspondentes aos isolados. C=cérebro; P= pulmão. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas)..... 76
- Figura 4 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5’ com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3’ com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números dos gatos correspondentes aos isolados. C=cérebro; P= pulmão. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras 513C e 514C (gato 257) exibem padrões de digestão parcial ou infecção mista (tipo I e tipo III) e de genótipo tipo I, respectivamente. 77

- Figura 5 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem do isolado de *Toxoplasma gondii* obtido do gato 257. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos. C=cérebro. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). As amostras 511C, 513C e 515C exibem padrões de digestão parcial ou infecção mista (tipo I e tipo III), a amostra 512C exhibe padrão de genótipo tipo III e a amostra 514C exhibe padrão de genótipo tipo I. 78
- Figura 6 – nPCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente a partir de amostras clínicas de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos gatos. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). 79
- Figura 7 – nPCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente a partir de amostras clínicas de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos gatos. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras dos gatos 177 e 178 exibem padrões de digestão parcial ou de infecção mista (tipo I e tipo III). 80
- Figura 8 – nPCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente de amostras clínicas do gato 257 (alíquotas A-E). (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras 257A, C e D exibem padrões de genótipo tipo III, a amostra 257B exhibe padrão de infecção mista (tipo I e tipo III) e a amostra 257E exhibe padrão de genótipo tipo I. 81

- Figura 9 – Análise de seqüências de DNA de produtos da PCR do fragmento 5' do *locus SAG2*, para genotipagem do isolado de *Toxoplasma gondii* do gato 257 obtido em camundongos. As setas indicam a localização do sítio polimórfico. (A) amostra 514: genótipo tipo I, sem sítio de restrição para a enzima *Sau3AI* (GATT). (B) padrão das amostras 512, 513 e 515: genótipo tipo III, com sítio de restrição para a enzima *Sau3AI* (GATC); (C) amostra 511: genótipo misto (tipo I e tipo III), com presença de dois picos no sítio de polimorfismo (bases Citosina e Timidina), que o programa reconhece como "N". Seqüenciamento: ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). 83
- Figura 10 – Análise de seqüências de DNA de produtos da PCR do fragmento 5' do *locus SAG2*, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* de amostras clínicas do gato 257. As setas indicam a localização do sítio polimórfico. (A) 257B: o programa reconheceu a base Citosina no sítio de polimorfismo, mas é evidente a presença de um pico com a base Timidina, caracterizando um genótipo misto (tipo I e tipo III). (B) 257E: o programa reconheceu a base Timidina no sítio polimórfico, mas é evidente a presença de um pico com a base Citosina, caracterizando um genótipo misto (tipo I e tipo III). Seqüenciamento: ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). 84
- Figura 11 – Mapa do estado de São Paulo indicando a localização de 11 municípios e o número correspondente de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados, segundo o genótipo no *locus SAG2*. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – VPS - FMVZ – USP. 87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Proporção de gatos soropositivos para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , segundo o sexo e faixa etária. São Paulo, 2004.....	68
Gráfico 2 – Porcentagem de isolamentos de <i>Toxoplasma gondii</i> através de bioensaio em camundongos, segundo título de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos gatos. São Paulo, 2004.....	72
Gráfico 3 – Distribuição do número de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de gatos naturalmente infectados, segundo o genótipo, determinado pela PCR-RFLP do <i>locus SAG2</i> . São Paulo, 2004.....	86
Gráfico 4 – Distribuição dos genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose nos grupos. São Paulo, 2004	90
Gráfico 5 – Distribuição dos genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a condição de sobrevivência dos camundongos infectados durante o período experimental. São Paulo, 2004	91
Gráfico 6 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo I de <i>Toxoplasma gondii</i> , a partir do dia 10 pós-inoculação. São Paulo, 2004	92
Gráfico 7 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo III de <i>Toxoplasma gondii</i> , a partir do dia 10 pós-inoculação. São Paulo, 2004	92
Gráfico 8 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo I de <i>Toxoplasma gondii</i> até o término do experimento (60 dias pós-inoculação). São Paulo, 2004.....	93
Gráfico 9 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo III de <i>Toxoplasma gondii</i> até o término do experimento (60 dias pós-inoculação). São Paulo, 2004.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Soroprevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> observada em gatos em diferentes países no período de 2000-2003	29
Quadro 2 – Genotipagem de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de galinhas de diferentes países no período de 2002-2004	39
Quadro 3 – Número de camundongos examinados por grupo para genotipagem de <i>Toxoplasma gondii</i> , segundo a mortalidade no bioensaio e o tecido processado. São Paulo, 2004	54
Quadro 4 – Comportamento dos produtos de <i>nested</i> -PCR oriundos dos genótipos I, II e III de <i>Toxoplasma gondii</i> frente à restrição enzimática com as enzimas <i>Sau3AI</i> e <i>HhaI</i>	57
Quadro 5 – Nomes e seqüências dos “primers” usados na PCR e <i>nested</i> -PCR para amplificação de fragmentos do gene <i>SAG2</i> de <i>Toxoplasma gondii</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número de gatos obtidos para pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , segundo o município de procedência no estado de São Paulo, faixa etária e sexo. São Paulo, 2004.....	48
Tabela 2 –	Distribuição da frequência de gatos soropositivos para anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> através do teste de aglutinação modificado (MAT), segundo o sexo e o município de procedência no estado de São Paulo. São Paulo, 2004.....	67
Tabela 3 –	Distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo. São Paulo, 2004	69
Tabela 4 –	Número de bioensaios de tecidos de gatos realizados em camundongos e número de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos, segundo o município de procedência dos gatos no estado de São Paulo. São Paulo, 2004.....	70
Tabela 5 –	Número de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de gatos naturalmente infectados, segundo o título de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos gatos e o número respectivo de bioensaios realizados em camundongos. São Paulo, 2004.....	72
Tabela 6 –	Número de grupos de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> após inoculação com tecidos de gatos soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> , segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose. São Paulo, 2004.	73
Tabela 7 –	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de gatos através de bioensaio em camundongos, segundo o município de procedência no estado de São Paulo e títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos gatos. São Paulo, 2004.	74
Tabela 8 –	Genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> de isolados e amostras primárias de gatos naturalmente infectados, determinados pela PCR-RFLP do <i>locus SAG2</i> , segundo o município de procedência no estado de São Paulo e a mortalidade em camundongos. São Paulo, 2004.....	88
Tabela 9 –	Distribuição dos genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose nos grupos de camundongos inoculados. São Paulo, 2004.....	90

Tabela 10 – Distribuição dos genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a condição de sobrevivência dos camundongos infectados durante o período experimental. São Paulo, 2004	91
Tabela 11 – Médias de sobrevida e intervalos de confiança (95%) observados para os camundongos infectados com os genótipos tipos I e III de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de gatos naturalmente infectados. São Paulo, 2004	93
Tabela 12 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em camundongos experimentalmente infectados, segundo o genótipo de <i>Toxoplasma gondii</i> . São Paulo, 2004	94
Tabela 13 – Gatos positivos para oocistos tipo <i>Toxoplasma-Hammondia</i> nas fezes, segundo o município de procedência no estado de São Paulo e a faixa etária. São Paulo, 2004.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µM	micromolar
BSA	albumina sérica bovina
CH ₃ COONa	acetato de sódio
d	densidade
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
DL	dose letal
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	e colaboradores
g	grama(s)
g	aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
H ₃ BO ₃	ácido bórico
HCl	ácido clorídrico
<i>Hha</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma(s)
M	molar
MAT	teste de aglutinação modificado
<i>Mbo</i>	<i>Moraxella bovis</i>
mg	miligrama(s)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma(s)

NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico anidro
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico anidro
NaN ₃	azida sódica
<i>n</i> PCR	<i>nested</i> -PCR
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
P.I.	pós-inoculação
pmol	picomol(s)
q.s.p.	quantidade suficiente para
RAPD	amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
s	segundo(s)
<i>Sau</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
SSR	seqüências simples repetidas
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
™	“trade mark”
Tris	hidroximetilaminometano
U	unidade internacional
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	23
3	REVISÃO DA LITERATURA	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	ISOLAMENTO DE <i>T. gondii</i> DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS	47
4.1.1	GATOS	47
4.1.1.1	<u>Colheita de sangue e eutanásia dos gatos</u>	<u>48</u>
4.1.1.2	<u>Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-<i>T. gondii</i></u>	<u>49</u>
4.1.1.3	<u>Digestão péptica de tecidos</u>	<u>50</u>
4.1.2	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS	51
4.1.2.1	<u>Delineamento experimental</u>	<u>52</u>
4.1.2.2	<u>Pesquisa de <i>T. gondii</i></u>	<u>52</u>
4.2	ANÁLISE GENOTÍPICA	53
4.2.1	AMOSTRAS POSITIVAS (ISOLADOS)	53
4.2.2	AMOSTRAS PRIMÁRIAS (GATOS)	54
4.2.3	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA	54
4.2.3.1	<u>Protocolo de extração</u>	<u>55</u>
4.2.4	PCR-RFLP	56
4.2.4.1	<u>Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)</u>	<u>58</u>
4.2.4.2	<u>PCR – Delineamento e Reagentes</u>	<u>58</u>
4.2.4.3	<u>Nested-PCR</u>	<u>60</u>
4.2.4.4	<u>Ciclo empregado</u>	<u>60</u>
4.2.4.5	<u>Análise do produto amplificado</u>	<u>61</u>
4.2.4.6	<u>RFLP</u>	<u>61</u>
4.2.5	ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO	63
4.2.5.1	<u>Purificação, quantificação de DNA e reação de sequenciamento</u>	<u>63</u>
4.2.5.2	<u>Precipitação com isopropanol e etanol</u>	<u>64</u>
4.2.5.3	<u>Preparo da amostra para sequenciamento</u>	<u>65</u>

4.3	PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Toxoplasma-Hammondia</i>	65
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	65
5	RESULTADOS	67
5.1	SOROLOGIA DOS GATOS (MAT)	67
5.2	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO DE <i>T. gondii</i>	69
5.3	ANÁLISE GENOTÍPICA.....	75
5.3.1	PCR-RFLP – AMOSTRAS POSITIVAS (ISOLADOS)	75
5.3.2	PCR-RFLP – AMOSTRAS PRIMÁRIAS (GATOS)	79
5.3.3	ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO	82
5.3.4	GENÓTIPOS DE <i>T. gondii</i> EM GATOS NO ESTADO DE SÃO PAULO ...	85
5.4	PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Toxoplasma-Hammondia</i>	95
6	DISCUSSÃO	96
7	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICE 1	122

1 INTRODUÇÃO

Por sua importância médica e veterinária, o *Toxoplasma gondii* tem sido o parasito mais intensamente estudado entre os coccídios. Tenter, Heckeroth e Weiss (2000), utilizando diferentes sistemas de busca, localizaram mais de 15.000 artigos originais, mais de 500 revisões, diversos livros e capítulos em livros publicados sobre o parasito até aquela data. No entanto, muitos aspectos de sua biologia, ciclo biológico e epidemiologia continuam sendo investigados, destacando-se, mais recentemente, a utilização de métodos moleculares no seu estudo.

A toxoplasmose é uma das infecções parasitárias mais comuns acometendo o homem e muitas outras espécies de mamíferos e aves na maior parte do mundo (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; MCLEOD; DESMONTS, 1995). Estima-se que até um terço da população humana no mundo tenha sido exposta ao *T. gondii* (DUBEY, 1998c; JACKSON; HUTCHISON, 1989).

O *T. gondii* é um parasito intracelular obrigatório, e os três meios primários para sua difusão são a transmissão transplacentária, a ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes e a ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos esporulados. Atualmente não há métodos que determinem se um hospedeiro se infectou pela ingestão de cistos teciduais ou de oocistos esporulados (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; DUBEY, 1994; DUBEY, 2001).

Normalmente, o *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos, mas leva à formação de cistos latentes que podem persistir durante a vida do indivíduo. Os maiores problemas clínicos da toxoplasmose referem-se à (1) infecção primária durante a gestação, que pode resultar em infecção congênita do feto, levando a quadros neurológicos e oculares variados em crianças, como retardo mental e cegueira, abortamento e mortalidade neonatal

em ovinos, caprinos e suínos, causando perdas econômicas; (2) reativação de infecções latentes em indivíduos imunossuprimidos, levando a quadros clínicos severos e às vezes fatais (DUBEY; BEATTIE, 1988; LÜDER; GROSS, 1998; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A patogenicidade do *T. gondii* está estreitamente relacionada à virulência da amostra e à espécie hospedeira. O camundongo (*Mus musculus*) tem sido utilizado preferencialmente como modelo animal experimental da toxoplasmose. As amostras de *T. gondii* variam em sua patogenicidade para os camundongos, sendo altamente virulentas, ou não-virulentas, originando infecções crônicas. A virulência em camundongos é normalmente determinada pela morbidade e mortalidade causadas pela amostra (KAUFMAN et al., 1959; KAUFMAN; REMINGTON; JACOBS, 1958). Estas diferenças podem ser particularmente percebidas no primeiro isolamento, uma vez que uma amostra pode se tornar mais patogênica após passagens repetidas em uma determinada espécie hospedeira (JACOBS; MELTON, 1954). Apesar de certas linhagens de camundongos serem mais suscetíveis que outras, levando a variações de resultados dentro da mesma amostra (ARAUJO et al., 1976), não existem indicações na literatura de que a suscetibilidade às amostras de *T. gondii* esteja relacionada às diferentes raças nos grandes animais ou no homem (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Mesmo diferindo em algumas propriedades biológicas, as amostras conhecidas de *T. gondii* são similares antigenicamente, morfolologicamente e na sua capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros. Nas últimas três décadas, o *T. gondii* tem sido considerado como a única espécie válida do gênero *Toxoplasma* (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER; JOHNSON, 1997).

Estudos moleculares e isoenzimáticos têm mostrado que o *T. gondii* apresenta uma estrutura populacional altamente clonal, embora tenha a oportunidade de recombinação genética em um ciclo sexuado bastante definido, o qual ocorre exclusivamente nos

hospedeiros definitivos, os felídeos (DARDÉ; BOUTELLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Uma consequência desta clonalidade seria a exibição de características biológicas distintas entre clones específicos, relacionadas à patogenicidade (SIBLEY et al., 1995).

O *T. gondii* consistiria, então, de três linhagens clonais predominantes, designadas como tipos I, II e III, ocorrendo de forma global nos animais e no homem (DARDÉ; BOUTELLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995). O sistema de tipificação mais amplamente reconhecido, que subdivide o *T. gondii* nessas três linhagens clonais separadas, foi desenvolvido por Howe et al. (1997), baseado na técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição sobre Produtos Amplificados pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR–RFLP), utilizando como marcador o gene *SAG2*, que codifica o antígeno de superfície p22, localizado no cromossomo *VIII* do parasito (SIBLEY et al., 1995).

O estudo da diversidade genética de um parasito pode colaborar para o entendimento das diferenças na transmissão de doenças e suas manifestações e ao mesmo tempo gerar conhecimento para a melhoria do diagnóstico, tratamento e controle. A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* através de métodos moleculares tem sido realizada com amostras oriundas de humanos e de diversas espécies animais como ovinos, suínos e aves. Neste sentido, não se estudaram amplamente os isolados provenientes de gatos naturalmente infectados. Os gatos, incluindo os Felidae selvagens, além de serem hospedeiros intermediários, são os únicos animais reconhecidos como hospedeiros definitivos do *T. gondii*, desempenhando um papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose, pois excretam os oocistos de *T. gondii* nas fezes. Os oocistos ao esporularem no ambiente são uma fonte potencial de infecção para o homem e outros hospedeiros intermediários (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são o isolamento e a caracterização biológica de *T. gondii* de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, utilizando o bioensaio em camundongos, e a caracterização genotípica dos isolados e das amostras primárias dos gatos pela utilização da técnica de PCR-RFLP, usando como marcador o *locus SAG2*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As primeiras descrições do *T. gondii* ocorreram quase simultaneamente em diferentes partes do mundo. No Brasil, Splendore (1908) descreveu o parasito em coelhos e na França, Nicolle e Manceaux (1908) descreveram taquizoítos do parasito em tecidos de um roedor africano, *Ctenodactylus gundi*. Em 1909, Nicolle e Manceaux introduziram o gênero *Toxoplasma*. O nome *Toxoplasma* (toxon = arco; plasma = forma, grego) refere-se a sua forma em lua crescente. Mais de 60 anos depois, em 1970, o conhecimento sobre o ciclo biológico do *T. gondii* foi completado através da descoberta dos estágios sexuais do parasito no intestino delgado de gatos (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a, b).

O ciclo biológico do *T. gondii* é heteroxeno facultativo. A fase assexuada de desenvolvimento ocorre em vários tecidos dos hospedeiros intermediários (mamíferos e aves), resultando na formação de cistos e a fase sexuada de desenvolvimento ocorre no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (gatos domésticos e outros membros da família Felidae), resultando na formação dos oocistos (DUBEY; BEATTIE, 1988; LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 1997). Há três estágios infectantes, que são os taquizoítos livres ou em pseudocistos em diversos órgãos, os bradizoítos nos cistos teciduais e os esporozoítos nos oocistos esporulados. Os três estágios são infectantes para hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Nos hospedeiros intermediários, após a infecção com qualquer dos estágios infectantes, há a multiplicação rápida dos taquizoítos por endodiogenia, em diferentes tipos de células, culminando na formação dos cistos teciduais. Os cistos contêm bradizoítos, que são estágios que se dividem lentamente, também por endodiogenia, e se localizam predominantemente no cérebro e musculaturas cardíaca e esquelética persistindo por um

longo período, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; FRENKEL, 1976).

Apesar de predominarem durante a fase crônica, os cistos são formados no início da infecção; em camundongos, observou-se a formação de cistos oito dias pós-infecção, independentemente do estágio infectante e via de inoculação (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY et al., 1997). Experimentos mostraram que a localização e o número de cistos nos animais diferem dependendo do hospedeiro e da amostra de *T. gondii*. Em camundongos e ratos, foram encontrados mais cistos no cérebro do que em tecidos viscerais, independentemente da amostra administrada. No entanto, em mamíferos de maior porte como bovinos, ovinos, caprinos e gatos, o maior número de isolamentos do parasito em provas biológicas tem sido observado com tecidos musculares (DUBEY, 1998a; DUBEY, 1997b; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Para a detecção de cistos teciduais nos órgãos dos hospedeiros, o método de digestão de tecidos seguido de bioensaio em camundongos pode ser utilizado a fim de aumentar a taxa de recuperação do parasito (DUBEY, 1998b; DUBEY; THULLIEZ; POWELL, 1995). O bioensaio em camundongos é importante, pois o número de cistos em animais de maior porte é baixo, ao redor de um cisto por 25-250g de órgão. A digestão dos tecidos de um hospedeiro em tripsina ou pepsina permite o exame de maior quantidade de material, levando à dissolução da parede dos cistos, liberando os bradizoítos. Um cisto de *T. gondii* contém quatro a centenas de bradizoítos, dependendo da amostra, hospedeiro e tempo de infecção (DUBEY, 1997a; DUBEY et al., 1997; DUBEY; BEATTIE, 1988). A seleção de tecidos examinados também é um fator importante. Apesar dos estudos experimentais mostrarem que o *T. gondii* tem uma maior persistência no cérebro de gatos, o parasito tem sido mais prevalente nos tecidos musculares dos gatos naturalmente infectados (DUBEY et al., 1986; DUBEY et al., 2004c; KATSUBE et al., 1967).

O ciclo biológico do *T. gondii* difere em gatos dependendo do estágio de desenvolvimento ingerido. A ingestão de cistos teciduais leva à liberação de bradizoítos que darão início ao ciclo enteroepitelial com a produção de oocistos não esporulados no intestino delgado; outros bradizoítos podem iniciar o desenvolvimento como taquizoítos em diversas células do organismo, produzindo infecções crônicas. Essa é a via de transmissão mais comum, ocorrendo principalmente quando os filhotes começam a caçar pássaros e pequenos mamíferos, ou ingerem carcaças trazidas por suas mães (CHILDS, 1986; DUBEY; BEATTIE, 1988).

Os felídeos excretam oocistos de *T. gondii* nas fezes três a 10 dias após a ingestão de bradizoítos, 18 dias ou mais após a ingestão de oocistos esporulados e 13 dias ou mais após a ingestão de taquizoítos. O ciclo induzido por bradizoítos nos gatos é o mais eficiente, uma vez que cerca de 97% deles excretam oocistos, enquanto menos de 30% dos que ingerem oocistos ou taquizoítos excretam oocistos (DUBEY, 1998a, 1979, 1977; DUBEY; FRENKEL, 1972, 1976; FREYRE et al., 1989). A razão para o aumento do período pré-patente é que os esporozoítos ou taquizoítos ingeridos precisam primeiramente formar cistos teciduais contendo os bradizoítos, que devem então voltar para o intestino para iniciar o ciclo enteroepitelial. Como a ruptura de cistos não é um evento freqüente, este tipo de ciclo ocorre numa porcentagem menor de gatos que ingeriram oocistos ou taquizoítos (DUBEY, 1998a; FREYRE et al., 1989).

O período de patência dura uma a três semanas e um único gato pode excretar milhões de oocistos, geralmente sem sinais clínicos. A toxoplasmose em gatos ocorre raramente e uma das razões é que a maioria se infecta ao redor de dois a três meses, quando estão aptos a caçar e imunocompetentes para responder à infecção, mas os recém-nascidos podem desenvolver toxoplasmose aguda e morrer (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995a).

