Alessandra Mara Alves Ragozo

Isolamento e caracterização biológica e genotípica de
Toxoplasma gondii de ovinos e caprinos

São Paulo

2007

Alessandra Mara Alves Ragozo

Isolamento e caracterização biológica e genotípica de
Toxoplasma gondii de ovinos e caprinos

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

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1839
FMVZ

Ragozo, Alessandra Mara Alves
Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos / Alessandra Mara Alves Ragozo. — São Paulo: A. M. A. Ragozo, 2007.
114 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Genótipos. 3. Ovinos. 4. Caprinos. 5. Caracterização molecular. I. Título.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização biológica e genética de isolados de *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos do Estado de São Paulo, Brasil" Protocolo nº 280/2003, utilizando 75 camundongos, sob a responsabilidade da Profª Drª 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 referendum".

(We certify that the Research "Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolate from sheep and goats from São Paulo State, Brazil" protocol number 280/2003, utilizing 75 mice, under the responsibility of Profª Drª 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 referendum").

São Paulo, 01 de abril de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RAGOZO, Alessandra Mara Alves

Título: Isolamento e caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos

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:	_____

**DEDICO ESSE TRABALHO AOS MEUS QUERIDOS PAIS,
MARINO E HIEDA, PELOS INÚMEROS CONSELHOS
E INCENTIVOS PARA SEMPRE
BUSCAR UM PERFEIÇOAMENTO PROFISSIONAL**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a DEUS...

pela presença real em minha vida, capacitando-me em tempos difíceis e revelando sua infinita graça e misericórdia nas horas de alegria.

À minha orientadora Solange Maria Gennari,

Por ter acreditado em mim e proporcionado a oportunidade da realização do meu sonho. Pelos inúmeros ensinamentos, confiança, paciência, incentivo e amizade, minha eterna gratidão e admiração

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Paulo, que desde o início deste trabalho me acompanhou, ajudou, incentivou e
em todos os momentos sempre esteve ao meu lado.

Obrigada pelo carinho, dedicação, paciência, companheirismo e amor!

Aos meus irmãos Ana Cristina e Carlos Renato

e aos meus cunhados Carlos Eduardo e Juliana

e à D. Teresa

pelo apoio e incentivo.

Às minhas sobrinhas Mariana e Milena

pelos momentos de alegria e descontração!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela colaboração, pelos preciosos ensinamentos e principalmente pela amizade e agradável convívio.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e à Prof^a. Dr^a. Nobuko Kasai pela amizade e pelos valiosos conselhos científicos.

Ao Prof. Dr. Ricardo A. Dias pela enorme ajuda na análise estatística do experimento, confecção dos mapas, pela amizade e paciência com a “dupla dinâmica”.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (VPS-USP) para a realização de parte deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, em especial ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos por permitir a entrada no VPS.

Ao Prof. Dr. Alessandro Amarante do ICB - Unesp Botucatu disponibilizar os animais e às amigas e pós graduandas Patrícia Bricharelo e Raquel A. Rocha pelo auxílio, amizade e agradável convívio.

Ao Prof. Dr. Heraldo C. Gonçalves da FMVZ – Unesp de Botucatu por disponibilizar os animais do capril da Universidade.

A minha Tia Heloísa, pelo apoio, incentivo, inúmeros e valiosos conselhos e carinhosa acolhida em sua residência durante meu estabelecimento em São Paulo.

Ao Pr. Wagner e Célia pelos conselhos, apoio, amizade e pela acolhida em sua residência.

Ao Paulo H. Pihan e ao meu primo Paulo J. L. Molento pelo auxílio na confecção da tese.

A pós graduanda e amiga Lucia Eiko pela ajuda durante todo o experimento e principalmente pela valiosa amizade, convívio e os inúmeros conselhos durante esse período.

À Técnica de Nível Superior Dr^a. Hilda F.J. Pena, pelo apoio, valiosos ensinamentos, colaboração sempre que solicitada e principalmente pela amizade durante todos esses anos de convivência.

À bolsista Luciana Nunes de Oliveira pela amizade, pelo agradável período que passamos juntas e auxílio na realização dos bioensaios e preparo do material utilizado.