Todos os gatos domésticos são suscetíveis à infecção, independentemente de sexo, idade ou raça (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977) e aqueles com menos de um ano de idade produzem o maior número de oocistos; animais adultos não infectados também eliminam oocistos ao ingerirem cistos, mas a excreção é menor e por um período mais curto (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977; LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 1997).

Os gatos adquirem uma forte imunidade intestinal após uma primo-infecção, raramente reexcretando oocistos. Dubey (1995) observou uma nova eliminação em 55% de gatos desafiados seis anos após a infecção primária. Alguns gatos podem eliminar novamente oocistos, mesmo sem reinfecção, quando imunodeprimidos ou infectados com *Isospora* spp (CHESSUM, 1972; DUBEY, 1976; DUBEY; FRENKEL, 1974).

O processo de esporulação dos oocistos no ambiente leva de dois a cinco dias e depende de temperatura, umidade e aeração adequadas (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a; JACKSON; HUTCHISON, 1989). Os oocistos esporulados são muito resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis por até 18 meses (DUBEY; BEATTIE, 1988; FRENKEL; RUIZ; CHINCHILLA, 1975), além de serem também muito resistentes aos desinfetantes (DUBEY; BEATTIE, 1988).

A importância epidemiológica dos oocistos pode ser constatada verificando-se que apesar da ampla distribuição do *T. gondii* na maior parte do mundo, as infecções por esse parasito são virtualmente ausentes em ilhotas e atóis que nunca foram habitados por gatos, como observado por Munday (1972) e Wallace (1969).

Como os gatos geralmente excretam oocistos num período muito curto durante sua vida, a possibilidade de detecção em um exame coproparasitológico de rotina é pequena, observando-se usualmente uma prevalência menor do que 2,0% na maioria dos países (DUBEY; BEATTIE, 1988). No Brasil, Gennari et al. (1999) observaram 1,6% (3/187

amostras), Ogassawara et al. (1980) observaram uma frequência de 0,9% (1/103 amostras) e Rosa e Belda Neto (1983) observaram 5,4% (4/73 amostras), no entanto, não realizaram bioensaio em camundongos para diferenciação com a espécie morfológicamente relacionada *Hammondia hammondi*. Os dados sorológicos de prevalência em gatos tornam-se, então, importantes para avaliar o significado epidemiológico da infecção por *T. gondii*.

Uma vez que os gatos não desenvolvem anticorpos anti-*T. gondii* durante o período de eliminação de oocistos, o exame sorológico não fornece informação quanto à capacidade de um gato transmitir toxoplasmose (DUBEY, 1994), no entanto, um resultado positivo sorologicamente sugere que o gato já foi infectado algum dia. A maioria dos gatos com níveis detectáveis de anticorpos IgG está provavelmente imune, portanto não teria novo episódio de excreção de oocistos. Quando a infecção do gato ocorre através da ingestão de cistos, a soroconversão (IgG) ocorre geralmente entre duas e cinco semanas pós-infecção (DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995b; DUBEY; THULLIEZ, 1989; LAPPIN; BUSH; REDUKER, 1994; LAPPIN et al., 1989; LAPPIN et al., 1991; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Na revisão de Dubey e Beattie (1988), pode-se observar que em trabalhos publicados em 17 países de diferentes partes do mundo, no período de 1980 a 1986, a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos variou de zero a 81%, sendo examinadas nove a 1539 amostras, através de diferentes métodos sorológicos. Relativamente ao Brasil, Ferraroni, Reed e Speer (1980) verificaram uma prevalência sorológica de 81% (26/35 amostras) em Manaus (AM) e Santos et al. (1983) observaram 59% (59/100 amostras) em São Paulo (SP).

Tenter, Heckeroth e Weiss (2000) reuniram os trabalhos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos, nos quais os levantamentos sorológicos foram realizados no período de 1990 a 2000. Assim, observa-se que em gatos domiciliados, em 12 países ao redor do mundo, a soroprevalência variou entre seis e 71%, sendo testadas 15 a 800 amostras; já nos gatos de rua, observou-se uma soroprevalência entre 13 e 73% em trabalhos de 11 países,

sendo examinadas 18 a 706 amostras. No Brasil, Garcia et al. (1999) verificaram uma prevalência de 73% (126/173 amostras) em gatos de propriedades rurais de Jaguapitã (PR) e Lucas et al. (1999) observaram uma soroprevalência de 18% (45/248 amostras) em gatos domiciliados de São Paulo (SP).

No quadro 1 podem ser observados dados mais recentes publicados em diferentes países do mundo.

País	Nº de positivos/ Nº de amostras examinadas	Soroprevalência (%)	Método	Referência
Chile	32 / 97	33,0	RIFI ¹	Ovalle et al. (2000)
Brasil	37 / 191	19,4	RIFI	Langoni et al. (2001)
Brasil	115 / 430	26,7	MAT ²	Silva et al. (2002)
Brasil	49 / 58	84,4	MAT	Dubey et al. (2004c)
Estados Unidos	84 / 200	42,0	MAT	DeFeo et al. (2002)
Estados Unidos	133 / 275	48,0	MAT	Dubey et al. (2002b)
Bélgica	243 / 346	70, 2	Aglutinação direta ³	Dorny et al. (2002)
Espanha	99 / 220	45,0	MAT	Gauss et al. (2003)

Nº: Número; ¹ Reação de Imunofluorescência Indireta; ² Teste de Aglutinação Modificado; ³ Toxo-Screen DA™ (bioMérieux)

Quadro 1 – Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* observada em gatos em diferentes países no período de 2000-2003

As amostras de *T. gondii* apresentam virulência diferente tanto nos animais quanto no homem. A população humana que está cronicamente infectada (15-85%) é tipicamente

assintomática, 30 a 50% dos pacientes aidéticos cronicamente infectados desenvolvem encefalite toxoplásmica e aproximadamente metade das infecções maternas agudas é que resultam em doença congênita no recém-nascido (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). A heterogeneidade no comportamento biológico de diferentes amostras sugere a existência de polimorfismos de DNA, influenciando a patogenicidade da infecção pelo *T. gondii* (CRISTINA et al., 1991; HOWE; SIBLEY, 1995).

As amostras de *T. gondii* diferem claramente em sua virulência em camundongos, principal animal de laboratório usado como modelo experimental da toxoplasmose. A virulência em camundongos depende de vários fatores, incluindo o estágio do parasito, a via de inoculação, tipos de linhagens de camundongos e a amostra do parasito (DUBEY et al., 2004c). Entre os três estágios infectantes, os oocistos são mais virulentos do que taquizoítos ou bradizoítos (DUBEY; BEATTIE, 1988). Os principais critérios para avaliação da virulência neste modelo animal têm sido a taxa de mortalidade e o tempo até a morte de camundongos albinos suíços experimentalmente infectados com inóculos graduais do parasito (KAUFMAN; REMINGTON; JACOBS, 1958). Estes critérios têm levado à classificação das amostras de *T. gondii* como virulentas, não virulentas ou de virulência intermediária.

Amostras virulentas apresentam uma $DL_{100} < 10$ parasitos e as não virulentas exibem uma $DL_{100} > 10^3$ parasitos, com infecções crônicas facilmente estabelecidas (HOWE; SUMMERS; SIBLEY, 1996; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Essa avaliação deve ser feita o mais breve possível após o isolamento original, pois tem sido observado que algumas amostras têm sua patogenicidade aumentada após passagens parenterais sucessivas em camundongos (JACOBS; MELTON, 1954) e outras ainda perdem a capacidade de produção de cistos e oocistos (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; FRENKEL; DUBEY; HOFF, 1976). Amostras de virulência intermediária estariam em transição entre os fenótipos não virulento e virulento do parasito, segundo Literák et al. (1998).

Outros parâmetros de virulência, em experimentos não letais, têm sido estudados como alternativos ao critério de mortalidade e morbidade em camundongos. Assim, Jensen, Heegaard e Lind (1998) estabeleceram a relevância de se estudar parâmetros clínicos como ganho de peso e níveis séricos de haptoglobina em animais inoculados com diferentes doses de um mesmo isolado de *T. gondii* e com a mesma dose de isolados diferentes.

Jungersen et al. (2002) estudaram os parâmetros citados acima juntamente com a resposta de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii* em camundongos inoculados com amostras isoladas de ovinos adultos e de fetos ovinos abortados, também observando que estavam altamente correlacionados, ou seja, as amostras que induziam a resposta mais alta de haptoglobina na fase aguda da infecção, também causavam perda de peso e aumento significativo no nível de anticorpos anti-*T. gondii*, portanto, estes parâmetros poderiam ser úteis na identificação de diferenças de virulência entre amostras de *T. gondii*.

Estudos *in vitro* com amostras virulentas para camundongos revelaram variação na capacidade de penetração celular, na taxa de crescimento e na interconversão taquizoíto-bradizoíto entre as amostras, demonstrando a heterogeneidade no fenótipo de virulência entre amostras de *T. gondii* (APPLEFORD; SMITH, 1997).

O *T. gondii* apresenta importantes atributos biológicos que o tornam adequado para estudos genéticos: é facilmente mantido em laboratório, tem a habilidade de crescer em qualquer linhagem celular, é possível a produção de mutantes que podem ser clonados indefinidamente e há a disponibilidade de mapas genéticos (SIBLEY et al., 1995).

Mapas genéticos indicam que há pelo menos 11 cromossomos (SU et al., 2002). Dezenas de genes já foram clonados e caracterizados, incluindo genes constitutivos, genes codificadores de antígenos de superfície e proteínas secretoras, e genes ribossomais (Genbank) (SIBLEY et al., 1995).

Antígenos estágio-específicos também já foram caracterizados. Os antígenos de superfície SAG1 e SAG2 encontram-se expressos abundantemente nos taquizoítos, mas são regulados negativamente durante a conversão para bradizoítos, nos quais não são encontrados (KASPER; WARE, 1985). Por outro lado, outros antígenos específicos são expressos somente nos bradizoítos (BOHNE; HEESEMANN; GROSS, 1993; PARMLEY et al., 1994b; TOMAVO et al., 1991). Os antígenos de um determinado estágio são altamente conservados entre amostras diferentes (COUVREUR et al., 1988; HANDMAN; GODING; REMINGTON, 1980).

Apesar de sua distribuição mundial, gama de hospedeiros e da presença de uma fase sexuada no seu ciclo biológico, o *T. gondii* apresentou uma baixa variação genética quando diferentes amostras foram analisadas através de RFLP (CRISTINA et al., 1991; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992) ou de marcadores isoenzimáticos (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992), revelando uma estrutura populacional clonal. Esta clonalidade se manifesta pelo isolamento repetitivo do mesmo genótipo em amostras não relacionadas e pela ausência dos vários genótipos recombinantes possíveis. Howe e Sibley (1995) mostraram que as amostras de *Toxoplasma* isoladas do homem e dos animais podiam ser agrupadas em três linhagens clonais distribuídas mundialmente.

A transmissão horizontal do parasito através da cadeia alimentar pode ter contribuído para a difusão das linhagens clonais (SIBLEY et al., 1995). Segundo esses autores, uma vantagem do baixo grau de diversidade genética é que os marcadores desenvolvidos para uma determinada amostra têm uma grande probabilidade de serem úteis para todas as amostras.

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a diversidade genética entre amostras de *T. gondii* em vários laboratórios no mundo, como a RFLP, a eletroforese isoenzimática, a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) e marcadores microsatélites (seqüências simples repetidas – SSR). Para melhor compreensão, dada as

características peculiares de cada técnica, a revisão referente à genotipagem de *T. gondii* será agrupada em blocos diferentes segundo a metodologia utilizada.

Entre as técnicas de biologia molecular correntemente usadas para a caracterização de amostras de parasitos, está a análise de RFLP, já utilizada para o estudo de diferentes protozoários como o *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* e *Acanthamoeba* e helmintos como *Schistosoma*, *Echinococcus* e *Taenia* (CRISTINA et al., 1991).

Como o nome sugere, RFLPs são encontrados como o resultado da clivagem do DNA com enzimas de restrição. Cada enzima de restrição reconhece uma sequência específica de quatro a oito bases. Se houver a mudança de uma única base dentro dessa sequência, a enzima não será capaz de clivar o DNA. Quando se examina a mesma região de um cromossomo de dois organismos relacionados, mas não idênticos, observa-se que a sequência de DNA é similar, mas não exatamente a mesma. A quantidade dessa diferença depende de quão relacionados são os organismos. Assim, sítios de restrição que estão presentes na sequência de uma amostra, podem estar faltando na amostra semelhante. Ao se clivar duas moléculas de DNA relacionadas, mas diferentes, com a mesma enzima de restrição, podem ser obtidos segmentos de comprimentos diferentes, que quando separados em um gel, por eletroforese, originam bandas de diferentes pesos moleculares (CLARK; RUSSEL, 1997).

Relativamente à pesquisa genética com *T. gondii*, com o desenvolvimento das técnicas de PCR tornou-se possível amplificar *loci* gênicos específicos para a análise de RFLP a partir de um número muito pequeno de células, tornando a técnica menos laboriosa, além de permitir a análise direta de amostras sem a necessidade de cultivo prolongado dos isolados e uma possível alteração da amostra fora do seu hospedeiro original (SIBLEY et al., 1995).

Cristina et al. (1991) demonstraram a presença de quatro padrões de RFLP entre seis amostras de *T. gondii* (três virulentas e três não virulentas) usando uma sequência repetitiva

de DNA específica de 353pb como sonda (*TGR1E*). Não foram encontradas correlações significativas entre os padrões observados e a patogenicidade das amostras em camundongos.

Sibley e Boothroyd (1992) analisaram 28 amostras de diferentes hospedeiros (homem, cão, gato, coelho, galinha, suíno, bovino, ovino, caprino) de vários países ao redor do mundo, incluindo duas amostras virulentas (origem humana e suína) provenientes do Brasil. Foi utilizada a PCR-RFLP. Três *loci* gênicos foram escolhidos aleatoriamente para a caracterização de genótipos (*SAG1*, *850* e *BS*). Verificaram que as 10 amostras reconhecidas como virulentas para camundongos tinham essencialmente o mesmo genótipo quando analisadas no *locus SAG1*, enquanto que as demais, não virulentas, eram relativamente heterogêneas. O alto grau de semelhança genética entre as amostras virulentas sugeria que essas amostras faziam parte de uma única linhagem clonal, a despeito do hospedeiro e origem geográfica.

Parmley et al. (1994a) estudaram 25 amostras de *T. gondii* através de RFLP, usando os *loci* v22 (fragmento interno de 438pb do gene *P22*) ou *SAG2*, *SAG1* e *850* e sugeriram a divisão das amostras analisadas em três linhagens clonais, denominadas grupo A (com as amostras virulentas para camundongos), grupo B e grupo C (com as amostras não virulentas).

A fim de avaliar melhor a estrutura populacional de *T. gondii* e a correlação entre o genótipo do parasito e a toxoplasmose humana, Howe e Sibley (1995) examinaram 106 isolados de origem humana e animal, não relacionados, provenientes da Europa e América do Norte. Foram utilizados seis *loci* como marcadores genéticos (*SAG1*, *SAG2*, *ROP1*, *850*, *L328* e *62*), sendo que as diferenças gênicas foram detectadas através de PCR-RFLP. Mais de 95% dos isolados puderam claramente ser definidos em um entre três genótipos altamente similares, que foram designados como linhagens dos tipos I, II e III. Somente quatro amostras apresentavam genótipos muito variados, indicando que a recombinação entre gametas das três linhagens é extremamente rara nas populações. As análises de seqüências dos genes *SAG1* e

SAG2, indicaram uma diferença ao redor de 1% entre as amostras das três principais linhagens e uma diferença menor ainda entre as amostras da mesma linhagem.

Para Frenkel e Ambroise-Thomas (1997) deve ser observado que os gatos apresentam uma imunidade intestinal bastante efetiva, que restringiria o tempo para um possível cruzamento dos diferentes genótipos; assim, seria necessário que amostras de genótipos distintos fossem ingeridas no mesmo dia ou seqüencialmente.

Com as evidências de que o *T. gondii* poderia ser agrupado em duas ou três linhagens clonais, e dada a pouco freqüente recombinação entre as linhagens, Johnson (1997) levanta a hipótese de que alguns membros da linhagem virulenta poderiam ter seu próprio ciclo biológico na natureza, que envolveria transmissão vertical no final da gestação do hospedeiro, ou transmissão através do leite para o neonato.

Howe e Sibley (1995) observaram um predomínio do genótipo tipo II nos casos de toxoplasmose humana. Amostras tipo II estavam mais associadas com a reativação de infecções crônicas em pacientes aidéticos do que com as infecções em animais. Amostras tipo I estavam mais associadas com a toxoplasmose humana congênita do que com as infecções em animais. Em contraste, amostras do tipo III foram mais encontradas nos animais do que nos casos de toxoplasmose humana. Os genótipos tipos II e III foram igualmente encontrados nos 34 isolados de animais naturalmente infectados (44 e 47%, respectivamente) e o genótipo tipo I foi encontrado em 9% dos isolados animais. Amostras do tipo I são extremamente virulentas em camundongos, causando altos níveis de parasitemia e as amostras tipos II e III são consideradas não virulentas em camundongos, podendo levar a uma grande produção de cistos, que podem ser reativados em camundongos experimentalmente imunossuprimidos (SUZUKI; JOH, 1994).

Cristina et al. (1995) caracterizaram geneticamente 14 isolados de *T. gondii* usando as técnicas de análise isoenzimática e de RFLP com as sondas *TGR1E* e *TGR6*. As amostras

puderam ser divididas em dois grupos, sendo um grupo com as amostras virulentas para camundongos (zimodemas 1 e 5) e outro grupo com as amostras não virulentas (zimodemas 2, 3 e 4).

Howe et al. (1997) determinaram os genótipos de *T. gondii* associados com a toxoplasmose humana em 72 isolados da França. Foi utilizada a *nested*-PCR-RFLP. A tipagem genética foi baseada em polimorfismos no *locus SAG2*. As amostras do tipo II foram encontradas em 55 (81%) dos 68 isolados caracterizados genotipicamente. Amostras dos tipos I e III foram encontradas em sete (10%) e seis (9%), respectivamente, dos 68 casos de toxoplasmose, sendo que as do tipo II estavam altamente relacionadas à toxoplasmose congênita.

Na República Tcheca, foi observada a existência de duas linhagens clonais de *T. gondii*, ao se examinarem 22 amostras através de RFLP, usando como sonda, a sequência repetitiva *TGR1E*. Das 20 amostras isoladas de animais entre 1994 e 1995, 19 pertenciam a uma linhagem não virulenta e uma pertencia a uma linhagem virulenta. As outras amostras eram de origem humana e pertenciam à linhagem virulenta (LITERÁK et al., 1998).

Mondragon et al. (1998) determinaram a frequência das três linhagens clonais primárias de *T. gondii* em 43 isolados de suínos nos Estados Unidos. A análise genética foi feita através da PCR-RFLP dos *loci SAG1* e *SAG2*. Os isolados foram identificados como tipo I, tipo II ou tipo III com base no *locus SAG2* (alelos 1, 2 ou 3). Amostras do tipo II corresponderam a 83,7% (36/43) dos isolados e o genótipo tipo III foi encontrado em 16,3% (7/43) dos isolados.

No Reino Unido, treze amostras (placentas) de ovinos naturalmente infectados que abortaram foram analisadas através da PCR-RFLP do *locus SAG2*. A PCR foi aplicada diretamente nos extratos teciduais, sem isolamento do parasito ou extração de DNA. Todas as amostras foram classificadas como do tipo II (OWEN; TREES, 1999).

A genotipagem de 12 amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose ocular severa ou atípica revelou três amostras tipo I, três amostras tipo II, uma amostra tipo III e cinco amostras com genótipos recombinantes, apresentando alelos típicos de amostras tipo I ou III. A descoberta desses novos tipos recombinantes foi possível pela utilização de PCR-RFLP utilizando cinco *loci* polimórficos (*SAG3*, *SAG4*, *BI*, *SAG1* e *SAG2*) (GRIGG et al., 2001).

Cole et al. (2000) examinaram os isolados de *T. gondii* provenientes de 15 lontras, como parte de um programa de monitoramento da mortalidade desses animais. Os genótipos nos *loci* *SAG1* e *SAG2* foram determinados por PCR-RFLP. As treze amostras genotipadas eram tipo II, mas geneticamente distintas umas das outras, como revelou a análise com a sonda repetitiva *BS*.

Na Espanha, para determinar a prevalência dos diferentes genótipos de *T. gondii* associados à toxoplasmose humana, foram analisadas 34 amostras clínicas primárias, utilizando a PCR-RFLP do *locus* *SAG2*. A caracterização genotípica completa foi possível em 76,5% dos casos. Dez amostras eram tipo I (40%), 10 eram tipo II (40%) e cinco eram tipo III (20%). Amostras tipo II foram mais freqüentes em pacientes imunocomprometidos (52%) e amostras tipo I estavam presentes em 75% dos casos de toxoplasmose congênita (FUENTES et al., 2001).

Grigg e Boothroyd (2001) verificaram que o gene *BI*, rotineiramente usado para o diagnóstico de *T. gondii* através da PCR em amostras clínicas, apresentava 10 sítios polimórficos que podiam distinguir, por RFLP, as amostras virulentas tipo I das amostras não virulentas tipos II e III, permitindo uma identificação rápida e sensível do genótipo de *T. gondii* em amostras clínicas.

Aspinall et al. (2002) examinaram 71 produtos alimentícios a base de carne suína, bovina ou ovina provenientes de diversos mercados no Reino Unido. A PCR com “primers” específicos para o *locus* *SAG2* de *T. gondii* mostrou que 27 amostras estavam positivas e na

análise de restrição enzimática subsequente, 21 amostras tinham o tipo I e seis tinham o tipo I e o tipo II.

Os genótipos de *T. gondii* associados a 32 casos de toxoplasmose aguda em pacientes na Inglaterra e País de Gales foram investigados por Aspinall et al. (2003). Os resultados obtidos pela análise de sítios de restrição do *locus SAG2* foram depois comparados com os resultados do seqüenciamento direto dos produtos da PCR. Os tipos I e II foram encontrados com a mesma frequência (31 e 34%, respectivamente), mas nenhum desses grupos estava mais associado com uma determinada forma clínica de toxoplasmose. Amostras mistas (tipo I e tipo II) foram encontradas no mesmo número que os tipos I e II separadamente. O tipo III teve uma ocorrência baixa, com apenas um caso (3,13%).

No Brasil, o primeiro estudo de tipagem genética de *T. gondii* em animais foi conduzido por DUBEY et al. (2002a). A partir de 82 amostras de galinhas caipiras assintomáticas procedentes de zonas rurais no interior do estado de São Paulo, foram obtidos 25 isolamentos de *T. gondii*; estes isolados foram tipados utilizando a técnica de *nested*-PCR-RFLP, para o *locus SAG2*. Amostras do tipo I corresponderam a 64% (16) dos isolados e 36% (9) eram amostras do tipo III. Não foram encontradas amostras tipo II. Pela primeira vez é relatado o predomínio de amostras do tipo I em uma espécie animal usada para consumo humano.

Uma série de estudos vem sendo conduzida com o objetivo de verificar a diversidade genética de *T. gondii* a partir de isolados de galinhas caipiras assintomáticas provenientes de diferentes países. Uma vez que esses animais se infectam principalmente ao se alimentarem no chão contaminado com oocistos, a prevalência de *T. gondii* em galinhas seria um bom indicador das amostras prevalentes no ambiente (RUIZ; FRENKEL, 1980). No quadro 2 podem ser visualizados os genótipos encontrados em galinhas de diferentes partes do mundo, incluindo o primeiro estudo no Brasil.

País	Número de isolados genotipados	Genótipos				Referência
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo I+Tipo III	
Brasil (SP)	25	16	0	9	0	Dubey et al. (2002a)
Brasil (RJ)	48	34	0	13	1	Dubey et al. (2003c)
Brasil (PR)	13	7	0	6	0	Dubey et al. (2003d)
Argentina	9	1	1	7	0	Dubey et al. (2003e)
Peru	10	7	0	3	0	Dubey et al. (2004b)
México	6	1	0	5	0	Dubey, Morales e Lehmann (2004)
Estados Unidos	19	0	5	14	0	Dubey et al. (2003b)
Egito	20	0	3	17	0	Dubey et al. (2003a)
Israel	21	0	19	2	0	Dubey et al. (2004d)
Índia	7	0	2	5	0	Sreekumar et al. (2003)

Quadro 2 – Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas de diferentes países no período de 2002-2004

Tinti et al. (2003) compararam a organização genômica do *locus* multigênico *SAG5* em amostras pertencentes aos três genótipos clássicos de *T. gondii* (tipos I, II e III). Foi verificado que a presença do gene *SAG5B* é um traço distintivo do genótipo I. Os autores também desenvolveram uma nova PCR-RFLP baseada no gene *SAG5C*, capaz de discriminar amostras dos genótipos I, II e III através de uma única endonuclease de restrição.

Nos Estados Unidos, a urbanização crescente tem criado uma situação de sinantropismo com espécies selvagens como coiotes, veados e mãos-pelada. Como há poucos estudos sobre a prevalência e distribuição de genótipos de *T. gondii* em animais selvagens, Dubey et al. (2004a) descreveram as características de isolados de *T. gondii* de várias espécies da fauna selvagem naquele país. Através da PCR-RFLP do *locus SAG2* observou-se que os três genótipos clássicos estão circulando na fauna selvagem americana.

Com o objetivo de completar os dados epidemiológicos relacionados a um surto de toxoplasmose clínica na população humana, vinculado à contaminação de um reservatório de água com oocistos de *T. gondii*, na cidade de Santa Isabel do Ivaí, estado do Paraná, Dubey et al. (2004c) estudaram a prevalência de *T. gondii* em gatos nesta cidade e caracterizaram os isolados de *T. gondii* nestes animais. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 84,4% (49/58) dos animais examinados. A genotipagem de 37 isolados de *T. gondii* obtidos mostrou que 15 isolados eram do tipo I e 22 eram do tipo III.

A análise isoenzimática permite avaliar o nível de variações genéticas em populações e fornecer informações sobre a biologia reprodutiva de um determinado organismo (DARDÉ, 1996).

Dardé, Bouteille e Pestre-Alexandre (1988) agruparam sete isolados de *T. gondii* em três zimodemas de acordo com os padrões isoenzimáticos de quatro sistemas enzimáticos estudados: aspartato aminotransferase (ASAT), glutatona redutase (GSR), glicose fosfato isomerase (GPI) e amilase (AMY). As três amostras do zimodema 1 eram altamente virulentas para camundongos, e não produziam oocistos no epitélio intestinal de felídeos. As amostras pertencentes aos zimodemas 2 e 3 apresentavam baixa virulência, levando a infecções crônicas nos camundongos e à produção de oocistos em felídeos após a ingestão de

cistos. No entanto, o número de isolados estudados foi muito pequeno para conclusões significativas.

Dardé, Bouteille e Pestre-Alexandre (1990) utilizaram as mesmas enzimas citadas anteriormente, mais a lactato desidrogenase (LDH) para comparar taquizoítos de oito amostras de *T. gondii* produzidos sob diferentes condições de cultura, tanto *in vivo* como *in vitro*. As diferentes condições de cultura afetaram o padrão da LDH, mostrando que a comparação de diferentes isolados deve ser realizada com taquizoítos produzidos sob as mesmas condições de cultura.

Dardé, Bouteille e Pestre-Alexandre (1992) realizaram análise isoenzimática em 35 amostras de origem humana e animal, provenientes da França e Estados Unidos, usando seis sistemas enzimáticos: aspartato aminotransferase (ASAT), glutatona redutase (GSR), glicose fosfato isomerase (GPI) e amilase (AMY), propionil esterase (PE) e fosfatase ácida (ACP), que permitiram a descrição de cinco zimodemas. Não foram achadas correlações entre sintomas clínicos na toxoplasmose humana e padrões isoenzimáticos. O zimodema 1 foi o mais homogêneo, com todos os isolados sendo altamente patogênicos em camundongos após o isolamento inicial. Este estudo confirmou que variações intra-específicas do *T. gondii* podem ser demonstradas pelo uso desta técnica que, em associação com outros parâmetros, poderiam ser utilizadas para classificar isolados de *T. gondii*.

Dardé (1996) estudaram 61 amostras de *T. gondii* de origem humana e animal. A análise isoenzimática permitiu a descrição de dois padrões para as enzimas ASAT, AMY, GSR e PE, e três padrões para GPI e ACP. Estes padrões isoenzimáticos levaram à identificação de 11 zimodemas entre os isolados estudados, sendo que quatro (Z1, Z2, Z3 e Z4) correspondiam a 88% das amostras.

A técnica de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD-PCR) baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA por “primers” únicos, curtos e de sequência aleatória (WELSH; MCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990), detectando polimorfismos que podem ser utilizados para aplicação de mapeamento genético, diagnóstico e comparação genética inter e intra-específica (BARRAL et al., 1993; WILLIAMS et al., 1993).

Guo e Johnson (1995) utilizaram sete “primers” aleatórios (B4, B5, B8, B12, B13, F6, F15) para distinguir 11 amostras de *T. gondii* com diferentes virulências em camundongos através da RAPD-PCR. Quando uma banda de DNA em uma amostra era detectada e reproduzível, e não era detectada nas outras amostras, considerava-se como um polimorfismo de DNA. O número de fragmentos amplificados produzidos por cada “primer” variou de dois a 14. Os resultados revelaram dois grupos de amostras, um formado pelas seis amostras virulentas e outro formado pelas cinco amostras não virulentas, sugerindo que o gênero *Toxoplasma* pode conter dois grupos correlacionados com a virulência, que provavelmente evoluíram de forma independente após uma separação inicial.

Guo, Gross e Johnson (1997) utilizaram 18 “primers” aleatórios (A10, A14, A17, A19, B04, B05, B08, B12, B13, C01, C07, C08, C11, V15, C16, C20, F06, F15) para amplificar o DNA genômico de 35 isolados de *T. gondii*, utilizando a RAPD-PCR. Os “primers” B5, C8, C20 e B12 geraram fragmentos específicos capazes de identificar claramente o fenótipo de virulência e o de não virulência. Segundo os autores, esses resultados suportam a hipótese anterior (GUO; JOHNSON, 1995) de separação das amostras de *T. gondii* em duas linhagens clonais.

Outra metodologia utilizada para verificar polimorfismos de DNA associados com a virulência de amostras de *T. gondii* tem sido a comparação de sequências de DNA.

Seqüências do gene da subunidade menor do RNA ribossomal (ssrRNA) foram comparadas entre nove amostras de *T. gondii* (LUTON; GLEESON; JOHNSON, 1995). O nível de heterogeneidade no gene ssrRNA das amostras estudadas foi muito baixo para qualquer conclusão sobre a relação genética entre as amostras. Não houve correlação óbvia entre o fenótipo virulência e a variação na seqüência gênica do ssrRNA. Segundo os autores, parece que nas amostras de *T. gondii*, ao contrário de outros Apicomplexa comparados até aquele momento, as seqüências do gene ssrRNA acumularam poucas diferenças.

Biñas e Johnson (1998) usaram o *intron* do gene codificador da subunidade catalítica da DNA polimerase α (IC) para avaliar a relação genética entre 10 amostras de *T. gondii*. A comparação de seqüências detectou polimorfismos neste *intron* de 652pb correlacionados com a virulência em camundongos. Também foi observada a presença de um sítio de restrição específico no *intron* IC das amostras virulentas, que poderia ser usado para diferenciação entre as amostras de *T. gondii* virulentas e não virulentas através de RFLP.

Fazaeli et al. (2000) investigaram polimorfismos na região codificadora do gene de antígeno de grânulo denso *GRA6* como possíveis marcadores para *T. gondii*. Trinta isolados de oito zimodemas (Z1-Z8), segundo Dardé (1996), foram comparados. O alinhamento de seqüências identificou polimorfismos de nucleotídeos em 24 posições do produto amplificado, que se correlacionaram com a virulência em camundongos. Polimorfismos específicos associados com os tipos I, II e III foram observados em 3, 10 e 6 posições, respectivamente, o que torna o gene *GRA6* um bom marcador para a caracterização de amostras de *T. gondii*. Os autores também desenvolveram uma nova PCR-RFLP usando este marcador e uma única endonuclease, o que simplificaria a diferenciação dos três genótipos de *T. gondii*.

A fim de aumentar a resolução da genotipagem de amostras de *T. gondii*, Lehmann et al. (2004) compararam a diversidade genética em *introns* de genes constitutivos, que, espera-se, devem evoluir sob mínima seleção direta. Os polimorfismos de seqüências em *introns* de

cinco genes, actina 1 (*ACT1*), α -tubulina (*TUB1*), β -tubulina (*TUB2*), sintase dihidrofolato redutase-timidilato e *B10* foram comparados com as seqüências de regiões codificadoras e não codificadoras dos genes codificadores de antígenos de superfície *SAG2* (taquizoítos) e *MAG1* (bradizoítos). Foi observado que a variação em *introns* dos genes constitutivos não era significativamente maior do que a observada nas regiões codificadoras e não codificadoras dos genes *SAG2* e *MAG1*. Desta maneira, o baixo nível de diversidade genética do *T. gondii* observado em estudos anteriores não seria devido a marcadores de baixo polimorfismo. Os *introns* de genes constitutivos, segundo os autores, seriam melhores marcadores para estudos filogenéticos e a genotipagem com marcadores múltiplos seria preferível para tipagem de parasitos, especialmente em ambientes silvestres ou não estudados.

Microsatélites representam outra classe de marcadores genéticos, que consistem de pequenas seqüências repetitivas de dois a seis nucleotídeos. Os marcadores originados dessas repetições são altamente polimórficos devido à variação no comprimento das repetições e, como conseqüentemente apresentam múltiplos alelos, tornam-se muito informativos para estudos genéticos, filogenéticos e epidemiológicos (AJZENBERG et al., 2002a).

Costa et al. (1997) realizaram pela primeira vez um estudo com marcadores microsatélites para *T. gondii*. O polimorfismo do dinucleotídeo (TG)_n no *intron* do gene beta-tubulina foi utilizado para avaliar a correlação entre genótipo de *T. gondii* e toxoplasmose congênita humana. Trinta e quatro amostras de referência foram primeiramente examinadas, sendo sete amostras virulentas e 27 não virulentas para camundongos. As amostras virulentas apresentavam oito repetições de TG, enquanto amostras não virulentas apresentavam sete. Ao se analisarem 37 amostras de líquido amniótico de fetos infectados por *T. gondii*, todas apresentavam o marcador (TG)₇ de amostras não virulentas.

Blackston et al. (2001) descreveram seis novos *loci* altamente variáveis (M6, M33, M48, M95, M102 e M163), sendo um minissatélite e cinco microsatélites. Entre 38 isolados selecionados arbitrariamente, a média do número de alelos por *locus* foi nove, variando de três a 18, enquanto nos estudos anteriores com análise isoenzimática, RFLPs e seqüências de *introns* foram observados somente dois a quatro alelos. Mais importante, esses novos *loci* mostraram pela primeira vez uma variação intralinhagem substancial, pelo menos seis vezes maior do que a detectada por outros marcadores. Para os autores, essas novas informações facilitariam a classificação dos isolados de *T. gondii* além do nível de linhagem.

Ajzenberg et al. (2002a) genotiparam 83 amostras de *T. gondii* de origem humana e animal provenientes da Europa, América do Norte e América do Sul, utilizando oito marcadores microsatélites (*TUB2*, *TgM-A*, *W35487*, *N60608*, *N82375*, *N83021*, *N61191* e *AA519150*). Esses oito microsatélites permitiram a detecção de três a 16 alelos por *locus*. A associação dos oito marcadores permitiu a diferenciação de 72 genótipos, demonstrando o alto poder discriminatório desses microsatélites, que detectaram também infecções mistas e isolados epidemiologicamente relacionados. A análise da diversidade genética mostrou que a estrutura populacional de *T. gondii* consistiria de apenas duas linhagens clonais, denominadas grupo 1 e grupo 2. Todas as amostras do grupo I, além de apresentarem uma individualidade genética, também tinham em comum a alta virulência em camundongos e o fato de serem raramente isoladas na natureza. A diversidade genética no grupo 2 foi mais expressiva e o comportamento biológico em camundongos mais heterogêneo, com algumas amostras virulentas.

Ajzenberg et al. (2002b) estudaram a influência dos tipos genéticos na severidade da toxoplasmose congênita humana, analisando 86 isolados de *T. gondii* de pacientes de diferentes países europeus, principalmente da França (82 isolados). Utilizaram marcadores isoenzimáticos e microsatélites (AJZENBERG et al., 2002a) para a genotipagem. Os três

marcadores microssatélites menos polimórficos permitiram a classificação dos isolados nos tipos clássicos (tipos I, II e III) e também a detecção de genótipos atípicos. Foi observado que independentemente dos achados clínicos, os isolados do tipo II foram predominantes (84,88%) e o tipo I e isolados atípicos não foram encontrados nos casos assintomáticos ou benignos. Em quatro casos nos quais as crianças não foram infectadas, apesar do isolamento de *T. gondii* da placenta, foram encontrados somente isolados tipo I.

FUX et al. (2003) caracterizaram uma amostra de *T. gondii* de cão isolada no Brasil (P-Br) como recombinante do tipo I/III, usando a PCR-RFLP com marcadores múltiplos (*BI*; *ROP1*, *SAG1*, *cS10-A6*, *GRA6*, *SAG2*, *SAG3*, *L363* e *cB21-4*).

No Brasil, Ferreira (2004) analisou a variabilidade genética de 20 amostras de *T. gondii* previamente isoladas de humanos e animais (cães, galinhas, ovelha, coelho, bode e camundongo), provenientes de duas regiões (Minas Gerais e São Paulo), através de diferentes técnicas moleculares. A PCR-RFLP foi realizada em oito *loci* independentes (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BI*, *cB21-4*, *cS10-A6*, *GRA6* e *L363*). A análise pela PCR-RFLP mostrou que as amostras brasileiras apresentavam genótipos recombinantes, com alelos típicos de amostras dos tipos I, II e III na maioria dos *loci* examinados. O *locus cB21-4* apresentou o maior polimorfismo, com sete alelos entre as amostras examinadas. Foi verificado também que várias amostras apresentavam um novo haplótipo no *locus L363*. A análise dos dados gerados permitiu a divisão das amostras em dois grupos genéticos distintos associados com o fenótipo de virulência em camundongos. Amostras do grupo 1 eram altamente virulentas para camundongos BALB/c, enquanto as amostras do grupo 2, cistogênicas, apresentaram um comportamento mais heterogêneo. A autora sugere também que o impacto da recombinação genética na população brasileira de *T. gondii* parece ser maior do que nas populações da Europa e América, onde a maioria dos estudos foi realizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). A parte experimental referente ao seqüenciamento de amostras foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia no mesmo Departamento.

4.1 ISOLAMENTO DE *T. gondii* DE GATOS NATURALMENTE INFECTADOS

Os gatos foram obtidos no período de 26/03/03 a 13/12/03.

4.1.1 GATOS

Participaram do experimento 237 gatos, sendo 118 machos e 119 fêmeas; destes, 51 animais eram jovens (idade aproximada de três a oito meses) e 186 animais eram adultos (idade superior a um ano). A idade foi estimada pela inspeção de caracteres sexuais e pelo porte corporal dos animais, além da experiência clínica, uma vez que não havia dados disponíveis sobre os gatos.

Essa amostragem experimental foi proveniente de 15 municípios no estado de São Paulo, particularmente dos Centros de Controle de Zoonoses (CCZs) das Prefeituras, que autorizaram o uso experimental dos animais, consistindo de gatos não-domiciliados apreendidos ou domiciliados abandonados, que seriam sacrificados dentro da rotina de cada

CCZ ou Vigilância Sanitária; em quatro municípios, os animais eram de particulares que doaram os animais para experimentação. Na tabela 1 podem ser vistas a distribuição dos animais experimentais entre os municípios, bem como as características sexo e faixa etária dos animais. No apêndice 1 encontram-se dados referentes a todos os animais individualmente.

Tabela 1 – Número de gatos obtidos para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, segundo o município de procedência no estado de São Paulo, faixa etária e sexo. São Paulo, 2004

Município	Origem	Número de gatos examinados						TOTAL
		Jovens			Adultos			
		M	F	Total	M	F	Total	
Araçatuba	CCZ ¹	4	2	6	7	7	14	20
Araraquara	CCZ	10	2	12	2	4	6	18
Campos do Jordão	Clínica	0	0	0	4	2	6	6
Colina	Particular	1	1	2	4	0	4	6
Conchas	Particular	1	1	2	3	7	10	12
Espírito Santo do Pinhal	CCZ	3	1	4	8	8	16	20
Guaíra	VS ²	8	0	8	8	12	20	28
Guarulhos	CCZ	0	0	0	4	6	10	10
Marília	Particular	0	0	0	0	2	2	2
Osasco	CCZ	0	1	1	3	4	7	8
Pirassununga	Particular	0	2	2	9	19	28	30
Ribeirão Preto	CCZ	2	0	2	8	6	14	16
São José do Rio Preto	CCZ	1	2	3	2	3	5	8
São Paulo ³	CCZ	1	4	5	24	18	42	47
Sorocaba	CCZ	1	3	4	0	2	2	6
TOTAL		32	19	51	86	100	186	237

¹ Centro de Controle de Zoonoses

² Vigilância Sanitária

³ Dois animais provenientes de clínica veterinária

M: Macho; F: Fêmea

4.1.1.1 Colheita de sangue e eutanásia

As amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca, após sedação dos animais usando uma associação de cloridrato de quetamina 10% (20mg/kg) e xilazina 2,0%

(1,0mg/kg), ambas de uso veterinário, pela via intramuscular. Na sequência, os animais eram eutanasiados com injeção intracardíaca de embutramida e iodeto de mebezônio (0,3mL/kg) (T-61®; Intervet).

Quando a colheita prévia à eutanásia não era possível, o animal era necropsiado no laboratório para a remoção do coração, usando-se então o sangue retido na cavidade cardíaca.

Após a eutanásia, as carcaças dos animais eram colocadas individualmente em sacos plásticos, armazenadas em isopor com gelo e levadas diretamente ao laboratório. As amostras de sangue eram mantidas em temperatura ambiente até a chegada ao laboratório, onde eram centrifugadas a 2.000 g por 15 minutos para obtenção do soro.

4.1.1.2 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii*

Os soros dos gatos foram examinados através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987).