Adriana Cortês pela amizade e valiosos conselhos e à Renata Paixão pelo auxílio prestado na foto-documentação.

Aos funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias Pedro César Ferreira (Pedrinho) pelo convívio e auxílio no laboratório e ao Renato Caravieri (Renatinho), pela gratificante amizade e valiosos conselhos, mesmo distante durante esse período.

Ao funcionário Bispo, pelo auxílio na coleta de sangue dos ovinos de Araçariguama, aos funcionários do VPS de Pirassununga, Sr. Antônio e Zé Roberto (Ni) e ao colega Cláudio (Espeto) pela coleta de material em Leme.

Aos funcionários Antonio, Cláudia e Rosana pelo fornecimento dos camundongos.

Aos amigos Sérgio S. Azevedo e Marcelo Zanutto pelo auxílio e coleta de material.

As amigas que encontrei no VPS Aline, Amane, Dani, Eliana, Eliane (Carioca), Iara, Josana, Lara, Leslie e Renata.

Aos demais amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias Adriano, Alexandre Ataliba, Alexandre Thomaz, Daniel, Fernanda, Guacy, Maria, Mauricio, Mikaela, Patrícia, Ricardo, Richard, Silvio, Simone e Thaís.

A todos os amigos do VPS que convivi por todos esses anos, os quais pude me relacionar e compartilhar momentos agradáveis e de descontração.

A todos os funcionários que prestaram auxílio durante esse tempo de estudos: Alexandre, Carol, Gisele, Jucélia, Priscila, Sandra, Sheila e Zenaide.

Aos funcionários da Secretaria do VPS, Cristina, Danival e Virgínia pela amizade, auxílio, incentivo, apoio e dedicação.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, em especial Cláudia, Elza, Helena e Solange, pela gentileza, atenção e esclarecimentos.

À Associação Paulista dos Criadores de Ovinos (ASPACO) pela permissão da utilização dos animais do Concurso Cordeiro Paulista e pelo fornecimento dos dados de frigoríficos responsáveis pelo abate de ovinos.

Aos caprinocultores e ovinocultores que nos permitiram colher o material deste estudo e prestaram as informações necessárias.

A todos camundongos, ovinos e caprinos que involuntariamente participaram do experimento.

A todos os colegas, funcionários, bolsistas e estagiários que anonimamente ajudaram que este trabalho fosse concluído, meus sinceros agradecimentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela Bolsa de Doutorado (processo nº 03/02068-0).

POIS TUDO, ABSOLUTAMENTE TUDO NOS **CÉUS** E NA TERRA, **VISÍVEL** E
INVISÍVEL [...] TODAS AS COISAS COMEÇARAM NELE E
NELE ENCONTRARAM SEU **PROPÓSITO**

COLOSSENSES 1:16

Resumo

RAGOZO, A. M. A. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos**. [Isolation and biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from sheep and goats]. 2007 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