A diluição dos soros foi feita em microplaca (96 poços), usando solução salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH₂PO₄ 0,0026M; Na₂HPO₄ 0,008M), filtrada em membrana de policarbonato com 0,45µm de porosidade.

Em seguida, 150µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) eram diluídos em 2,5mL de solução alcalina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de Mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Essa mistura era então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço. Os soros diluídos eram transferidos para essa microplaca e

misturados aos reagentes (v/v). A placa era selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada durante a noite em estufa a 37°C.

A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa era anotada como resultado negativo; um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido era anotado como positivo (DESMONTS; REMINGTON, 1980).

Os animais com títulos maiores ou iguais a 25 foram considerados positivos (SILVA et al., 2002). Inicialmente, para a triagem dos animais, foram feitas diluições seriadas de 1:25 a 1:200. Os soros dos animais com títulos maiores ou iguais a 200 foram novamente diluídos seriadamente e testados até chegar ao título máximo da reação.

Em todas as reações foram usados controles positivo e negativo previamente conhecidos e controle do antígeno. O antígeno foi fornecido gentilmente pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviado por via aérea. Os soros foram mantidos em freezer a -20°C.

4.1.1.3 Digestão péptica de tecidos

Os animais soropositivos foram necropsiados para a remoção de cérebro, língua, coração e parte dos músculos da coxa para o bioensaio em camundongos; o processamento desse material seguiu o protocolo de Dubey (1998c).

Os tecidos musculares foram primeiramente cortados em pequenos pedaços, sendo removidos o tecido conectivo, a gordura e o epitélio (no caso da língua). O cérebro, a língua e o coração foram utilizados integralmente e a musculatura da coxa foi utilizada para completar 50g de tecidos. Nos animais mais jovens trabalhou-se com um total de 30 a 40g de tecidos.

O “pool” de tecidos foi homogeneizado com cinco volumes de NaCl 0,15M (salina), sendo usado um homogeneizador de uso doméstico.

Ao material homogeneizado adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1-1,2 (pepsina, 2,6g; NaCl, 5,0g; HCl, 7,0mL; água destilada suficiente para 500mL de solução), recém preparada e aquecida em banho-maria a 37°C.

A mistura foi incubada em estufa a 37°C por uma hora sobre agitador magnético.

Após a incubação, a suspensão foi coada através de duas camadas de gaze, o coado transferido para cinco tubos cônicos de 50mL e centrifugado a 1.200 g por 10 minutos.

O sobrenadante era desprezado e o sedimento de cada tubo era então neutralizado pela adição gradual de bicarbonato de sódio a 1,2%, pH~8,3, recém-preparado (ao redor de 5,0mL por tubo). A neutralização era percebida visualmente pela mudança de cor do sedimento.

Após homogeneização, o material era transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50mL com salina, e centrifugado a 1.200 g por 10 minutos.

Novamente, o sobrenadante era desprezado e o sedimento homogeneizado com salina (v/v) contendo 2000U de penicilina e 200µg de estreptomicina por mililitro.

Imediatamente a amostra era inoculada em um grupo de cinco camundongos.

4.1.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Foram usados camundongos albinos Swiss, fêmeas, com idade ao redor de dois meses, provenientes do Biotério do VPS, FMVZ, USP.

4.1.2.1 Delineamento experimental

Cada grupo era constituído de cinco camundongos, alojados na mesma caixa; cada camundongo era inoculado subcutaneamente com 1,0-1,2mL da amostra digerida, marcados em locais diferentes do corpo com ácido pícrico e observados diariamente.

Os animais que vinham a óbito eram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito no item abaixo.

Camundongos que sobreviviam até seis semanas pós-inoculação (P.I.) eram examinados sorologicamente para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997a), como descrito no item 4.1.1.2. Para isso, a colheita de sangue era feita pelo plexo retro-orbital, usando pipeta de Pasteur, após a sedação dos camundongos com uma associação de quetamina 10% (100mg/kg) e xilazina 2,0% (10mg/kg), injetada pela via intraperitoneal.

Os animais soropositivos permaneciam no experimento até dois meses P.I., quando então eram sacrificados e examinados para pesquisa de *T. gondii*; os soronegativos eram sacrificados após o resultado da sorologia ser conhecido e submetidos ao mesmo exame. O sacrifício dos camundongos foi feito através de deslocamento cervical.

Posteriormente, os soros dos animais positivos foram diluídos seriadamente e testados até chegar ao título máximo da reação.

4.1.2.2 Pesquisa de *T. gondii*

Todos os camundongos usados no bioensaio foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito previamente (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Impressões de pulmão e fragmentos de cérebro dos animais que vieram a óbito foram examinados sob microscopia de luz, entre lâmina e lamínula, para pesquisa de estágios de *T. gondii* (taquizoítos e/ou cistos). Cortava-se um fragmento de pulmão, o excesso de sangue na superfície de corte era removido e essa superfície era aplicada sobre uma lâmina com algumas gotas de salina, cobrindo-se então com uma lamínula. Fragmentos de cérebro de 3,0-5,0mm² eram comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados para pesquisa de cistos. O cérebro dos animais soropositivos e dos soronegativos eram examinados da maneira descrita acima.

Foram considerados infectados com *T. gondii*, os camundongos em que estágios do parasito foram encontrados em seus tecidos.

4.2 ANÁLISE GENOTÍPICA

Para evitar contaminações cruzadas, todo o material não descartável utilizado (vidraria, material cirúrgico), em todas as fases do experimento, era submetido à fervura com água, lavagem com detergente neutro, enxágüe em água corrente, imersão em HCl 0,1N por dois minutos, enxágüe em água destilada e esterilização em forno a 180°C por duas horas.

4.2.1 AMOSTRAS POSITIVAS (ISOLADOS)

O pulmão e/ou cérebro de cada camundongo positivo para *T. gondii* foi macerado separadamente utilizando-se gral e pistilo. Acrescentava-se, depois, 1,0mL de salina estéril. A suspensão obtida era colocada em microtubo de 2,0mL e armazenada em freezer a -70°C até o processamento para obtenção do DNA.

4.2.2 AMOSTRAS PRIMÁRIAS (GATOS)

Após a homogeneização dos tecidos dos gatos, antes de acrescentar a pepsina ácida, cinco alíquotas de 1,5mL de cada amostra foram colocadas em microtubos de 2,0mL e armazenadas em freezer a -70°C até o processamento para obtenção do DNA.

4.2.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

No quadro 3 pode ser visualizado como o material foi selecionado para cada isolado de *T. gondii* obtido em camundongos.

Material	Mortalidade no bioensaio		
	100% de óbitos	100% de sobreviventes	Óbitos e sobreviventes
processado			
Pulmão	2*	0	1
Cérebro	0	2*	1

*Ou um animal nos grupos com apenas um óbito ou um sobrevivente

Quadro 3 – Número de camundongos examinados por grupo para genotipagem de *Toxoplasma gondii*, segundo a mortalidade no bioensaio e o tecido processado. São Paulo, 2004

4.2.3.1 Protocolo de extração

A extração de DNA foi baseada nos protocolos descritos por Ausubel et al. (1999).

Após o descongelamento, separava-se uma alíquota de 100µL por amostra de camundongo para ser processada. Para as amostras primárias dos gatos foi utilizada uma alíquota de 600-700µL por amostra. Para a amostra RH (SABIN, 1941), usada como controle positivo, eram utilizados 100µL de uma suspensão obtida de lavado peritoneal de camundongos infectados experimentalmente.

As amostras foram lavadas três a quatro vezes com tampão TE (q.s.p. 1.500µL), pH 8,0 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), centrifugando-se a 15.000 g por 5 minutos.

Adicionava-se ao sedimento o tampão de extração calculado para um volume final de 500µL (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%; 10µL de proteinase K; água ultrapura autoclavada). Após homogeneização as amostras eram incubadas durante a noite em banho-seco a 37°C, com agitação automática de 15 segundos a cada 15 minutos.

Adicionava-se fenol tamponado (v/v) e centrifugava-se a 15.000 g por 5 minutos, após homogeneização. Recuperava-se o máximo de sobrenadante (fase aquosa), evitando-se a contaminação com fenol.

Acrescentavam-se fenol e clorofórmio (v/v) às amostras (v/v), que eram então homogeneizadas e centrifugadas a 15.000 g por 5 minutos, recuperando-se o máximo de sobrenadante.

Adicionava-se TE (v/v) e em seguida clorofórmio (v/v). Após nova homogeneização e centrifugação a 15.000 g por 5 minutos, recuperava-se o máximo de sobrenadante. Este era volume final de DNA obtido da amostra.

Para a insolubilização do DNA, acrescentava-se CH_3COONa 3M, pH 8,0 (1/10 do volume de amostra) e em seguida etanol absoluto ($2\times$ o volume total). Após homogeneização, as amostras eram deixadas durante a noite em freezer a -20°C .

As amostras eram centrifugadas a 4°C , 15.000 g por 25 minutos. Desprezava-se o sobrenadante e adicionavam-se $1.000\mu\text{L}$ de etanol a 70%. Repetia-se a centrifugação, o sobrenadante era descartado e os microtubos ficavam em posição invertida, até secarem completamente, em temperatura ambiente.

As amostras eram homogeneizadas com TE (1/10 do volume final de DNA obtido) e incubadas em banho-seco (pré-aquecido) a 56°C , por 10 minutos, após o que eram armazenadas em freezer a -20°C até a amplificação.

4.2.4 PCR-RFLP

A determinação dos genótipos de *T. gondii* presentes nas amostras analisadas foi feita essencialmente como descrito por Howe et al. (1997) utilizando como marcador genético a PCR-RFLP de segmentos do *locus SAG2*, localizado no cromossomo *VIII*.

Dois fragmentos do *locus* gênico mencionado acima, amplificados em PCR ou *nested*-PCR (*nPCR*), são submetidos à clivagem enzimática com as endonucleases *Sau3AI* e *HhaI*.

Os produtos dos dois ensaios em PCR ou *nPCR* produzem fragmentos de 241 e 221 pares de bases para qualquer isolado de *T. gondii*. O primeiro fragmento é oriundo da fração correspondente à região 5' e o segundo fragmento é correspondente à região 3' do *locus SAG2*.

O maior fragmento é submetido à clivagem com a enzima *Sau3AI* e o menor, à endonuclease *HhaI*. A primeira enzima permite diferenciar o tipo III dos demais, pois somente fragmentos oriundos de alelos característicos do tipo III são clivados por esta

enzima. A enzima *HhaI*, por outro lado, somente cliva fragmentos oriundos de alelos característicos do tipo II. A determinação de genótipos proposta pode ser visualizada na figura 1 e no quadro 4.

Figura 1 – Esquema representativo do *locus SAG2* mostrando a localização dos “primers” usados na *nested*-PCR para amplificação de fragmentos nas regiões 5’e 3’ do *locus* e os sítios polimórficos de restrição usados para identificação dos genótipos de *Toxoplasma gondii*. Adaptado de Howe et al. (1997).

Genótipo	Enzimas de restrição	
	<i>Sau3AI</i>	<i>HhaI</i>
Tipo I	Fragmento 5’ NÃO clivado	Fragmento 3’ NÃO clivado
Tipo II	Fragmento 5’ NÃO clivado	CLIVAGEM de fragmento 3’
Tipo III	CLIVAGEM de fragmento 5’	Fragmento 3’ NÃO clivado

Quadro 4 – Comportamento dos produtos de *nested*-PCR oriundos dos genótipos I, II e III de *Toxoplasma gondii* frente à restrição enzimática com as enzimas *Sau3AI* e *HhaI*

4.2.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

O quadro 5 relaciona os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) usados na PCR e *n*PCR.

PCR	Nome do “primer”	Seqüência de bases
5’PCR primária	<i>SAG2</i> F4	5’ GCTACCTCGAACAGGAACAC 3’
	<i>SAG2</i> R4 (“primers” externos 1 e 2)	5’ GCATCAACAGTCTTCGTTGC 3’
3’PCR primária	<i>SAG2</i> F3	5’ TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC 3’
	<i>SAG2</i> R3 (“primers” externos 1 e 2)	5’ TCAAAGCGTGCATTATCGC 3’
5’ <i>nested</i> -PCR	<i>SAG2</i> F	5’ GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 3’
	<i>SAG2</i> R2 (“primers” internos 1 e 2)	5’ GCAAGAGCGAAGTTGAACAC 3’
3’ <i>nested</i> -PCR	<i>SAG2</i> F2	5’ ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3’
	<i>SAG2</i> R (“primers” internos 1 e 2)	5’ AACGTTTCACGAAGGCACAC 3’

* Fonte: Howe et al. (1997)

Quadro 5 – Nomes e seqüências dos “primers” usados na PCR e *nested*-PCR para amplificação de fragmentos do gene *SAG2* de *Toxoplasma gondii**

4.2.4.2 PCR – Delineamento e Reagentes

A amostra RH (SABIN, 1941), mantida em camundongos no VPS, foi utilizada como controle positivo do genótipo tipo I; o controle positivo do genótipo tipo II era um isolado de veado e o controle positivo do genótipo tipo III era um isolado de gambá. O DNA destes isolados foi fornecido gentilmente pelo Prof. Dr. J. P. Dubey (USDA, Beltsville, Maryland).

Para as amostras de camundongos e para o controle positivo do genótipo tipo I (amostra RH, mantida em camundongos no VPS) não foi necessária a realização da *n*PCR, pois se obteve uma boa detecção apenas com uma amplificação. Assim, para as amostras

citadas, foi realizada a PCR diretamente com os “primers” internos, tanto no ensaio para a região 5’, como no ensaio para a região 3’ do *locus SAG2*, obtendo-se diretamente os fragmentos amplificados de 241 e 221 pares de bases, respectivamente, necessários para a análise de restrição.

Para as amostras primárias e para os controles positivos dos genótipos II e III foi feita a PCR seguida de *n*PCR.

A fim de evitar contaminações, os controles positivos dos genótipos tipo II e tipo III foram processados separadamente (10 amplificações para cada genótipo), em dias diferentes. Após análise do produto amplificado em gel de agarose a 2,0%, estes controles foram armazenados em freezer a -20°C até o uso na análise de restrição.

A seguinte mistura de reagentes foi utilizada para uma reação em 50 μL :

- ⇒ 25, 2 μL de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 5,0 μL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- ⇒ 8,0 μL da mistura de dNTPs (200 μM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- ⇒ 2,5 μL do “primer” interno ou externo 1 (10pmol/ μL)
- ⇒ 2,5 μL do “primer” interno ou externo 2 (10pmol/ μL)
- ⇒ 1,5 μL de MgCl_2 (50mM)
- ⇒ 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase
- ⇒ 5,0 μL da amostra de DNA extraído – para as amostras de pulmão e para a amostra RH, o DNA foi utilizado na diluição de 1:100; para as amostras de cérebro e para os controles tipos II e III, o DNA foi utilizado na diluição de 1:10 e para as amostras primárias, o DNA foi utilizado não diluído.

A fim de otimizar a reação no ensaio para a região 3’, foi utilizado 5,0 μL de cada “primer” interno para as amostras de camundongos e para a amostra RH.

A cada corrida de PCR foi incluído um controle positivo (amostra tipo I - RH) e pelo menos dois controles negativos (água ultrapura autoclavada). Para as amostras primárias eram colocados pelo menos três controles negativos.

4.2.4.3 Nested-PCR

A seguinte mistura de reagentes foi utilizada para uma reação em 50 μ L:

- ⇒ 29, 2 μ L de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 5 μ L de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- ⇒ 8,0 μ L da mistura de dNTPs (200 μ M de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- ⇒ 2,5 μ L do “primer” interno 1 (10pmol/ μ L)
- ⇒ 2,5 μ L do “primer” interno 2 (10pmol/ μ L)
- ⇒ 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM)
- ⇒ 0,3 μ L de *Taq* DNA polimerase
- ⇒ 1,0 μ L da amostra de DNA amplificado da PCR (na diluição de 1:10)

4.2.4.4 Ciclo empregado

Desnaturação inicial: 94°C por 30 segundos

Desnaturação: 94°C por 20 segundos

Hibridização: 60°C por 25 segundos

Extensão: 72°C por 25 segundos

Esse ciclo se repete mais 39 vezes a partir da desnaturação.

Extensão final: 72°C por 5 minutos

4.2.4.5 Análise do produto amplificado

Os produtos originados pela PCR ou *n*PCR foram dispostos em um gel de agarose a 2,0% em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases e, em seguida, submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µl de cada amostra.

Após a corrida eletroforética, o gel era corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 ug/mL) por 30 minutos, lavado em água destilada por 30 minutos e observado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas. A documentação fotográfica foi feita com câmera digital (sistema DC-40 - Kodak - New York - USA) ou através de analisador de gel (Image Master® UDS - Pharmacia Biotech).

4.2.4.6 RFLP

A mistura para 20µL de reação era preparada segundo o protocolo descrito a seguir.

Para os isolados obtidos em camundongos e amostra RH:

Região 5':

- ⇒ 2,5µL (10 unidades) de *Sau3*AI (BioLabs)
- ⇒ 2,0µL de tampão NE 10× (BioLabs)
- ⇒ 0,2µL de BSA 100× (BioLabs)
- ⇒ 5,3µL de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 10,0µL de DNA (2,0µL de DNA para os controles tipos II e III)

Região 3':

- ⇒ 1,0μL (20 unidades) de *HhaI* (BioLabs).
- ⇒ 2,0μL de tampão 4NE 10× (BioLabs)
- ⇒ 0,2μL de BSA 100× (BioLabs)
- ⇒ 6,8μL de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 10,0μL de DNA (5,0μL de DNA para os controles tipos II e III)

Para as amostras primárias dos gatos e controles positivos:

Região 5':

- ⇒ 2,0μL (10 unidades) de *MboI* (isoesquisômero *Sau3AI*) (Fermentas Life Sciences)
- ⇒ 2,0μL de tampão R⁺ 10× (Fermentas Life Sciences)
- ⇒ 14,0μL de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 2,0μL de DNA

Região 3':

- ⇒ 1,0μL (20 unidades) de *HhaI* (BioLabs).
- ⇒ 2,0μL de tampão 4NE 10× (BioLabs)
- ⇒ 0,2μL de BSA 100× (BioLabs)
- ⇒ 11,8μL de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 5,0μL de DNA

Eventualmente, a quantidade de DNA era reajustada, se na análise do produto amplificado observava-se uma banda fraca ou muito intensa.

As amostras eram incubadas em banho-maria a 37°C por duas horas.

Após a incubação, as amostras eram novamente submetidas à análise em gel de agarose a 2,0%, como descrito no item anterior. Em cada corrida eletroforética havia um controle positivo dos genótipos I, II e III.

4.2.5 ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO

A análise por sequenciamento foi feita nas amostras que exibiram um padrão de digestão parcial na RFLP.

As reações de sequenciamento foram realizadas a partir dos produtos de PCR para os isolados e a partir dos produtos de *n*PCR para as amostras primárias dos gatos.

4.2.5.1 Purificação, quantificação de DNA e reação de sequenciamento

A banda com o fragmento de tamanho esperado em gel de agarose a 2,0% (item 4.2.4.5) era recortada com lâmina de bisturi não utilizada anteriormente (aproximadamente 300mg de material).

Para a purificação do DNA a partir do gel, foi utilizado o “kit” GFX™ (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante, mas aumentando-se os tempos de centrifugações para três minutos.

A quantificação foi feita utilizando-se 5,0µL do DNA purificado. O material foi examinado conforme o item 4.2.4.5, usando como padrão o *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder* (MBI Fermentas).

As intensidades de bandas obtidas do DNA purificado eram comparadas visualmente com aquelas do padrão. A concentração de DNA (em nanogramas) das amostras eram determinadas de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante do padrão citado acima.

Na reação de sequenciamento foi utilizado o “kit” ABI PRISM™ BigDye Terminator™ (Applied Biosystems); foram misturados 6,0ng de DNA purificado, 2,0µL de

BigDye™ v. 3.1, 1,0µL de Tampão Save Money 5× (Tris-HCl 400mM; MgCL₂ 10mM, pH 9,0), 2,0pmol do “primer” (senso ou anti-senso) e água q.s.p. 10µL.

As amostras foram então submetidas ao seguinte programa do termociclador:

Desnaturação inicial: 96°C por um minuto

Desnaturação: 96°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/s

Hibridização: 50°C por 15 segundos

Rampa: 1,0°C/s

Extensão: 60°C por quatro minutos

Rampa: 1,0°C/s

Este ciclo se repete mais 34 vezes a partir da desnaturação. As amostras são mantidas a 4°C até a próxima etapa.

4.2.5.2 Precipitação com isopropanol e etanol

Adicionavam-se 40µL de isopropanol a 75% (v/v em água) em cada amostra. Após homogeneização, as amostras eram mantidas em temperatura ambiente (local escuro) por 15 minutos e em seguida centrifugadas a 12.000 g por 25 minutos.

O isopropanol era removido com pipeta e adicionavam-se 250µL de etanol a 70% (v/v em água). Após homogeneização, as amostras eram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos.

O etanol era removido com pipeta e as amostras, então, eram colocadas em banho-seco a 80°C por 2 minutos.

As amostras eram mantidas a -20°C até o momento do seqüenciamento.

4.2.5.3 Preparo das amostras para seqüenciamento

As amostras foram homogeneizadas com formamida, colocadas em banho-seco a 95°C por 3 minutos, mantidas em banho de gelo por 2 minutos e em seguida aplicadas para o seqüenciamento.

O seqüenciamento foi realizado mediante o protocolo contido no manual técnico do equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). As seqüências foram posteriormente visualizadas usando o programa BioEdit v. 5.0.6 (© 1997-2001 Tom Hall).

4.3 PESQUISA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma-Hammondia*

Amostras de fezes de todos os animais foram colhidas diretamente do reto durante a necropsia para a realização de exame coproparasitológico. Foi realizada uma técnica de flutuação em solução de sacarose (d=1,203) (OGASSAWARA; BENASSI, 1980), centrifugando-se as amostras a 400 g por 10 minutos.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Possíveis associações entre faixas etárias ou sexo e presença de *T. gondii*, e possíveis associações entre número total de camundongos sobreviventes e número total de óbitos segundo o genótipo foram verificadas através do teste Qui-quadrado. Foi utilizado o programa estatístico MINITAB™ (MINITAB INC.).

Possíveis associações entre títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos gatos e isolamento do parasito nos bioensaios, e possíveis associações entre títulos de anticorpos anti-*T. gondii* nos camundongos sobreviventes e genótipo foram verificadas através do Teste de Mann-Whitney. Foi utilizado o mesmo programa citado anteriormente.

A comparação entre número de grupos com camundongos sobreviventes e número de grupos sem camundongos sobreviventes foi feita através do Teste Exato de Fisher. Utilizou-se o programa EPI-INFO 6 (CDC, USA).

Para a análise de sobrevida dos camundongos foi utilizado o Teste de Kaplan-Meier. Foi utilizado o programa SPSS 10 (SPSS INC.).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 SOROLOGIA DOS GATOS (MAT)

Dos 237 gatos examinados, 84 (35,4%) foram positivos para anticorpos anti-*T. gondii*.

A distribuição dos animais soropositivos, segundo o município de procedência e o sexo, encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição da frequência de gatos soropositivos para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* através do teste de aglutinação modificado (MAT), segundo o sexo e o município de procedência no estado de São Paulo. São Paulo, 2004

Município	Nº de gatos examinados	Gatos soropositivos*			%
		Número			
		Machos	Fêmeas	Total	
Araçatuba	20	3	2	5	25,0
Araraquara	18	0	2	2	11,1
Campos do Jordão	6	2	1	3	50,0
Colina	6	4	0	4	66,7
Conchas	12	3	6	9	75,0
Espírito Santo do Pinhal	20	7	5	12	60,0
Guaíra	28	7	8	15	53,6
Guarulhos	10	0	0	0	0,0
Marília	2	0	2	2	100,0
Osasco	8	2	1	3	37,5
Pirassununga	30	2	7	9	30,0
Ribeirão Preto	16	1	4	5	31,2
São José do Rio Preto	8	2	1	3	37,5
São Paulo	47	4	7	11	23,4
Sorocaba	6	0	1	1	16,7
Total (%)	237	37 (31,4)	47 (39,5)	84	35,4

*Título ≥ 25

Entre os animais jovens, 13,7% (7/51) foram soropositivos, sendo três animais de Espírito Santo do Pinhal e quatro animais, respectivamente, dos municípios de Colina, Guaíra, Pirassununga e São José do Rio Preto. Os adultos apresentaram soropositividade de 41,4% (77/186). Houve diferença estatística significativa entre as proporções de animais positivos jovens e adultos ($p<0,001$).

Em relação ao sexo, 31,4% (37/118) dos machos foram positivos e 39,5% (47/119) das fêmeas foram positivas. Não foi observada diferença estatística significativa entre machos e fêmeas soropositivos ($p=0,189$).

A proporção de resultados positivos segundo a faixa etária e o sexo dos gatos é apresentada no gráfico 1.

Gráfico 1 – Proporção de gatos soropositivos para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, segundo o sexo e faixa etária. São Paulo, 2004

Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* obtidos variaram de 25 a 12.800, sendo que 83,3% (70 animais) dos soropositivos apresentaram títulos de 25 a 800 e 16,7% (14 animais)

apresentaram títulos de 1.600 a 12.800. Os resultados referentes à distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo. São Paulo, 2004

Título	Número de gatos soropositivos	%
25	9	10,7
50	10	11,9
100	12	14,3
200	8	9,5
400	12	14,3
800	19	22,6
1.600	6	7,1
3.200	4	4,8
6.400	2	2,4
12.800	2	2,4
Total	84	100

5.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO DE *T. gondii*

A partir dos gatos soropositivos foram realizados 71 bioensaios em camundongos, sendo 65 deles com tecidos de gatos adultos e seis com tecidos de gatos jovens.

Obteve-se um total de 47 isolados de *T. gondii*. Desse total, 43 isolados foram provenientes de tecidos de gatos adultos e quatro de animais jovens (seis a oito meses). Na tabela 4 pode ser observada a distribuição do número de isolados entre os municípios.

Tabela 4 – Número de bioensaios de tecidos de gatos realizados em camundongos e número de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos, segundo o município de procedência dos gatos no estado de São Paulo. São Paulo, 2004

Município	Número de bioensaios em camundongos*	Número de isolados
Araçatuba	5	4
Araraquara	2	0
Campos do Jordão	3	0
Colina	3	1
Conchas	9	7
Espírito Santo do Pinhal	11	8
Guaíra	11	5
Marília	2	2
Osasco	2	2
Pirassununga	9	6
Ribeirão Preto	5	4
São José do Rio Preto	2	2
São Paulo	7	6
Total	71	47

* cada bioensaio correspondendo a um gato soropositivo

Na figura 2, pode ser visualizada a localização de 11 municípios de procedência dos gatos no estado de São Paulo e o respectivo número de isolados de *T. gondii* obtidos pelo bioensaio em camundongos.

Figura 2 - Mapa do estado de São Paulo indicando a localização de 11 municípios e o número correspondente de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – VPS - FMVZ - USP.

Na tabela 5 estão descritas as relações entre os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos gatos e o número de isolados obtidos. No gráfico 2 podem ser observadas as proporções de isolamentos segundo o título de anticorpos dos gatos. Observou-se uma diferença estatística significativa entre número de isolamentos e título de anticorpos ($p=0,001$). Os títulos mais elevados foram associados com um número maior de isolamentos.

Tabela 5 – Número de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados, segundo o título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* dos gatos e o número respectivo de bioensaios realizados em camundongos. São Paulo, 2004

Título	Número de isolados	Número de bioensaios
25	1	6
50	2	7
100	7	11
200	5	8
400	8	9
800	13	17
1.600	5	5
3.200	2	4
6.400	2	2
12.800	2	2
Total	47	71

Gráfico 2 – Porcentagem de isolamentos de *Toxoplasma gondii* de gatos através de bioensaio em camundongos, segundo título de anticorpos anti-*T. gondii* dos gatos. São Paulo, 2004

No total, 82,1% (193/235) dos camundongos inoculados foram infectados por *T. gondii*. Os óbitos dos camundongos por toxoplasmose ocorreram dos dias 10 ao 41 P.I., com médias por grupo variando de 11,4 a 38 dias. A média geral foi de 19 dias P.I.

Todos os camundongos sorologicamente negativos não estavam infectados com *T. gondii*, não sendo encontrados cistos do parasito nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente.

Todos os camundongos sorologicamente positivos sobreviveram até o término do período experimental e todos estavam infectados com *T. gondii*, sendo encontrados cistos do parasito nos fragmentos de cérebro examinados microscopicamente.

Dos 20 grupos nos quais houve camundongo(s) infectado(s) sobrevivente(s), oito grupos apresentaram pelo menos um animal visivelmente debilitado e com baixo desenvolvimento. Nesses oito grupos houve óbitos por toxoplasmose.

A porcentagem de óbitos por toxoplasmose entre os camundongos infectados foi de 20-80% em 11 grupos, 100% em 27 grupos e em nove grupos não ocorreram óbitos (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de grupos de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* após inoculação com tecidos de gatos soropositivos para *Toxoplasma gondii*, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose. São Paulo, 2004

Porcentagem (%) de óbitos ¹	0	20	40	50	60	75	80	100	Total
Número de grupos infectados ²	9	1	1	1	2	2	4	27	47

¹ Número de óbitos/ Número de infectados

² 5 camundongos inoculados por grupo

Na tabela 7 encontram-se detalhados os dados relativos aos 47 isolados, considerando os 11 municípios de procedência dos gatos.

Tabela 7 – Isolamento de *Toxoplasma gondii* de gatos através de bioensaio em camundongos, segundo município de procedência no estado de São Paulo e títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* dos gatos. São Paulo, 2004

Município	Nº do gato	Título de anticorpos	Bioensaio em camundongos ^s			
			Nº de óbitos / Nº de infectados	% de óbitos	Sobrevida (dias P.I.)*	Média
Araçatuba	121	3200	2 / 5 [†]	40	17-18	17,5
	61	800	2 / 4 [†]	50	23-26	24,5
	123	800	5 / 5	100	13-14	13,6
	126	800	5 / 5	100	17-22	20,0
Colina	107	400	5 / 5	100	13-21	17,8
Conchas	252	1600	4 / 5 [†]	80	13-20	15,8
	253	200	4 / 5 [†]	80	14-34	21,5
	249	400	3 / 3	100	15-33	22,7
	251	200	5 / 5	100	10-13	11,4
	254	100	1 / 1	100	17	17,0
	255	12800	5 / 5	100	11-16	13,2
	256	200	2 / 2	100	14-16	15,0
Espírito Santo do Pinhal	85	200	0 / 1	0	Sobreviveu	0,0
	165	100	4 / 5 [†]	80	19-26	22,0
	86	3200	5 / 5	100	16-19	17,2
	162	400	5 / 5	100	16-19	17,6
	164	400	4 / 4	100	18-30	25,0
	166	800	5 / 5	100	16-19	17,0
	169	800	4 / 4	100	17-21	19,5
	174	100	5 / 5	100	13-17	14,6
Guaíra	96	1600	0 / 1	0	Sobreviveu	0,0
	151	800	0 / 5	0	Sobreviveram	0,0
	158	1600	0 / 3	0	Sobreviveram	0,0
	98	1600	1 / 1	100	31	31,0
	152	800	5 / 5	100	14-26	19,6
Marília	257	100	0 / 5	0	Sobreviveram	0,0
	258	200	1 / 5	20	40	40,0
Osasco	77	100	0 / 5	0	Sobreviveram	0,0
	81	6400	0 / 4	0	Sobreviveram	0,0

Município	Nº do gato	Título de anticorpos	Bioensaio em camundongos [§]			
			Nº de óbitos / Nº de infectados	% de óbitos	Sobrevida (dias P.I.)*	Média
Pirassununga	198	12800	3 / 5	60	14-34	22,6
	210	50	3 / 4	75	18-37	27,3
	220	100	3 / 4 [†]	75	15-24	19,0
	216	25	4 / 5 [†]	80	14-16	14,8
	208	50	5 / 5	100	10-15	11,6
	188	400	5 / 5	100	13-17	14,6
Ribeirão Preto	177	400	0 / 5	0	Sobreviveram	0,0
	178	800	0 / 5	0	Sobreviveram	0,0
	141	800	1 / 1	100	17	17,0
	179	800	5 / 5	100	17-20	18,2
S. J. do Rio Preto	135	400	3 / 5 [†]	60	16-30	22,0
	133	6400	5 / 5	100	16-33	22,4
São Paulo	1	800	1 / 1	100	21	21,0
	2	800	5 / 5	100	14-27	19,4
	11	800	3 / 3	100	19-32	25,3
	15	1600	5 / 5	100	18-26	20,8
	18	400	2 / 2	100	35-41	38,0
	19	100	5 / 5	100	19-28	24,8

Nº: Número

§ Cinco camundongos inoculados por grupo

* Pós-inoculação

† Pelo menos um sobrevivente com aspecto visivelmente debilitado

5.3 ANÁLISE GENOTÍPICA

5.3.1 PCR-RFLP – AMOSTRAS POSITIVAS (ISOLADOS)

Através da análise de restrição, em segmentos do *locus SAG2*, foram identificados os genótipos tipo I, tipo III e algumas amostras apresentaram padrões de genótipo misto (tipo I e tipo III) ou de digestão parcial, sendo submetidas, posteriormente à análise por sequenciamento.

Na figura 3, podem ser visualizados os padrões observados na PCR-RFLP para a diferenciação dos genótipos tipo I e tipo III a partir dos isolados obtidos em camundongos.

Figura 3 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números dos gatos correspondentes aos isolados. C=cérebro; P= pulmão. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas).

Em um dos grupos examinados (gato 257), os dois camundongos (513 e 514) apresentaram padrões diferentes de digestão enzimática (Figura 4).

Figura 4 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números dos gatos correspondentes aos isolados. C=cérebro; P= pulmão. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras 513C e 514C (gato 257) exibem padrões de digestão parcial ou infecção mista (tipo I e tipo III) e de genótipo tipo I, respectivamente.

Foi então realizada uma nova extração de DNA, agora de todos os camundongos infectados desse grupo (números 511 a 515), e uma nova PCR-RFLP. Nessa nova análise, a digestão foi feita com o dobro da quantidade da endonuclease *Sau3A*I (20U). Outras cinco PCRs independentes foram feitas com a amostra do camundongo 514. Três camundongos apresentaram padrão de digestão parcial ou infecção mista (511, 513 e 515), um apresentou padrão de genótipo tipo III (512) e o camundongo número 514 continuou apresentando padrão de genótipo tipo I (Figura 5). Estas amostras foram posteriormente submetidas à análise por sequenciamento.

Figura 5 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem do isolado de *Toxoplasma gondii* obtido do gato 257. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3A*I, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *Hha*I, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos. C=cérebro. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). As amostras 511C, 513C e 515C exibem padrões de digestão parcial ou infecção mista (tipo I e tipo III), a amostra 512C exhibe padrão de genótipo tipo III e a amostra 514C exhibe padrão de genótipo tipo I.

5.3.2 PCR-RFLP – AMOSTRAS PRIMÁRIAS (GATOS)

A *n*PCR foi feita diretamente com 46 amostras dos gatos (homogeneizados de tecidos), correspondendo aos isolados em camundongos. Dessas amostras, 37 (80,4%) puderam ser amplificadas e depois caracterizadas pela RFLP do *locus SAG2*. Os resultados foram idênticos aos obtidos na genotipagem dos isolados (Tabela 8). Em cinco das amostras nas quais não se obteve sucesso na amplificação do DNA, o número de camundongos infectados foi de um a três, sugerindo baixo número de parasitos nessas amostras.

Os padrões observados na *n*PCR-RFLP para a diferenciação dos genótipos tipo I e tipo III a partir das amostras primárias podem ser visualizados nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 6 – *n*PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente a partir de amostras primárias de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos gatos. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas).

Figura 7 – *n*PCR-RFLP do locus *SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente a partir de amostras primárias de gatos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos gatos. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras dos gatos 177 e 178 exibem padrões de digestão parcial ou de infecção mista (tipo I e tipo III).

As amostras dos gatos 177 e 178 (Figura 7) apresentaram padrões de digestão parcial ou de infecção mista (tipo I e tipo III), sendo submetidas posteriormente à análise por seqüenciamento. A PCR-RFLP dos isolados correspondentes havia caracterizado as amostras como tipo III.

Como a análise de PCR-RFLP do isolado do gato 257 apresentou resultados contraditórios (Figuras 4 e 5), o processamento da amostra primária desse animal foi feito isoladamente desde a extração de DNA, a fim de excluir qualquer possibilidade de contaminação. O DNA foi extraído em cada uma das cinco alíquotas armazenadas. O resultado da análise da *n*PCR-RFLP pode ser visto na figura 8.

Figura 8 – *n*PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente de amostras primárias do gato 257 (alíquotas A-E). (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *Sau3AI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras 257A, C e D exibem padrões de genótipo tipo III, a amostra 257B exibe padrão de infecção mista (tipo I e tipo III) e a amostra 257E exibe padrão de genótipo tipo I.

As cinco amostras do gato 257 também apresentaram diferentes padrões de digestão enzimática, como observado no exame do isolado em camundongos, sugerindo tratar-se de infecção mista (tipo I e tipo III). Estas amostras também foram analisadas por seqüenciamento para confirmação dessa suspeita.

5.3.3 ANÁLISE POR SEQÜENCIAMENTO

A análise por seqüenciamento foi realizada utilizando-se os produtos da PCR do fragmento 5' do *locus SAG2*.

No isolado de *T. gondii* obtido do gato 257, observou-se que três camundongos estavam infectados com o genótipo tipo III (512, 513 e 515). Desta maneira, os padrões de digestão observados com os animais 513 e 515 (Figura 5), correspondiam à digestão parcial com a enzima *Sau3AI*. Foram confirmados que o animal 514 estava infectado com o genótipo tipo I e que o padrão de digestão observado com o animal 511 tratava-se de infecção mista com os genótipos tipo I e tipo III.

Na figura 9, estão os cromatogramas parciais observados no seqüenciamento de DNA das amostras acima citadas, mostrando a região onde se localiza o sítio de polimorfismo reconhecido pela enzima *Sau3AI*.

Figura 9 – Análise de seqüências de DNA de produtos da PCR do fragmento 5' do *locus SAG2*, para genotipagem do isolado de *Toxoplasma gondii* do gato 257 obtido em camundongos. As setas indicam a localização do sítio polimórfico. (A) amostra 514: genótipo tipo I, sem sítio de restrição para a enzima *Sau3AI* (GATT). (B) padrão das amostras 512, 513 e 515: genótipo tipo III, com sítio de restrição para a enzima *Sau3AI* (GATC); (C) amostra 511: genótipo misto (tipo I e tipo III), com presença de dois picos no sítio de polimorfismo (bases Citosina e Timidina), que o programa reconhece como “N”. Seqüenciamento: ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Figura 10 – Análise de seqüências de DNA de produtos da PCR do fragmento 5' do *locus SAG2*, para genotipagem de *Toxoplasma gondii* de amostras primárias do gato 257. As setas indicam a localização do sítio polimórfico. (A) 257B: o programa reconheceu a base Citosina no sítio de polimorfismo, mas é evidente a presença de um pico com a base Timidina, caracterizando um genótipo misto (tipo I e tipo III). (B) 257E: o programa reconheceu a base Timidina no sítio polimórfico, mas é evidente a presença de um pico com a base Citosina, caracterizando um genótipo misto (tipo I e tipo III). Seqüenciamento: ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Em relação às amostras primárias do gato 257 (alíquotas “A” a “E”), as alíquotas “A”, “C” e “D” apresentavam o genótipo tipo III (padrão de seqüenciamento da Figura 9B), como observado na PCR-RFLP. As alíquotas “B” e “E” apresentavam genótipo misto (tipo I e tipo III), indicando que o padrão observado para a alíquota “B” não era devido à digestão parcial

com a enzima *Sau3AI* (Figura 10). A diferença de resultados observada para a alíquota “E” na *nPCR-RFLP* e no seqüenciamento sugere que o DNA do genótipo tipo III poderia estar em quantidade menor nesta amostra, uma vez que não foi detectado na RFLP.

Os resultados das análises desse isolado e das amostras primárias do gato permitiram observar que amostras com infecção mista podem originar infecções únicas em camundongos. Assim, a análise genotípica de um único camundongo por isolado poderia deixar passar esses genótipos mistos.

A observação direta dos cromatogramas com as seqüências de DNA permitiu que as amostras 257B e 257E fossem reconhecidas como mistas, o que não teria sido possível unicamente pelo exame da seqüência de nucleotídeos.

O exame de diferentes alíquotas da mesma amostra primária também permitiu a observação de que diferentes resultados podem ser obtidos no caso de tecidos com mais de um genótipo de *T. gondii*.

A análise por seqüenciamento das amostras primárias dos gatos 177 e 178 revelou que o padrão observado na RFLP-PCR foi devido à digestão parcial com a enzima *Sau3AI*, uma vez que essas amostras apresentaram o padrão de genótipo tipo III, como o observado na figura 9B.

5.3.3 GENÓTIPOS DE *T. gondii* EM GATOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

Dos 47 isolados de *T. gondii* genotipados, 34 (72,4%) eram tipo I, 12 (25,5%) eram tipo III e um isolado (2,1%) apresentava infecção mista com os genótipos tipo I e tipo III (Gráfico 3). Não foi encontrado nenhum isolado com genótipo tipo II.

Dos 11 municípios examinados, em cinco foram isolados tanto o genótipo tipo I como o genótipo tipo III (Araçatuba, Guaiara, Pirassununga, Ribeirão Preto e São Paulo); em quatro municípios só foram encontrados isolados com genótipo tipo I (Colina, Conchas, Espírito Santo do Pinhal e São José do Rio Preto); em um município (Osasco) os isolados eram do tipo III e em outro município (Marília) havia um isolado tipo I e outro misto (tipo I e tipo III).

A localização dos municípios de origem dos isolados e a distribuição dos genótipos entre eles encontram-se na figura 11.

Gráfico 3 – Distribuição do número de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados, segundo o genótipo, determinado pela PCR-RFLP do locus *SAG2*. São Paulo, 2004

A distribuição dos genótipos segundo os municípios de origem dos isolados e a mortalidade em camundongos encontram-se na tabela 8.

Figura 11 - Mapa do estado de São Paulo indicando a localização de 11 municípios e o número correspondente de isolados de *Toxoplasma gondii* de gatos naturalmente infectados, segundo o genótipo no *locus* SAG2. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – VPS - FMVZ - USP.