O objetivo deste estudo foi o isolamento de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos e posterior caracterização genotípica desses isolados. Amostras de soros ovinos (495) de 36 Municípios do Estado de São Paulo e de caprinos (143) de seis Municípios dos Estados da Bahia (10), Paraíba (12), Rio Grande do Norte (7) e São Paulo (114) foram testadas, através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT $\geq$ 25) à presença de anticorpos anti-*T. gondii*. Dos animais amostrados, 24,2% e 32,2% dos ovinos e caprinos respectivamente, apresentaram-se positivos com títulos que variaram de 25 a 3200 em ambas espécies. Dentre os ovinos houve associação ($p<0,001$) entre sexo, idade e sistema de produção com a presença de anticorpos anti-*T. gondii*. Os caprinos apresentaram associação entre idade, sistema de produção, e raça com a soropositividade. Para o isolamento do agente o bioensaio em camundongos foi realizado utilizando-se *pool* de tecidos de ovinos (cérebro, coração e diafragma) e caprinos soropositivos (cérebro, coração e diafragma e masseter). Dos 82 bioensaios realizados com amostras de ovinos, 16 isolados (19,5%) foram obtidos. Houve associação entre o título de anticorpos anti-*T. gondii* e o isolamento do agente ($p<0,001$) com maior quantidade de isolados obtidos de animais com títulos mais altos. Para a caracterização genotípica das amostras utilizou-se a análise de polimorfismo de comportamento dos fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP) sobre produtos do *locus* SAG2 amplificados pela PCR, que as identifica em genótipos I, II e III. Amostras do tipo I (87,5% dos ovinos e 100 % dos caprinos) e do tipo III (12,5% dos isolados de ovinos) foram obtidas e não houve o encontro de isolados tipo II ou mistas. Nos tecidos dos animais com títulos de anticorpos superiores a 400, e dos quais não se obteve o isolamento do agente pelo bioensaio (21 amostras de ovinos), foi realizada a *nested*-PCR das amostras primárias (homogeneizado de tecidos), não sendo obtida nenhuma amplificação. Amostras do tipo III não causaram óbitos nos camundongos e as tipo I causaram óbitos em 51,0% e 83,4% dos isolados de ovinos e caprinos, respectivamente. Houve associação entre a sobrevivência dos camundongos infectados com o genótipo I de caprinos e ovinos ($p<0,001$).

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Genótipos. Ovinos. Caprinos. Caracterização Molecular.

ABSTRACT

RAGOZO, A. M. A. **Isolation and biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* from sheep and goats.** [Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos]. 2007 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

The aim of this study was to analyze the SAG2 locus of *Toxoplasma gondii* isolated from sheep and goats in order to determine the frequency of occurrence of the three different lineages (types I, II and III). Serum samples of sheep (495) from 36 counties in São Paulo State and goat (143) from six counties in States of Bahia (10), Paraíba (12), Rio Grande do Norte (7) and São Paulo (114) were analyzed by the modified agglutination test (MAT $\geq$ 25) for the detection of antibodies anti-*T. gondii*. Occurrence of antibodies anti-*T. gondii* was 24.2% and 32.2% in sheep and goats, respectively. The titers varied from 25 to 3200 in both species. Among sheeps, association of seropositivity ($p<0,001$) with sex, age, production system and presence of antibodies anti-*T. gondii* was observed. Association was also observed between the frequency of seropositive goats and age, production system and breed. For *T. gondii* isolation, pool of tissues of each seropositive sheep (brain, heart and diaphragm) and goat (brain, heart, diaphragm and masseter) were bioassayed in mice. From a total of 82 bioassay performed with sheep samples, 16 isolates (19.5%) were obtained. Association between antibodies anti-*T. gondii* titers and isolation was observed ($p<0.001$). Considering the goats, 12 isolates (42.6%) were obtained from 26 bioassays. For the genotypic characterization (genotype I, II and III), the restriction fragment length polymorphism (RFLP) was performed on fragments of the locus SAG2 amplified by PCR. Samples of type I (87.5% from sheep and 100% from goats) and type III (12.5% from sheep) was observed. Neither type II nor mixed samples were observed. In tissues samples from animals with antibodies titers above 400 in which *T. gondii* was not isolated (21 sheep sample), nested-PCR was performed and no amplification was observed. Mortality was not observed in the mice infected by the isolates type III. The isolates of type I from sheep and goats, respectively, killed 51.0% and 83.4% of the infected mouse. Association was also observed between mortality rate in infected mice and genotype I of sheep and goat ($p<0.001$).

Key-Words: *Toxoplasma gondii*. Genotypes. Sheep. Goat. Characterization Molecular.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Soroprevalência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> de ovinos e caprinos em diferentes Estados Brasileiros.....	26
Quadro 2	Genotipagem de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de galinhas de diferentes países no período de 2002-2007 pela análise no <i>locus</i> SAG2.....	34
Quadro 3	Comportamento dos produtos de <i>nested</i> -PCR oriundos dos genótipos I, II e III frente a restrição enzimática com as enzimas <i>Sau3AI</i> e <i>HhaI</i>	56
Quadro 4	Nomes e seqüências dos <i>primers</i> usados na PCR e <i>nested</i> -PCR para amplificação de fragmentos do gene SAG2 de <i>Toxoplasma gondii</i>	56