Tabela 8 – Genótipos de *Toxoplasma gondii* de isolados e amostras primárias de gatos naturalmente infectados, determinados pela PCR-RFLP do *locus SAG2*, segundo o município de procedência no estado de São Paulo e a mortalidade em camundongos. São Paulo, 2004

Município	Nº do gato	Bioensaio em camundongos [§]			Genótipo	
		% de óbitos	Sobrevida (dias P.I.)*	Média	Isolado	Amostra primária
Araçatuba	121	40 [†]	17-18	17,5	I	I
	61	50 [†]	23-26	24,5	I	ND
	123	100	13-14	13,6	I	I
	126	100	17-22	20,0	III	III
Colina	107	100	13-21	17,8	I	SM
Conchas	252	80 [†]	13-20	15,8	I	I
	253	80 [†]	14-34	21,5	I	I
	249	100	15-33	22,7	I	I
	251	100	10-13	11,4	I	I
	254	100	17	17,0	I	ND
	255	100	11-16	13,2	I	I
	256	100	14-16	15,0	I	ND
Espírito Santo do Pinhal	85	0	Sobreviveu	0,0	I	ND
	165	80 [†]	19-26	22,0	I	I
	86	100	16-19	17,2	I	I
	162	100	16-19	17,6	I	I
	164	100	18-30	25,0	I	ND
	166	100	16-19	17,0	I	I
	169	100	17-21	19,5	I	I
	174	100	13-17	14,6	I	I
Guaíra	96	0	Sobreviveu	0,0	III	III
	151	0	Sobreviveram	0,0	III	III
	158	0	Sobreviveram	0,0	III	ND
	98	100	31	31,0	I	I
	152	100	14-26	19,6	I	I
Marília	257	0	Sobreviveram	0,0	I + III	I + III
	258	20	40	40,0	I	I
Osasco	77	0	Sobreviveram	0,0	III	III
	81	0	Sobreviveram	0,0	III	III

Município	Nº do gato	Bioensaio em camundongos [§]			Genótipo	
		(%) de óbitos	Sobrevida (dias P. I.)*	Média	Isolado	Amostra primária
Pirassununga	198	60	14-34	22,6	III	III
	210	75	18-37	27,3	I	I
	220	75 [†]	15-24	19,0	I	ND
	216	80 [†]	14-16	14,8	I	I
	208	100	10-15	11,6	I	I
	188	100	13-17	14,6	I	I
Ribeirão Preto	177	0	Sobreviveram	0,0	III	III
	178	0	Sobreviveram	0,0	III	ND
	141	100	17	17,0	I	ND
	179	100	17-20	18,2	III	III
S. J. do Rio Preto	135	60 [†]	16-30	22,0	I	I
	133	100	16-33	22,4	I	I
São Paulo	1	100	21	21,0	I	I
	2	100	14-27	19,4	I	I
	11	100	19-32	25,3	III	III
	15	100	18-26	20,8	I	I
	18	100	35-41	38,0	I	I
	19	100	19-28	24,8	III	III

Nº: Número

§ Cinco camundongos inoculados por grupo

* Pós-inoculação

† Pelo menos um sobrevivente com aspecto visivelmente debilitado

ND: Não detectado na PCR

SM: Sem amostra para exame

A distribuição dos genótipos de *T. gondii* segundo a porcentagem de óbitos nos grupos de camundongos pode ser vista na tabela 9 e no gráfico 4.

Tabela 9 – Distribuição dos genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose nos grupos de camundongos inoculados. São Paulo, 2004

% de óbitos	Genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i>			Total
	Tipo I	Tipo III	Tipo I + Tipo III	
0	1	7	1	9
20-80	10	1	0	11
100	23	4	0	27
Total	34	12	1	47

Gráfico 4 – Distribuição dos genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose nos grupos. São Paulo, 2004

Estatisticamente houve diferença na proporção de grupos com óbitos de camundongos no genótipo tipo I (97%) em relação ao genótipo tipo III (42%) ($p < 0,001$).

Os oito grupos de camundongos que apresentavam animais sobreviventes visivelmente doentes estavam infectados com o genótipo tipo I. No único grupo de genótipo

tipo I em que não houve óbitos por toxoplasmose, só um animal foi infectado, sugerindo baixo número de parasitos na amostra inoculada.

Considerando o total de camundongos infectados nos 47 grupos, 70,1% (137/193) apresentavam o genótipo tipo I, 26,4% apresentavam o genótipo tipo III (51/193) e 2,3% (5/193) tinham o genótipo tipo I + tipo III.

Na tabela 10 e no gráfico 5 pode ser vista a distribuição dos genótipos entre os camundongos infectados que sobreviveram e os que vieram a óbito durante o período experimental.

Tabela 10 – Distribuição dos genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a condição de sobrevivência dos camundongos infectados durante o período experimental. São Paulo, 2004

Condição	Genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i>			Total
	Tipo I	Tipo III	Tipo I + Tipo III	
Óbito	119	21	0	140
Sobrevivência	18	30	5	53
Total	137	51	5	193

Gráfico 5 – Distribuição dos genótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos naturalmente infectados no estado de São Paulo, segundo a condição de sobrevivência dos camundongos infectados durante o período experimental. São Paulo, 2004

As proporções de óbitos em camundongos com genótipo tipo I (86,8%) em relação ao tipo III (41,2%) são significativamente diferentes estatisticamente ($p < 0,001$).

Dos 18 camundongos sobreviventes com genótipo tipo I, 12 estavam visivelmente debilitados; dos 30 sobreviventes com genótipo tipo III, nenhum apresentava sinal clínico de doença. Os animais com infecção mista (tipo I e tipo III) não apresentavam sinais de doença clínica.

Em todos os grupos com camundongos infectados, foram encontrados cistos de *T. gondii* no cérebro dos camundongos. Quatro animais pertencentes ao genótipo tipo I, de grupos diferentes, aparentemente não tinham cistos no cérebro (óbitos entre 11 e 13 dias P. I.).

Em relação à sobrevivência, 93,3% (111/119) dos camundongos com genótipo tipo I tiveram óbitos entre 10 e 30 dias e 90,5% (19/21) dos camundongos com genótipo tipo III tiveram óbitos entre 14 e 28 dias.

Nos gráficos 6 a 9 estão representadas as proporções de camundongos sobreviventes infectados com os genótipos tipo I e tipo III. As médias de sobrevivência e intervalos de confiança estão apresentados na tabela 11.

Gráfico 6 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo I de *Toxoplasma gondii*, a partir do dia 10 pós-inoculação. São Paulo, 2004

Gráfico 7 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo III de *Toxoplasma gondii*, a partir do dia 10 pós-inoculação. São Paulo, 2004

Gráfico 8 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo I de *Toxoplasma gondii* até o término do experimento (60 dias pós-inoculação). São Paulo, 2004

Gráfico 9 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo III de *Toxoplasma gondii* até o término do experimento (60 dias pós-inoculação). São Paulo, 2004

Tabela 11 – Médias de sobrevida e intervalos de confiança (95%) observados para os camundongos infectados com os genótipos tipos I e III de *Toxoplasma gondii* isolados de gatos naturalmente infectados. São Paulo, 2004

Genótipo	Média (dias P.I.)	IC (95%)
Tipo I – só os que morreram	18,64	17,51-19,77
Tipo III – só os que morreram	21,86	19,66-24,06
Tipo I – todos até o final do experimento (60 dias P.I.)	24,07	21,54-26,61
Tipo III – todos até o final do experimento (60 dias P.I.)	44,29	39,07-49,52

P.I.: pós-inoculação

Considerando a sobrevida de todos os animais infectados por todo o período experimental, pode-se observar que os grupo constituído pelos camundongos com genótipo tipo III apresentaram sobrevida maior.

Os títulos de anticorpos entre os camundongos sobreviventes com genótipo tipo I foram comparados com os títulos dos camundongos sobreviventes com genótipo tipo III (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos pelo teste de aglutinação modificado (MAT) em camundongos experimentalmente infectados, segundo o genótipo de *Toxoplasma gondii*. São Paulo, 2004

Título	Genótipo	
	Tipo I	Tipo III
12.800	0	1
25.600	0	9
51.200	8	12
102.400	7	6
204.800	2	2
409.600	1	0
Total	18	30

Foi observada uma diferença estatística significativa entre as medianas dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos grupos tipo I e tipo III ($p=0,0069$), sugerindo que animais sobreviventes com genótipo tipo I tiveram uma resposta de anticorpos anti-*T. gondii* maior do que os sobreviventes com genótipo tipo III.

5.4 PESQUISA DE OOCISTOS DE *Toxoplasma-Hammondia*

Quatro animais estavam eliminando oocistos tipo *Toxoplasma-Hammondia* nas fezes (Tabela 13), correspondendo a 1,7% (4/237) dos animais examinados. Entre os animais jovens essa porcentagem foi de 3,9% (2/51) e entre os adultos foi de 1,1% (2/186). Todos foram soronegativos para anticorpos anti-*T. gondii*.

Tabela 13 – Gatos positivos para oocistos tipo *Toxoplasma-Hammondia* nas fezes, segundo o município de procedência no estado de São Paulo e a faixa etária. São Paulo, 2004

Município	Número do gato	Idade
Araraquara	235	± 3 meses
Araçatuba	115	Adulto
São Paulo	3	Adulto
Sorocaba	64	± 6 meses

6 DISCUSSÃO

Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 84 (35,4%) dos 237 gatos examinados através do MAT. A comparação com outros trabalhos é difícil, uma vez que as amostras foram colhidas por conveniência, levando principalmente em consideração os municípios que faziam captura desses animais, sendo envolvidos 15 municípios. Quando se observam os resultados nos municípios em que um número maior de animais foi testado, algumas comparações podem ser tentadas. De qualquer maneira, deve-se também levar em consideração que resultados de soroprevalência em gatos variam de acordo com o tipo de população testada (gatos com acesso à rua ou não), idade, alimentação (comercial ou não), localização geográfica e mesmo o tipo de teste utilizado.

No presente estudo, havia poucas informações sobre os animais, mas uma vez que a maioria foi capturada, pode-se afirmar que eram animais com livre acesso à rua. Este tipo de população tem apresentado prevalências mais altas (DUBEY et al., 2002b; GAUSS et al., 2003; LUCAS et al., 1999), confirmando que animais não confinados apresentam um risco maior de exposição ao *T. gondii*, seja aos oocistos, ou através da ingestão de cistos ao se alimentarem de pássaros e roedores. No entanto, DeFeo et al. (2002) não observaram diferenças examinando essa variável; nesse caso, o tipo de alimentação dada aos gatos pelos proprietários poderia ter sido um fator a ser considerado. Silva et al. (2002) também sugeriram essa hipótese ao encontrarem soroprevalência mais alta em animais pertencentes a um criador.

No município de São Paulo, 23,4% (7/47) dos gatos eram positivos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos mais extensivos no mesmo município. Silva et al. (2002) encontraram 26,7% (115/430) de animais soropositivos (gatos de rua) através do MAT e Lucas et al. (1999) encontraram 23,6% (29/94) de soropositivos, através da RIFI, entre os

gatos de rua e 11,8% (10/75) entre animais sem acesso à rua. Já no município de Guarulhos, apenas 10% (4/40) dos gatos de rua foram positivos no estudo de Silva et al. (2002). Vale lembrar que no presente estudo, os 10 gatos desse município foram soronegativos.

Não existem estudos abrangentes de soroprevalência em gatos no estado de São Paulo. Algumas diferenças entre regiões poderiam ser identificadas. Assim, por exemplo, os municípios de Espírito Santo do Pinhal e Guaíra, onde foram encontrados 60% (12/20) e 53,6% (15/28), respectivamente, de animais soropositivos, poderiam mostrar dados epidemiológicos bem diferentes do que os que têm sido observados na cidade de São Paulo. No estado do Paraná, dois estudos feitos em municípios no interior revelaram frequências elevadas de anticorpos anti-*T. gondii* na população de gatos. Em propriedades rurais de Jaguapitã, foram encontrados 73% (119/163) de animais positivos (GARCIA et al., 1999), através da RIFI. Em Santa Isabel do Ivaí, 84,4% (49/58) dos gatos foram positivos através do MAT (DUBEY et al., 2004c). Estes resultados reforçam as observações de variação nos valores de ocorrência em diferentes regiões examinadas.

A alta prevalência de gatos positivos para anticorpos anti-*T. gondii* em uma região sugere que eles possam apresentar um importante papel na epidemiologia da toxoplasmose desse local, pela contaminação do ambiente com oocistos. Assim, por exemplo, no município de Santa Isabel do Ivaí, citado acima, um surto de toxoplasmose humana foi associado à contaminação de um reservatório de água com oocistos de *T. gondii* (DUBEY et al., 2004c).

No presente trabalho, não houve diferença na porcentagem de soropositivos entre machos e fêmeas, sugerindo que eles são igualmente suscetíveis à infecção por *T. gondii*. Este resultado concorda com estudos anteriores (DeFEO et al., 2002; GARCIA et al., 1999; GAUSS et al., 2003; LANGONI et al., 2001; LUCAS et al., 1999).

Relativamente à faixa etária, os animais foram divididos em dois grupos (jovens, até um ano de idade; adultos, com idade maior do que um ano), pois as idades exatas eram

desconhecidas. Foram observadas diferenças significantes entre esses dois grupos, com os animais adultos apresentando maior soroprevalência (41,4%) que os jovens (13,7%), concordando com os trabalhos de Garcia et al. (1999), Gauss et al. (2003) e Lucas et al. (1999). Essa associação pode ser explicada pelo fato de que animais mais velhos tiveram mais chances de exposição ao parasito no curso de suas vidas. Diferentemente, Langoni et al. (2001) não observaram diferenças com relação à idade, possivelmente porque dividiram os animais em muitos grupos (seis faixas etárias), além de terem incluído no primeiro grupo animais pertencentes a uma faixa muito ampla, de dois meses a três anos.

Quanto à eliminação de oocistos tipo *Toxoplasma-Hammondia*, 1,7% (4/237) dos gatos foram positivos no exame coproparasitológico (3,9% dos animais jovens), concordando com os achados de Gennari et al. (1999) e Rosa e Belda Neto (1983) no Brasil e com o trabalho de revisão de Dubey e Beattie (1988), que relatam que na maioria dos países a prevalência de oocistos de *T. gondii* é usualmente menor do que 2,0%. Não foi possível durante o período experimental, a realização de bioensaio para a diferenciação entre os gêneros, mas de qualquer forma, confirmou-se a baixa prevalência do parasito em exames coproparasitológicos. Assim, estudos epidemiológicos devem ser conduzidos usando testes sorológicos ou isolamento biológico.

No presente estudo, o *T. gondii* foi isolado de 66,2% (47/71) dos gatos soropositivos e o número de isolamentos aumentou significativamente com o aumento dos títulos de anticorpos dos gatos. Essa mesma associação foi observada por Dubey, Thulliez e Powell (1995), com isolamentos de *T. gondii* de suínos em camundongos e gatos.

A escolha dos tecidos para o bioensaio também é determinante para o sucesso no isolamento do parasito. Nesse estudo foi escolhido um “pool” de tecidos (cérebro, coração, língua e músculos da coxa), baseado nos estudos de Dubey et al. (1986) e Katsube et al.

(1967). Recentemente, quando a parte experimental relativa aos bioensaios do presente trabalho já havia terminado, Dubey et al. (2004c) publicaram um estudo também com isolamento de *T. gondii* de gatos em camundongos, em que mostraram que o parasito é mais freqüente nos tecidos musculares (coração e músculos esqueléticos) do que no cérebro. A partir desse dado, acredita-se que um maior número de isolamentos teria sido obtido no presente trabalho, se o cérebro tivesse sido excluído, uma vez que ele participava de cerca de 50% de tecidos de cada “pool”.

Dubey et al (2004c) obtiveram 73,5% de isolamentos de *T. gondii* de gatos. Os bioensaios foram realizados em gatos por serem os hospedeiros mais sensíveis para a detecção de *T. gondii* em tecidos, já que a ingestão de bradizoítos seria a forma de infecção mais natural nesta espécie (DUBEY, 2001), além da possibilidade de administração de uma maior quantidade de tecidos. No entanto, as estruturas física e econômica necessárias para este tipo de experimento não podem ser facilmente obtidas.

No presente estudo, os tecidos de cada gato foram digeridos em pepsina para concentrar o *T. gondii* no inóculo, uma vez que o número de parasitos encontrado em tecidos animais é baixo, como demonstrado através de bioensaios (DUBEY, 1995). Dos 47 isolamentos obtidos, em 17 (36%), nem todos os camundongos se infectaram com *T. gondii* e em cinco isolamentos, apenas um camundongo se infectou. Esses dados indicam que havia poucos parasitos nesses inóculos, além disso, uma parte dos bradizoítos liberada dos cistos é destruída durante o processo de digestão e concentração da amostra (DUBEY et al., 2002a).

Neste estudo, 34 (72,4%) dos 47 isolados de *T. gondii* de gatos de 11 municípios no estado de São Paulo eram tipo I, 12 (25,5%) eram tipo III e um isolado (2,1%) era misto (tipo I e tipo III). Não foram encontrados isolados tipo II. A caracterização de isolados de gatos também foi realizada por Dubey et al. (2004c), com animais de um único município no estado

do Paraná. De 38 isolados, 15 (39,5%) eram tipo I e 23 (60,5%) eram tipo III, mostrando uma distribuição bastante diferente entre os genótipos do que a encontrada no presente estudo. Provavelmente, a frequência de um determinado genótipo pode variar entre regiões, assim, por exemplo, nos municípios de Conchas, os sete isolados eram tipo I e em Espírito Santo do Pinhal, os oito isolados também eram tipo I.

No mesmo estudo de Dubey (2004c), com isolados de gatos no Paraná, 95% dos camundongos infectados morreram entre 11 e 29 dias P.I., independentemente do genótipo. Resultados semelhantes quanto à mortalidade foram encontrados no presente trabalho, mas ao contrário do estudo de Dubey (2004c), os isolados tiveram um comportamento biológico significativamente diferente, sendo que os isolados tipo I causaram maior mortalidade do que isolados tipo III. Dos isolados tipo III, 58,3% (7/12) não mataram os camundongos e não produziram doença clínica, enquanto nos isolados tipo I, a maioria dos camundongos sobreviventes estava visivelmente doente.

Ainda no Brasil, foram caracterizados os isolados provenientes de galinhas caipiras assintomáticas de três estados. No estado de São Paulo, só foram encontrados isolados tipos I (64%) e III (36%), e o tipo I causou maior mortalidade (DUBEY et al., 2002a), semelhantemente ao observado no presente estudo. No Rio de Janeiro, Dubey et al. (2003c) genotiparam 48 isolados. Foram encontrados isolados tipos I (70%) e tipo III (27%) e também um isolado misto (tipo I e tipo III), como no presente estudo, indicando uma infecção natural com múltiplos parasitos. Aqueles autores também observaram que alguns camundongos com isolado tipo I sobreviveram. No Paraná, Dubey et al. (2003d) encontraram sete isolados tipo I e seis isolados tipo III. Como no presente estudo, também observaram que isolados tipo III podem causar 100% de mortalidade nos camundongos. Assim, nem todas as amostras virulentas para camundongos examinadas no *locus SAG2* são do tipo I.

No Brasil, Ferreira (2004) caracterizou geneticamente 20 amostras de *T. gondii*, previamente isoladas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, originadas de animais e do homem. A análise do *locus SAG2* mostrou que 14 amostras eram tipo I e seis eram tipo III, e o autor também não encontrou o tipo II.

Os estudos de Dubey (2002b, 2003a, b) com isolados de galinhas e o presente estudo com isolados de gatos mostraram que hospedeiros assintomáticos podem carregar amostras que são virulentas para os camundongos.

No presente estudo, todos os isolados do genótipo I produziram cistos nos cérebros dos camundongos. Dubey et al. (2002a, 2003c,d,e, 2004c) têm demonstrado que gatos inoculados com tecidos de camundongos infectados com o genótipo tipo I e que morreram na fase aguda da infecção (8-12 dias P.I) podem produzir milhões de oocistos nas fezes, que por sua vez são infectantes para os camundongos. Este fato indicaria que esse genótipo pode circular na natureza. A hipótese de que amostras virulentas teriam seu próprio ciclo, perpetuado entre os hospedeiros intermediários através de transmissão vertical, foi levantada por Johnson (1997), tendo como base o fato de que a recombinação sexuada entre a linhagem virulenta e não virulenta é pouco freqüente na natureza (HOWE; SIBLEY, 1995). Dardé, Bouteille e Pestre-Alexandre (1992) postularam essa hipótese anteriormente ao encontrarem uma amostra virulenta (FAJI, origem humana) que não produzia oocistos em gatos e só havia sofrido quatro passagens em camundongos desde o isolamento. A validade desta hipótese ainda não está estabelecida e se tornou quase uma questão acadêmica.

Ainda na América do Sul, a genotipagem de *T. gondii* de galinhas caipiras na Argentina (Dubey et al, 2003e), mostrou um predomínio de isolados tipo III (sete), um isolado tipo I e um isolado tipo II. A maioria dos isolados foi assintomática em camundongos. No presente trabalho, a maioria dos isolados tipo III também não foi letal para os camundongos. No Peru, DUBEY et al. (2004b), encontraram isolados tipos I e III e, diferentemente do

encontrado nos trabalhos até agora citados, seis dos sete isolados tipo I não foram virulentos para os camundongos.