LISTA DE MAPAS

Mapa 1	Localização dos Municípios, no Estado de São Paulo, origem das amostras dos soros ovinos. São Paulo – 2007.....	46
Mapa 2	Localização dos Município e Estados de origem das amostras de soros caprinos. São Paulo – 2007.....	48
Mapa 3	Localização dos Municípios no Estados de São Paulo, nos quais isolados de <i>T. gondii</i> foram obtidos e genótipos encontrados pela PCR-RFLP no <i>locus</i> SAG2. São Paulo – 2007.....	75
Mapa 4	Localização dos Municípios e Estados nos quais isolados de <i>T. gondii</i> foram obtidos de caprinos. São Paulo – 2007.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do sistema proposto por Howe et al. (1997) para genotipagem de <i>T. gondii</i> , baseado na PCR-RFLP de fragmentos do <i>locus</i> SAG2. Neste procedimento, dois produtos de <i>nested</i> -PCR são produzidos e submetidos à restrição enzimática.....	55
Figura 2	PCR – RFLP do <i>locus</i> SAG2, em gel de agarose a 2%, para genotipagem e isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de ovinos naturalmente infectados.....	72
Figura 3	PCR – RFLP do <i>locus</i> SAG2, em gel de agarose a 2%, para genotipagem e isolados de <i>T gondii</i> de caprinos naturalmente infectados.....	87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Ocorrência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (MAT $\geq$ 25), em ovinos, segundo idade e sexo - São Paulo – 2007.....	62
Gráfico 2	Ocorrência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (MAT $\geq$ 25), em ovinos, segundo sistema de produção - São Paulo – 2007.....	64
Gráfico 3	Distribuição dos anticorpos anti- <i>T.gondii</i> dos ovinos em relação ao bioensaio em camundongos. São Paulo – 2007.....	68
Gráfico 4	Número de isolados obtidos através do bioensaio em camundongos com tecidos de ovinos do Estado de São Paulo, por porcentagem de óbitos dos camundongos. São Paulo – 2007.....	70
Gráfico 5	Distribuição dos fenótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> isolados de ovinos naturalmente infectados no Estado de São Paulo, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose nos grupos de camundongos. São Paulo – 2007.....	76
Gráfico 6	Proporção de camundongos sobreviventes infectados com os genótipos I e III de <i>Toxoplasma gondii</i> do dia 0 até o término do experimento(60 dias). São Paulo – 2007.....	77
Gráfico 7	Ocorrência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (MAT $\geq$ 25), em caprinos, segundo idade e sexo - São Paulo – 2007.....	79
Gráfico 8	Ocorrência de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (MAT $\geq$ 25), em caprinos, segundo sistema de produção - São Paulo – 2007.....	81
Gráfico 9	Distribuição dos anticorpos anti- <i>T.gondii</i> dos caprinos em relação ao bioensaio em camundongos. São Paulo – 2007.....	84
Gráfico 10	Número de isolados obtidos através do bioensaio em camundongos com tecidos de caprinos, por porcentagem de óbitos dos camundongos. São Paulo – 2007.....	86
Gráfico 11	Proporção de camundongos sobreviventes infectados com os isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de caprinos naturalmente infectados do dia 0 até o término do experimento (60 dias). São Paulo – 2007.....	90
Gráfico 12	Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo I de <i>Toxoplasma gondii</i> de ovinos e caprinos do dia 0 até o término do experimento (60 dias).. São Paulo – 2007.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de ovinos no Estado de São Paulo, obtidos para detecção de anticorpos anti- <i>T.gondii</i> segundo Município de procedência, faixa etária e sexo. São Paulo – 2007.....	45
Tabela 2	Número de caprinos obtidos para detecção de anticorpos anti- <i>T.gondii</i> segundo Município e Estado de procedência, faixa etária e sexo. São Paulo – 2007.....	47
Tabela 3	Frequência de ovinos soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> (MAT≥ 25), segundo a raça. São Paulo – 2007.....	63
Tabela 4	Frequência de ovinos soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> (MAT≥ 25), segundo a sistema de produção. São Paulo – 2007.....	64
Tabela 5	Frequência de ovinos soropositivos para <i>Toxoplasma gondii</i> (MAT≥ 25), segundo o título de anticorpos. São Paulo – 2007.....	65
Tabela 6	Distribuição do número de ovinos examinados e soropositivos para anticorpos anti- <i>T.gondii</i> (MAT≥ 25), segundo idade e o Município de procedência no Estado de São Paulo. São Paulo – 2007.....	66
Tabela 7	Distribuição de bioensaios realizados e isolados obtidos, segundo o título de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (MAT≥ 25) em ovinos. São Paulo – 2007.....	68
Tabela 8	Distribuição do número de bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de ovinos por Município de procedência no Estado de São Paulo. São Paulo – 2007.....	69
Tabela 9	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de ovinos através do bioensaio em camundongos, segundo Município de procedência no Estado de São Paulo e título de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos ovinos. São Paulo – 2007.....	78
Tabela 10	Frequência de caprinos soropositivos para <i>T. gondii</i> (MAT≥ 25), segundo a raça. São Paulo – 2007.....	80
Tabela 11	Frequência de caprinos soropositivos para <i>T. gondii</i> (MAT≥ 25), segundo sistema de produção. São Paulo – 2007.....	81
Tabela 12	Frequência de caprinos soropositivos para <i>T. gondii</i> através do (MAT≥ 25), segundo título de anticorpos. São Paulo – 2007.....	82
Tabela 13	Frequência de caprinos soropositivos para <i>T. gondii</i> (MAT≥ 25), segundo Município e Estado de procedência e idade. São Paulo – 2007.....	82
Tabela 14	Distribuição do número de bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de caprinos, segundo o título de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> . São Paulo – 2007.....	84
Tabela 15	Distribuição do número de bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de caprinos por Município e Estado de procedência. São Paulo – 2007.....	85
Tabela 16	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de caprinos através do bioensaio em camundongos, segundo Município e Estado de procedência e título de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos caprinos. São Paulo – 2007.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrometro (s)
μg	micrograma(s)
μL	Microlitro (s)
μM	micromolar
BSA	albumina sérica bovina
CH_3COONa	acetato de sódio
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	2'-deoxiguanina 5'-trifosfato
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	e colaboradores
g	grama(s)
g	aceleração da gravidade terrestre ($9,8\text{m/s}^2$)
H_3BO_3	ácido bórico
HCl	ácido clorídrico
<i>Hha</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Hin</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência
KCl	cloreto de potássio
M	molar
MAT	teste de aglutinação modificado
<i>Mbo</i>	<i>Morixella bovis</i>
Mg	Miligrama (s)
MgCl_2	cloreto de magnésio
mL	Mililitro(s)
mM	milimolar
mm^2	milímetro quadrado
N	normal
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NaH_2PO_4	fosfato de sódio monobásico anidro