Ainda com isolados provenientes de galinhas, nos Estados Unidos, foram encontrados cinco isolados tipos II e 14 tipo III, e todos foram assintomáticos para camundongos, tanto os cistos como os taquizoítos (DUBEY et al., 2003b). No México, Dubey, Morales e Lehmann (2004) encontraram apenas isolados com fenótipo não virulento para camundongos, sendo cinco do tipo III e um do tipo I. Isolados de *T. gondii* de galinhas também foram caracterizados genotipicamente com amostras de outros continentes. No Egito (DUBEY et al., 2003e), em Israel (DUBEY et al., 2004c) e na Índia (SREEKUMAR et al., 2003) foram encontrados genótipos tipos II e III, todos assintomáticos para os camundongos.

Poucos trabalhos mais extensivos de genotipagem de *T. gondii* em outras espécies animais foram feitos. Nos Estados Unidos, de 43 isolados de suínos, 83,7% eram tipo II e 16,3% eram tipo III, todos assintomáticos para camundongos (MONDRAGON et al., 1998). No Reino Unido, a genotipagem de *T. gondii* foi feita diretamente em tecidos de 13 fetos ovinos abortados, e só foram encontradas amostras tipo II (OWEN; TREES, 1999).

Vários grupos estudaram a relação entre o genótipo de *T. gondii* e a toxoplasmose humana, em geral produzindo dados conflitantes. Desde que Howe et al. (1995), com isolados da França, concluíram que os casos de toxoplasmose humana estavam associados comumente a infecções com o genótipo tipo II, foi sendo estudado se também haveria diferenças entre os quadros de toxoplasmose e os diferentes genótipos. Howe et al. (1997) levantaram a hipótese de que a prevalência encontrada poderia apenas ser reflexo da origem das amostras que resultaram nas infecções, já que estudos em suínos (MONDRAGON et al., 1998) e ovinos (OWEN; TREES, 1999) também mostraram uma predominância do tipo II.

Posteriormente, na Espanha, Fuentes et al. (2001), analisando diretamente amostras clínicas, verificaram que o tipo I era tão freqüente quanto o tipo II, propondo que resultados

anteriores, que apontavam o tipo II como o mais prevalente nos casos de toxoplasmose humana, poderiam ser devido a um efeito de seleção no processo de cultura e isolamento das amostras antes da genotipagem. Ajzenberg et al. (2002b) discordam dessa hipótese, pois segundo eles, considerando a alta virulência das amostras tipo I em camundongos e a alta taxa de multiplicação em cultivo celular desse genótipo, deveria ser esperado uma seleção para o tipo I e não para o tipo II. Nesse caso a possibilidade de mudança temporal na epidemiologia da toxoplasmose, ou mesmo diferença regional, não pode ser descartada.

Enquanto Howe et al. (1997) e Ajzenberg et al. (2002b), com isolados da França, observaram uma associação entre o tipo II e infecções congênitas, Fuentes et al. (2001), com isolados da Espanha, observaram associação com o tipo I e Aspinall et al. (2003), com isolados do Reino Unido e País de Gales, não observaram correlação entre o genótipo e a apresentação clínica da toxoplasmose.

Todos esses dados de genotipagem na população humana vêm de casos clínicos de toxoplasmose, pouco se conhecendo sobre a diversidade genética dos isolados circulando na população humana. Em camundongos, entre os três estágios infectantes de *T. gondii*, os oocistos são mais virulentos que taquizoítos ou bradizoítos. Não se conhece, na população humana, se o estágio infectante poderia apresentar um papel importante no desenvolvimento da doença. Não existem métodos que diferenciem a forma de transmissão, assim, restam os dados epidemiológicos, que deveriam ser conduzidos adequadamente para se tentar obter essa informação. Outro avanço seria o desenvolvimento de métodos capazes de determinar o genótipo de *T. gondii* de forma não invasiva. Isto poderia ser feito através do uso de antígenos genótipo-específicos que seriam usados para tipagem sorológica, permitindo a identificação de genótipos responsáveis por infecções assintomáticas (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; TINTI et al., 2003).

Os achados do presente estudo, juntamente com os trabalhos já feitos, confirmam que os isolados de *T. gondii* do Brasil, tanto animais como humanos, quando examinados pela PCR-RFLP do *locus SAG2* diferem dos isolados animais e humanos dos Estados Unidos e de países de outros continentes, não só pelo predomínio de isolados tipo I com comportamento biológico virulento, como pela ausência da linhagem tipo II.

No presente trabalho, os isolados vieram de 11 municípios, cobrindo praticamente todo o estado de São Paulo. Se a ausência do genótipo tipo II, até agora verificada, deve-se ao fato de que os isolamentos se restringiram à região sudeste, ainda tem que ser esclarecido, uma vez que a vastidão do território nacional e os diferentes ecossistemas não podem ser ignorados. Na Argentina, um país vizinho, já foi encontrado um isolado tipo II de galinha (DUBEY et al., 2003e), e só nove isolados foram examinados. Os achados do Peru (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004) e México (DUBEY et al., 2004b) se assemelham mais aos resultados da região sudeste brasileira quanto aos genótipos encontrados, embora o comportamento biológico pareça ser diferente, pois a maioria dos isolados encontrada nesses dois países não foi virulenta para camundongos. Em relação aos isolados humanos do Brasil, ainda faltam estudos para tentar correlacionar os quadros clínicos de toxoplasmose com os genótipos de *T. gondii* e observar diferenças ou não com achados de outros países.

A genotipagem de isolados provenientes de animais silvestres da fauna brasileira ainda não foi realizada. Dubey et al. (2004a) encontraram os três genótipos clássicos circulando na fauna silvestre dos Estados Unidos e Cole et al. (2000) encontraram somente o genótipo tipo II em 19 isolados de lontras, também nos Estados Unidos.

No presente estudo, foi encontrado um isolado com os genótipos tipos I e III. São poucos os exemplos de infecção mista em hospedeiros infectados naturalmente. Dubey et al. (2003c) observaram um isolado de galinha do estado do Rio de Janeiro, com genótipo misto (tipo I e tipo III). Aspinall et al. (2003), examinando 30 isolados de pacientes com

toxoplasmose, no Reino Unido e País de Gales, encontraram 10 amostras com genótipo misto (tipo I e tipo II) e comentam que a alta ocorrência de isolados mistos deve ter ocorrido devido à ingestão de alimento contendo mais do que um tipo de parasito. Essa hipótese foi baseada em trabalho anterior (ASPINALL et al, 2002), em que os autores mostraram que seis (22%) amostras de produtos alimentícios examinados apresentavam os dois genótipos, provavelmente pela mistura de carne bovina e suína no mesmo produto.

Pode-se imaginar que o gato poderia ter se infectado com dois parasitos de genótipos diferentes se ele ingeriu uma presa infectada com os dois genótipos, ou duas presas, cada uma com genótipo diferente em intervalo curto, situações que poderiam criar a possibilidade de recombinação sexual. Além disso, foi verificado experimentalmente que gatos podem se infectar novamente, reexcretando oocistos vários anos após uma infecção primária (DUBEY, 1995) e que a imunidade intestinal pode ser quebrada em animais imunodeprimidos ou com isosporose (CHESSUM, 1972; DUBEY, 1976; DUBEY; FRENKEL, 1974).

Não houve mortalidade dos camundongos com o isolado misto no presente estudo. O isolado misto observado por Dubey et al. (2003c), causou o óbito de um camundongo e quatro sobreviveram. O animal que morreu e um dos que sobreviveram tinham genótipo tipo I e os outros sobreviventes tinham genótipo tipo III; neste caso, os autores fizeram a genotipagem de todos os camundongos do grupo. No presente estudo, a descoberta deste isolado misto só foi possível porque o protocolo usado em todo o experimento usou dois camundongos (quando houvesse) para a genotipagem de cada isolado. Em geral, a genotipagem de isolados em camundongos tem sido feita com apenas um dos camundongos infectados.

O presente trabalho e o estudo de Dubey et al. (2003c) permitiram observar que camundongos infectados com amostras do tipo misto podem desenvolver infecções únicas.

A confirmação do genótipo misto foi possível com a análise por sequenciamento. Os cinco camundongos do grupo com isolado misto apresentaram padrões diferentes na RFLP. A

utilização de análise por seqüenciamento para verificar se o padrão observado na RFLP tratasse de digestão parcial ou infecção mista também foi feito por Aspinall et al. (2003) com isolados de origem humana e por Lehmann et al. (2000) com isolados de diversas origens.

Ainda quanto às técnicas utilizadas neste trabalho, a genotipagem de todos os isolados dos gatos foi feita através da PCR diretamente, obtendo-se uma boa amplificação. A realização, quando possível, apenas da PCR é desejável, devido aos riscos maiores de contaminação entre amostras com a *n*PCR.

Além da genotipagem utilizando os isolados em camundongos, foi feita a genotipagem direta, isto é, a partir das amostras primárias dos gatos, que consistiram de um homogeneizado de tecidos preparado para o bioensaio em camundongos. A genotipagem através da análise direta de amostras foi realizada por Aspinall et al. (2003) e Fuentes et al. (2001) com amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose e por Owen e Trees (1999) com amostras de placentas de fetos ovinos abortados, mas nenhum estudo foi feito comparando a genotipagem dos isolados e das amostras primárias correspondentes.

A detecção de *T. gondii* nas amostras dos gatos foi feita através de *n*PCR, pois não foi possível a amplificação direta. Foram utilizadas para este experimento as amostras de gatos correspondentes aos isolados obtidos em camundongos. Das 46 amostras examinadas, 37 (80,4%) puderam ser caracterizadas pela RFLP do *locus SAG2*. Como observado anteriormente em relação aos isolamentos, se o cérebro não tivesse sido incluído no “pool” de tecidos utilizados, a detecção poderia ter sido maior. Os genótipos das amostras dos gatos foram correspondentes aos isolados em camundongos. Quanto ao gato com infecção mista, observou-se que as cinco alíquotas testadas apresentavam padrões diferentes quando examinadas pela RFLP. Isto pode ser explicado pela diferente proporção e distribuição dos parasitos na amostra. A utilização de duplicatas seria então importante para a detecção direta de amostras com genótipo misto. A análise direta de amostras usando homogeneizados de

tecidos pode ser uma opção prática e rápida para estudos de caracterização genotípica nos animais, principalmente quando há restrições éticas ou financeiras para o uso de animais de laboratório.

No presente trabalho, não foi utilizada a denominação virulência para o comportamento biológico dos isolados obtidos em camundongos, tendo sido preferível avaliar a porcentagem de mortalidade, para não confundir com conceitos já estabelecidos. A definição usual de virulência das amostras de *T. gondii* baseia-se na dose letal 100% (DL₁₀₀) de taquizoítos inoculados intraperitonealmente em camundongos. A amostra RH e outras semelhantes genotipicamente exibem uma DL₁₀₀ de um único parasito viável, enquanto amostras não virulentas como a CEP, exibem uma DL₁₀₀ > 10³ parasitos.

A inoculação intraperitoneal dos camundongos com uma quantidade cuidadosamente quantificada de taquizoítos é o principal controle experimental e o meio mais confiável para determinação da virulência aguda das amostras de *T. gondii* e foi utilizado para o estabelecimento da associação entre genótipo do parasito com o respectivo fenótipo de virulência (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Howe e Sibley (1995) e Howe, Summers e Sibley (1996) mostraram que o fenótipo (virulência aguda em camundongos) e o genótipo das amostras de *T. gondii* são estáveis após passagens repetidas em cultivo celular, ou seja, o fenótipo observado para amostras virulentas não é apenas o reflexo do número de passagens que o parasito sofreu, e o mesmo conceito pode ser aplicado para amostras não virulentas.

A virulência de isolados de *T. gondii* em camundongos pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a via de inoculação, estágio do parasito, genótipo do hospedeiro e genótipo do parasito (HOWE; SUMMERS E SIBLEY, 1996; DUBEY et al., 2004c). No presente estudo, como a quantidade de parasitos inoculados não podia ser controlada, não se

pode saber até que ponto isto pode ter influenciado no fenótipo observado nos grupos em que poucos camundongos foram infectados.

Jungersen et al. (2002) observaram heterogeneidade na virulência em camundongos entre 15 amostras do tipo II, estudando parâmetros clínicos como ganho de peso e título de anticorpos anti-*T. gondii*. No presente estudo, foi observada diferença entre os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* dos animais sobreviventes infectados com genótipo tipo I em relação aos sobreviventes com genótipo tipo III. Como o número de animais foi pequeno, este parâmetro poderia continuar sendo avaliado em outros trabalhos com isolamento e genotipagem de *T. gondii*. Literák et al. (1998) observaram diferenças na resposta de anticorpos anti-*T. gondii*, utilizando a RIFI, entre camundongos infectados com 22 amostras de *T. gondii* de diferentes animais, mas consideraram que essas diferenças seriam associadas a diferentes doses infectantes.

O *T. gondii* é único entre organismos que apresentam uma estrutura populacional clonal, porque mais de 95% dos isolados podem ser classificados claramente em uma entre três linhagens distintas (HOWE; SIBLEY, 1995). A clonalidade não exclui a recombinação genética e não implica na absoluta identidade dos isolados entre as linhagens (MONDRAGON et al., 1998).

A utilização de um único marcador para genotipagem de organismos geralmente não é possível, mas a estrutura populacional clonal incomum de *T. gondii* forneceu a base inicial para a tipagem de amostras usando um único *locus*, principalmente o *SAG2*, com grande confiabilidade (HOWE; SIBLEY, 1995; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). No entanto, como os métodos de tipagem genética de *T. gondii* foram extensivamente aperfeiçoados nos últimos anos, as limitações do uso de um ou dois *loci* para compreender a estrutura populacional de *T. gondii* começaram a ser enfatizadas por vários pesquisadores.

Grigg et al. (2001) puderam identificar cinco amostras com tipos recombinantes, em casos de toxoplasmose ocular, utilizando uma PCR-RFLP com marcadores múltiplos, o que não teria sido possível com um só marcador. Ajzenberg et al. (2002b) utilizando marcadores microssatélites e marcadores isoenzimáticos conseguiram identificar genótipos considerados atípicos.

No Brasil, Ferreira (2001) utilizou a PCR-RFLP em oito *loci* independentes, para caracterizar 20 amostras de *T. gondii* isoladas em São Paulo e Minas Gerais. De modo surpreendente, todas as amostras eram tipos recombinantes, com alelos típicos de amostras dos tipos I, II e III na maioria dos *loci* examinados. A autora sugere que este fato explicaria as observações, também feitas no presente estudo, de que isolados identificados pela PCR-RFLP do *locus* *SAG2* como do tipo III, normalmente não virulentos, foram letais para camundongos.

É interessante que, uma vez que a recombinação pressupõe a união de gametas com genótipos diferentes, tenha sido achado somente um isolado misto nos 47 isolados de gatos examinados e que, em estudo anterior, Dubey et al. (2004c) não tenham encontrado genótipos mistos entre os 38 isolados de gatos examinados, já que esses animais são os únicos hospedeiros definitivos do *T. gondii*. Para Ajzenberg et al. (2002a), a utilização de marcadores microssatélites de alta resolução seriam mais adequados para o diagnóstico de infecções mistas do que métodos baseados em um único *locus*, como o utilizado no presente estudo e no de Dubey et al. (2004c). Estes achados abrem novas perspectivas de estudos para os isolados de gatos obtidos no presente trabalho e para trabalhos futuros de isolamento e caracterização de amostras de *T. gondii* no Brasil.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

O sorodiagnóstico e o isolamento são mais informativos do que exames coproparasitológicos para estudar a epidemiologia da toxoplasmose na população de gatos domésticos.

O título de anticorpos anti-*T. gondii* é um fator que deve ser considerado na seleção de animais para o bioensaio em camundongos, principalmente se há restrições para o uso desses animais de laboratório.

Os genótipos tipos I e III de *T. gondii* estão distribuídos na população de gatos do estado de São Paulo.

O genótipo tipo II parece não ocorrer na população de gatos do estado de São Paulo.

Os genótipos tipos I e III isolados de gatos tiveram comportamento biológico diferente nos camundongos, sendo a linhagem tipo I mais patogênica.

A ocorrência de infecções mistas é rara na população de gatos no estado de São Paulo.

Para a identificação de infecções mistas nos isolados em camundongos, é importante a utilização de mais de um camundongo infectado para a realização da PCR-RFLP.

A análise por seqüenciamento de DNA deve ser feita para a diferenciação dos casos de digestão parcial e infecção mista ao se utilizar a PCR-RFLP.

A análise direta de homogeneizados de tecidos de gatos na *n*PCR permite uma boa detecção de *T. gondii*, podendo ser útil para estudos moleculares, principalmente se há restrições para o uso de camundongos para o isolamento, além de acelerar os resultados.

REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27-38, 2002a.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M. H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684-689, 2002b.
- APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. **Acta Tropica**, v. 65, n. 2, p. 97-104, 1997.
- ARAUJO, F. G.; WILLIAMS, D. M.; GRUMET, F. C.; REMINGTON, J. S. Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 5, p. 1528-1530, 1976.
- ASPINALL, T. V.; GUY, E. C.; ROBERTS, K. E.; JOYNSON, D. H. M.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.
- ASPINALL, T. V.; MARLEE, D.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 1193-1199, 2002.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Short protocols in molecular biology**. 4th ed. New York: Wiley, 1999. sections 2-3 – 2-7.
- BARRAL, V.; THIS, P.; IMBERT-ESTABLET, D.; COMBES, C.; DELSENY, M. Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 211-222, 1993.
- BIÑAS, M.; JOHNSON, A. M. A polymorphism in a DNA polymerase α gene intron differentiates between murine virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 1033-1040, 1998.
- BLACKSTON, C. R.; DUBEY, J. P.; DOTSON, E.; SU, C.; THULLIEZ, P.; SIBLEY, D.; LEHMANN, T. High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1472-1475, 2001.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 3, p. 1141-1145, 1993.

- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.
- CHESSUM, B. S. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. **British Veterinary Journal**, v. 128, n. 7, p. xxxiii-xxxvi, 1972.
- CHILDS, J. E. Size-dependent predation on rats (*Rattus norvegicus*) by house cats (*Felis catus*) in an urban setting. **Journal of Mammalogy**, v. 67, n. 1, p. 196-199, 1986.
- CLARK, D. P.; RUSSEL, L. D. **Molecular biology: made simple and fun**. Illinois: Cache River Press, 1997. p. 235-268.
- COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; HOWE, D. K.; RODERICK, C. L.; DUBEY, J. P.; THOMAS, N. J.; BAETEN, L. A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-530, 2000.
- COSTA, J. M.; DARDÉ, M. L.; ASSOULINE, B.; VIDAUD, M.; BRETAGNE, S. Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2542-2545, 1997.
- COUVREUR, G.; SADAK, A.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J. F. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-10, 1988.
- CRISTINA, N.; DARDÉ, M. L.; BOUDIN, C.; TAVERNIER, G.; PESTRE-ALEXANDRE, M.; AMBROISE-THOMAS, P. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains, combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. **Parasitology Research**, v. 81, n. 1, p. 32-37, 1995.
- CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v. 77, n. 2, p. 266-268, 1991.
- DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 219, n. 1, p. 27-41, 1996.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Comparison of isoenzyme profiles of *Toxoplasma gondii* tachyzoites produced under different culture conditions. **Parasitology Research**, v. 76, n. 4, p. 367-371, 1990.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786-794, 1992.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, n. 6, p. 551-558, 1988.

DEFEO, M. L.; DUBEY, J. P.; MATHER, T. N.; RHODES III, R. Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 12, p. 1714-1717, 2002.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562-568, 1980.

DORNY, P.; SPEYBROECK, N.; VERSTRAETE, S.; BAEKE, M.; BECKER, A.; BERKVEN, D.; VERCRUYSE, J. Serological survey of *Toxoplasma gondii*, feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in urban stray cats in Belgium. **Veterinary Record**, v. 151, n. 121, p. 626-629, 2002.

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

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592-602, 1997a.

DUBEY, J. P. Direct development of enteroepithelial stages of *Toxoplasma* in the intestines of cats fed cysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 11, p. 1634-1637, 1979.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 410-415, 1995.

DUBEY, J. P. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 215-219, 2001.

DUBEY, J. P. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cats. **Journal of Parasitology**, v. 63, n. 1, p. 156-157, 1977.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 75-77, 1998b.

DUBEY, J. P. Reshedding of *Toxoplasma gondii* by chronically infected cats. **Nature**, v. 262, n. 5565, p. 213-214, 1976.

DUBEY, J. P. Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 15-20, 1997b.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E. J. L.; SIMPSON, D. J. H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, 1998c. p. 579-597.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. 220p.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337-339, 1987.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 99-105, 2002a.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; HILALI, M.; EL-GHAYSH, A.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 89-95, 2003a.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T.; DAVIS, M. F.; MORISHITA, T. Y. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1060-1062, 2003b.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003c.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; YOUNG, R. W.; DAHL, E.; EBERHARD, M. L.; NACE, E. K.; WON, K.; BISHOP, H.; PUNKOSDY, G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; SUMNERS, J. A.; DEMARAIS, S.; HUMPHREYS, J. G.; LEHMANN, T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 67-71, 2004a.

DUBEY, J. P.; HOOVER E A.; WALLS, K. W. Effect of age and sex on the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p. 184-186, 1977.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Diagnosis of induced toxoplasmosis in neonatal cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 2, p. 179-185, 1995a.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; THULLIEZ, P. Long-term antibody responses of cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 887-893, 1995b.

- DUBEY, J. P.; LEVY, M. Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; DAHL, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissue distribution and genotyping of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. In: JOINT MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PARASITOLOGISTS AND THE AMERICAN SOCIETY OF PARASITOLOGISTS, 2004, Philadelphia. **Program & Abstracts...** Philadelphia: Journal of Parasitology, 2004b. p. 111.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 447-456, 1970a.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 4, p. 636-662, 1970b.
- DUBEY, J. P.; MILLER, S.; POWELL, E. C.; ANDERSON, W. R. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 2, p. 155-158, 1986.
- DUBEY, J. P.; MORALES, E. S.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 411-413, 2004.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003d.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN; THULLIEZ, P. LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004c.
- DUBEY, J. P.; SALANT, H.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; SPIRA, D.; HAMBURGER, J.; LEHMANN, T. V. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel and public health implications of free-range farming. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 317-322, 2004d.
- DUBEY, J. P.; SAVILLE, W. J. A.; STANEK, J. F.; REED, S. M. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from rural Ohio. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 802-803, 2002b.
- DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; BLIXT, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 870-882, 1997.

- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, n. 9, p. 1297-1299, 1989.
- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; POWELL, E. C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassay in mice and cats. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 1, p. 48-53, 1995.
- DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1063-1064, 2003e.
- FAZAELI, A.; CARTER, P. E.; DARDÉ, M. L.; PENNINGTON, T. H. Molecular typing of *Toxoplasma gondii* strains by *GRA6* gene sequence analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 637-642, 2000.
- FERRARONI, J. J.; REED, S. G.; SPEER, C. A. Prevalence of *Toxoplasma* antibodies in humans and various animals in the Amazon. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 47, n. 1, p. 148-150, 1980.
- FERREIRA, A. M. **Caracterização molecular de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas no Brasil**. 2004. 201 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- FRENKEL, J. K.; AMBROISE-THOMAS, P. Genomic drift of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 83, n. 1, p. 1-5, 1997.
- FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; HOFF, R. L. Loss of stages after continuous passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. **Journal of Protozoology**, v. 23, n. 5, p. 421-424, 1976.
- FRENKEL, J. K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 3, p. 439-443, 1975.
- FREYRE, A.; DUBEY, J. P.; SMITH, J. D.; FRENKEL, J. K. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 750-755, 1989.
- FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1566-1570, 2001.
- FUX, B.; RODRIGUES, C. V.; PORTELA, R. W.; SILVA, N. M.; SU, C.; SIBLEY, D.; VITOR, R. W. A.; GAZZINELLI, R. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6392-6401, 2003.

- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do Município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 99-104, 1999.
- GAUSS, C. B. L. ALMERÍA, S.; ORTUNO, GARCIA, F; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic cats from Barcelona, Spain. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1067-1068, 2003.
- GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1999.
- GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C. Rapid identification of virulent type 1 strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 398-400, 2001.
- GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. T. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.
- GUO, Z. G.; GROSS, U.; JOHNSON, A. M. *Toxoplasma gondii* virulence markers identified by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, v. 83, n. 5, p. 458-463, 1997.
- GUO, Z. G.; JOHNSON, A. M. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 127-132, 1995.
- HANDMAN, E.; GODING, J. W.; REMINGTON, J. S. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 124, n. 6, p. 2578-2583, 1980.
- HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.
- HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5193-5198, 1996.
- JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.
- JACOBS, L.; MELTON, M. L. Modification in pathogenicity of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 3, p. 447-457, 1954.

- JENSEN, L.; HEEGARD, P. M. H.; LIND, P. A study of virulence parameters for *Toxoplasma gondii* infections in mice. **Parasitology Research**, v. 84, n. 5, p. 382-387, 1998.
- JOHNSON, A. M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitology Today**, v. 13, n. 10, p. 393-397, 1997.
- JUNGENSEN, G.; JENSEN, L.; RASK, M. R.; LIND, P. Non-lethal infection parameters in mice separate sheep type II *Toxoplasma gondii* isolates by virulence. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 187-195, 2002.
- KASPER, L. H.; WARE, P. L. Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 5, p. 1570-1577, 1985.
- KATSUBE, Y.; HAGIWARA, T.; UEDA, K.; MIYAKAWA, H.; IMAIZUMI, K.; HANAKI, T.; NOBUTO, K. Studies on toxoplasmosis. Isolation of *Toxoplasma* from muscles of humans, dogs and cats. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 20, n. 3, p. 413-419, 1967.
- KAUFMAN, H. E.; MELTON, M. L.; REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. Strains differences in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 189-190, 1959.
- KAUFMAN, H. E.; REMINGTON; JACOBS, L. Toxoplasmosis: the nature of virulence. **American Journal of Ophthalmology**, v. 46, n. 5, p. 255-261, 1958.
- LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G.; CUNHA, E. L. P.; CUTOLO, A., A. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 243-244, 2001.
- LAPPIN, M. R.; BUSH, D. J.; REDUKER D. W. Feline serum antibody responses to *Toxoplasma gondii* and characterization of target antigens. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 73-80, 1994.
- LAPPIN, M. R.; GREENE, C. E.; PRESTWOOD, A. K.; DAWE, D. L.; TARLETON, R. L. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 9, p. 1580-1585, 1989.
- LAPPIN, M. R.; JACOBSEN, E. R.; KOLLIAS, G. V., POWELL C. C.; STOVER, J. Comparison of serologic assays for the diagnosis of toxoplasmosis in nondomestic felids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 2, p. 169-174, 1991.
- LEHMANN, T.; BLACKSTON, C. R.; PARMLEY, S. F.; REMINGTON, J. S.; DUBEY, J. P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 960-971, 2000.
- LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 448-461, 1997.

- LITERÁK, I.; RYCHLÍK, I.; SVOBODOVÁ, V.; POSPÍSIL, Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1367-1374, 1998.
- LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; LOUREIRO, V. S.; IKESAKI, J. Y. H.; BIRGEL, E. H. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 4, p. 221-224, 1999.
- LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Toxoplasmosis: from clinics to basic science. **Parasitology Today**, v. 14, n. 2, p. 43-45, 1998.
- LUTON, K.; GLEESON, M.; JOHNSON, A. M. rRNA gene sequence heterogeneity among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v. 81, p. 310-315, 1995.
- MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 639-641, 1998.
- MUNDAY, B. L. Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. **Research Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 100-102, 1972.
- NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 148, p. 369-372, 1909.
- NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishmann (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.
- OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 47, n. 1-2, p. 27-32, 1980.
- OGASSAWARA, S.; BENASSI, S.; HAGIWARA, M. K.; LARSSON, C. E. *Isospora* spp.: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 126-130, 1980.
- OVALLE, F.; GARCÍA, A.; THIBAUTH, J.; LORCA, M. Frecuencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en gatos de la ciudad de Valdivia, Chile. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 55, n. 3-4, p. 94-99, 2000.
- OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 382-384, 1999.
- PARMLEY, S. F.; GROSS, U.; SUCHARCZUK, A.; WINDECK, T.; SGARLATO, G. D.; REMINGTON, J. S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 293-301, 1994a.

- PARMLEY, S. F.; YANG, S.; HARTH, G.; SIBLEY, L. D.; SUCHARCZUK, A.; REMINGTON, J. S. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 66, n. 2, p. 283-296, 1994b.
- REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON J. S.; KLEIN, J. O. (Ed.). **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 140-267.
- ROSA, J. A.; BELDA NETO, F. M. Estudo da prevalência de oocistos de *Toxoplasma gondii* em gatos da cidade de Araraquara, SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 179-183, 1983.
- RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 6, p. 1161-1166, 1980.
- SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.
- SANTOS, S. M.; AMARAL, V.; REBOUÇAS, M. M.; DRUMOND, L. S. Anticorpos anti-*Toxoplasma* detectados por hemaglutinação indireta em soros de gatos domésticos provenientes da capital do Estado de São Paulo, Brasil. **Biológico**, v. 49, n. 6, p. 163-165, 1983.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, London, v. 359, n. 1, p. 82-85, 1992.
- SIBLEY, L. D.; HOWE, D. K.; WAN, K. L.; KHAN, S.; ASLETT, M. A.; AJIOKA, J. W. *Toxoplasma* as a model genetic system. In: SMITH, D. F.; PARSONS, M. (Ed.). **Molecular biology of parasitic protozoa**. Oxford: Oxford University Press, 1995. p. 55-74.
- SILVA, J. C. R.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E. O.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 419-420, 2002.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'umo. Nota preliminare. **Revista Sociedade Scientifica São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.
- SREEKUMAR, C.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; LEHMANN, T.; RAMAN, M.; BHALERAU, D. P.; VIANNA, M. C. B.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3-4, p. 187-194, 2003.
- SU, C.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J.; SIBLEY, D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10753-10758, 2002.

- SUZUKI, Y.; JOH, K. Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon-gamma. **Parasitology Research**, v. 80, n. 1, p. 125-130, 1994.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.
- TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 69-139, 1997.
- TINTI, M.; POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; BARCA, S.; SPANO, F. Analysis of the *SAG5* locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 14, p. 1605-1616, 2003.
- TOMAVO, S.; FORTIER, B.; SOETE, M.; ANSEL, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3750-3753, 1991.
- WALLACE, G. D. Serological and epidemiologic observations on toxoplasmosis on three Pacific atolls. **American Journal of Epidemiology**, v. 90, n. 2, p. 103-111, 1969.
- WELSH, J.; MCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v. 218, n. 8, p. 704-740, 1993.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

APÊNDICE 1

MUNICÍPIO	Nº do gato	Idade	Sexo	Título de Anticorpos*	Bioensaio em camundongos	Isolamento de <i>T. gondii</i>
ARAÇATUBA	58	± 6m	M	Negativo	-	-
	59	± 6m	M	Negativo	-	-
	60	± 6m	M	Negativo	-	-
	61	Adulto	M	800	Sim	Sim
	62	Adulto	F	50	Sim	Não
	111	Adulto	M	Negativo	-	-
	112	Adulto	F	Negativo	-	-
	113	Adulto	F	Negativo	-	-
	114	Adulto	M	Negativo	-	-
	115	Adulto	M	Negativo	-	-
	116	Adulto	M	Negativo	-	-
	117	Adulto	F	Negativo	-	-
	121	Adulto	M	3.200	Sim	Sim
	122	Adulto	F	Negativo	-	-
	123	Adulto	F	800	Sim	Sim
	124	Adulto	F	Negativo	-	-
	125	± 6m	F	Negativo	-	-
	126	Adulto	M	800	Sim	Sim
	127	± 6m	M	Negativo	-	-
	128	± 6m	F	Negativo	-	-
ARARAQUARA	227	± 5m	M	Negativo	-	-
	228	± 5m	M	Negativo	-	-
	229	± 4m	M	Negativo	-	-
	230	± 4m	M	Negativo	-	-
	231	± 4m	M	Negativo	-	-
	232	± 4m	F	Negativo	-	-
	233	± 3m	M	Negativo	-	-
	234	± 3m	M	Negativo	-	-
	235	± 3m	M	Negativo	-	-
	236	± 3m	M	Negativo	-	-
	237	± 3m	F	Negativo	-	-
	238	± 5m	M	Negativo	-	-
	239	Adulto	F	50	Sim	Não
	240	Adulto	F	Negativo	-	-
	241	Adulto	F	25	Sim	Não
	242	Adulto	M	Negativo	-	-
	243	Adulto	F	Negativo	-	-
	244	Adulto	M	Negativo	-	-
CAMPOS DO JORDÃO	200	Adulto	M	200	Sim	Não
	201	Adulto	M	50	Sim	Não
	202	Adulto	F	Negativo	-	-
	203	Adulto	F	25	Sim	Não
	204	Adulto	M	Negativo	-	-
	205	Adulto	M	Negativo	-	-

MUNICÍPIO	Nº do gato	Idade	Sexo	Título de anticorpos	Bioensaio em camundongos	Isolamento de <i>T. gondii</i>
COLINA	104	Adulto	M	100	Não	-
	105	Adulto	M	800	Sim	Não
	106	Adulto	M	Negativo	-	-
	107	Adulto	M	400	Sim	Sim
	108	±5m	F	Negativo	-	-
	109	±8m	M	3.200	Sim	Não
CONCHAS	245	±4m	M	Negativo	-	-
	246	±4m	F	Negativo	-	-
	247	Adulto	F	Negativo	-	-
	248	Adulto	F	100	Sim	Não
	249	Adulto	F	400	Sim	Sim
	250	Adulto	F	25	Sim	Não
	251	Adulto	F	200	Sim	Sim
	252	Adulto	F	1.600	Sim	Sim
	253	Adulto	M	200	Sim	Sim
	254	Adulto	M	100	Sim	Sim
	255	Adulto	M	12.800	Sim	Sim
	256	Adulto	F	200	Sim	Sim
ESPÍRITO SANTO DO PINHAL	57	±5m	M	25	Sim	Não
	85	Adulto	M	200	Sim	Sim
	86	Adulto	F	3200	Sim	Sim
	87	±8m	F	Negativo	-	-
	88	Adulto	F	800	Não	-
	162	Adulto	M	400	Sim	Sim
	163	Adulto	F	50	Sim	Não
	164	Adulto	M	400	Sim	Sim
	165	Adulto	M	100	Sim	Sim
	166	Adulto	F	800	Sim	Sim
	167	Adulto	F	Negativo	-	-
	168	Adulto	F	50	Sim	Não
	169	±6m	M	800	Sim	Sim
	170	Adulto	M	Negativo	-	-
	171	Adulto	M	Negativo	-	-
	172	Adulto	M	Negativo	-	-
	173	Adulto	M	Negativo	-	-
	174	±6m	M	100	Sim	Sim
	175	Adulto	F	Negativo	-	-
	176	Adulto	F	Negativo	-	-

MUNICÍPIO	Nº do gato	Idade	Sexo	Título de anticorpos	Bioensaio em camundongos	Isolamento de <i>T. gondii</i>
GUAÍRA	89	Adulto	M	400	Não	-
	90	±6m	M	Negativo	-	-
	91	±4m	M	Negativo	-	-
	92	±4m	M	Negativo	-	-
	93	±8m	M	Negativo	-	-
	95	Adulto	F	Negativo	-	-
	96	Adulto	M	1600	Sim	Sim
	97	Adulto	F	Negativo	-	-
	98	Adulto	F	1600	Sim	Sim
	99	Adulto	M	3200	Sim	Não
	100	Adulto	F	800	Não	-
	101	±4m	M	25	Não	-
	102	±4m	M	Negativo	-	-
	103	±5m	M	Negativo	-	-
	148	Adulto	F	Negativo	-	-
	149	Adulto	F	800	Sim	Não
	150	Adulto	M	25	Não	-
	151	Adulto	F	800	Sim	Sim
	152	Adulto	M	800	Sim	Sim
	153	Adulto	F	800	Sim	Não
	154	Adulto	F	Negativo	-	-
	155	Adulto	M	Negativo	-	-
	156	Adulto	M	100	Sim	Não
	157	Adulto	F	200	Sim	Não
	158	Adulto	F	1600	Sim	Sim
	159	Adulto	F	400	Sim	Não
	160	Adulto	M	Negativo	-	-
	161	±6m	M	Negativo	-	-
GUARULHOS	23	Adulto	F	Negativo	-	-
	34	Adulto	M	Negativo	-	-
	35	Adulto	M	Negativo	-	-
	36	Adulto	F	Negativo	-	-
	37	Adulto	F	Negativo	-	-
	38	Adulto	F	Negativo	-	-
	39	Adulto	F	Negativo	-	-
	120	Adulto	M	Negativo	-	-
	137	Adulto	F	Negativo	-	-
	138	Adulto	M	Negativo	-	-
MARÍLIA	257	Adulto	F	100	Sim	Sim
	258	Adulto	F	200	Sim	Sim
OSASCO	77	Adulto	M	100	Sim	Sim
	78	Adulto	F	Negativo	-	-
	79	Adulto	M	Negativo	-	-
	80	Adulto	F	Negativo	-	-
	81	Adulto	F	6400	Sim	Sim
	82	Adulto	F	Negativo	-	-
	83	Adulto	M	50	Não	-
	84	±6m	F	Negativo	-	-

MUNICÍPIO	No do gato	Idade	Sexo	Título de anticorpos	Bioensaio em camundongos	Isolamento de <i>T. gondii</i>
PIRASSUNUNGA	185	Adulto	M	Negativo	-	-
	186	Adulto	F	Negativo	-	-
	187	Adulto	F	200	Sim	Não
	188	Adulto	F	400	Sim	Sim
	189	Adulto	F	Negativo	-	-
	190	Adulto	F	Negativo	-	-
	191	Adulto	M	Negativo	-	-
	192	Adulto	F	Negativo	-	-
	193	Adulto	M	Negativo	-	-
	194	Adulto	M	Negativo	-	-
	195	±6m	F	Negativo	-	-
	196	Adulto	F	Negativo	-	-
	197	Adulto	F	100	Sim	Não
	198	±6m	F	12800	Sim	Sim
	199	Adulto	M	800	Sim	Não
	206	Adulto	M	Negativo	-	-
	207	Adulto	F	Negativo	-	-
	208	Adulto	F	50	Sim	Sim
	209	Adulto	F	Negativo	-	-
	210	Adulto	F	50	Sim	Sim
	211	Adulto	F	Negativo	-	-
	212	Adulto	M	Negativo	-	-
	213	Adulto	F	Negativo	-	-
	214	Adulto	F	Negativo	-	-
	215	Adulto	F	Negativo	-	-
	216	Adulto	M	25	Sim	Sim
	217	Adulto	F	Negativo	-	-
	218	Adulto	M	Negativo	-	-
	219	Adulto	F	Negativo	-	-
	220	Adulto	F	100	Sim	Sim
RIBEIRÃO PRETO	139	Adulto	M	Negativo	-	-
	140	Adulto	M	Negativo	-	-
	141	Adulto	F	800	Sim	Sim
	142	±6m	M	Negativo	-	-
	143	Adulto	M	Negativo	-	-
	144	Adulto	F	Negativo	-	-
	145	Adulto	F	Negativo	-	-
	146	±6m	M	Negativo	-	-
	177	Adulto	F	400	Sim	Sim
	178	Adulto	F	800	Sim	Sim
	179	Adulto	F	800	Sim	Sim
	180	Adulto	M	Negativo	-	-
	181	Adulto	M	Negativo	-	-
	182	Adulto	M	Negativo	-	-
	183	Adulto	M	Negativo	-	-
	184	Adulto	M	25	Sim	Não
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	129	Adulto	F	Negativo	-	-
	130	±8m	F	Negativo	-	-
	131	Adulto	F	Negativo	-	-
	132	Adulto	F	Negativo	-	-
	133	±8m	F	6400	Sim	Sim
	134	Adulto	M	50	Não	-
	135	Adulto	M	400	Sim	Sim
	136	±6m	M	Negativo	-	-

MUNICÍPIO	Nº do gato	Idade	Sexo	Título de anticorpos	Bioensaio em camundongos	Isolamento de <i>T. gondii</i>
SÃO PAULO	1	Adulto	M	800	Sim	Sim
	2	Adulto	F	800	Sim	Sim
	3	Adulto	M	Negativo	-	-
	4	Adulto	M	Negativo	-	-
	5	Adulto	M	Negativo	-	-
	6	Adulto	F	400	-	-
	7	Adulto	M	Negativo	-	-
	8	±8m	F	Negativo	-	-
	9	Adulto	M	Negativo	-	-
	10	Adulto	M	Negativo	-	-
	11	Adulto	F	800	Sim	Sim
	12	Adulto	M	Negativo	-	-
	13	Adulto	F	Negativo	-	-
	14	Adulto	M	Negativo	-	-
	15	Adulto	M	1600	Sim	Sim
	16	Adulto	F	Negativo	-	-
	17	±6m	M	Negativo	-	-
	18	Adulto	M	400	Sim	Sim
	19	Adulto	F	100	Sim	Sim
	20	Adulto	M	100	Sim	Não
	21	Adulto	M	Negativo	-	-
	22	Adulto	M	Negativo	-	-
	24	Adulto	F	Negativo	-	-
	25	Adulto	M	Negativo	-	-
	26	Adulto	M	Negativo	-	-
	27	Adulto	M	Negativo	-	-
	28	Adulto	M	Negativo	-	-
	29	Adulto	F	Negativo	-	-
	30	Adulto	F	400	Não	-
	31	±8m	F	Negativo	-	-
	32	±8m	F	Negativo	-	-
	33	±8m	F	Negativo	-	-
	69	Adulto	M	Negativo	-	-
	70	Adulto	F	Negativo	-	-
	71	Adulto	F	Negativo	-	-
	72	Adulto	F	Negativo	-	-
	73	Adulto	M	Negativo	-	-
	74	Adulto	M	Negativo	-	-
	75	Adulto	F	50	Não	-
	76	Adulto	F	Negativo	-	-
	110	Adulto	F	25	Não	-
	118	Adulto	F	Negativo	-	-
	119	Adulto	M	Negativo	-	-
	147	Adulto	M	Negativo	-	-
	221	Adulto	M	Negativo	-	-
	222	Adulto	F	Negativo	-	-
	223	Adulto	F	Negativo	-	-
SOROCABA	63	Adulto	F	1600	Não	-
	64	±6m	F	Negativo	-	-
	65	±8m	M	Negativo	-	-
	66	±8m	F	Negativo	-	-
	67	±8m	F	Negativo	-	-
	68	Adulto	F	Negativo	-	-