NaN ₃	azida sódica
<i>n</i> PCR	<i>nested</i> -PCR
P.I.	Pos infecção
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
pk	proteínase K
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
<i>Sau</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
SSR	Seqüências simples repetidas
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris-borato- EDTA
TE	Tampão Tris- EDTA
Tris	hidroximetilaminometano
U	unidade internacional
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS	42
3.1.1 Local do Experimento	43
3.2. ANIMAIS EXPERIMENTADOS	43
3.3 COLETA DE SANGUE E ÓRGÃOS	49
3.4 EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. GONDII</i>	49
3.5 ISOLAMENTO DE <i>T. GONDII</i> EM CAMUNDONGOS	50
3.5.1 Digestão péptica de tecidos	50
3.5.2 Bioensaio em camundongos	51
3.5.2.1 Pesquisa de <i>T. gondii</i>	52
3.5.3 Congelamento dos Isolados e Criopreservação	53
3.6 ANÁLISE GENOTÍPICA	53
3.6.1 Extração e purificação do DNA	53
3.6.2 PCR-RFLP	54
3.6.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	56
3.6.2.2 PCR	57
3.6.2.3 <i>Nested</i> -PCR	58
3.6.2.4 Ciclo empregado	59
3.6.2.5 Análise do Produto Amplificado	59
3.6.2.6 RFLP	60
4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
5 RESULTADOS	62
5.1 OVINOS	62
5.1.1 Sorologia	62
5.1.2 Bioensaio em camundongos e isolamento de <i>T.gondii</i>	67
5.1.3 Análise Genotípica	71
5.1.3.1 PCR – RFLP	71
5.1.3.2 - <i>n</i> PCR – RFLP - Amostras Primárias	73
5.1.4 Genótipos de <i>T.gondii</i>	73
5.2 CAPRINOS	79
5.2.1 Sorologia	79
5.2.2 Bioensaio em camundongos e isolamento de <i>T.gondii</i>	83
5.2.3 Análise Genotípica	86
5.2.3.1 PCR – RFLP	86
5.2.4 Genótipos de <i>T.gondii</i> em caprinos	88
5.3 SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS DO GENÓTIPO TIPO I DE OVINOS E CAPRINOS	92
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106

1 - INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de caráter cosmopolita, causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório, que acomete o homem e outras espécies de mamíferos e aves (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; MCLEOD; DESMONTS, 1995). Por sua importância médica e veterinária, o *T. gondii* tem sido o parasito mais intensamente estudado entre os coccídios. No entanto, muitos aspectos de sua biologia, ciclo biológico e epidemiologia continuam sendo investigados, destacando-se a utilização de métodos moleculares para o seu estudo (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

As primeiras descrições deste protozoário foram realizadas na França por Nicolle e Manceux, em 1908, em roedor silvestre (*Ctenodactylus gundi*). Concomitantemente, no Brasil, Splendore o descreveu em coelhos. O termo *Toxoplasma* deriva do grego e decorre de seu formato em arco crescente (toxon = arco, plasma = forma), e a palavra *gondii* é uma referência ao roedor no qual inicialmente foi descrito. Em 1909 foi introduzido o gênero *Toxoplasma* no filo Apicomplexa (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Os três meios primários para a difusão deste protozoário são a transmissão transplacentária, a ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes e a ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de gatos contendo oocistos esporulados. Atualmente não há métodos que determinem se um hospedeiro se infectou pela ingestão de cistos teciduais ou de oocistos esporulados (DUBEY, 1994; DUBEY, 2001).

Os estágios infectantes do parasita são: os taquizoitos (forma de multiplicação rápida) caracterizando a infecção aguda; os bradizoitos (forma de multiplicação lenta) em cistos teciduais, presentes na fase crônica ou latente da infecção e os esporozoítos, presentes nos oocistos que são eliminados nas fezes de felídeos infectados com o agente (DUBEY; DESMONTS, 1987a).

O ciclo biológico do *T. gondii* é heteroxeno facultativo. A fase sexuada de desenvolvimento ocorre somente nos felídeos (silvestres e gatos domésticos), hospedeiros definitivos do agente. Com o desenvolvimento enteroepitelial nessas espécies, há a formação de oocistos os quais são eliminados juntamente com as

fezes contaminando o meio ambiente; porém nesses animais, também pode ocorrer paralela ou simultaneamente, a multiplicação extra intestinal assexuada (taquizoítos e bradizoítos). Nos hospedeiros intermediários, como o homem, ovinos e caprinos, ocorre unicamente a forma de multiplicação assexuada (DUBEY, 1986b).

A infecção determinada pelo *T.gondii* é uma das mais importantes infecções parasitárias do homem, estima-se que até um terço da população humana no mundo tenha sido exposta ao agente (JACKSON; HUTCHISON, 1989; ASHBURN, 1992; DUBEY, 1998a), porém a toxoplasmose geralmente apresenta-se assintomática ou de forma branda em indivíduos imunocompetentes.

O parasito ocorre de forma cosmopolita e sua prevalência varia nas populações. Nos EUA, em humanos, estima-se a ocorrência de aproximadamente 30% (MORGAN et al., 2000); há relatos, nos países da Europa Central, de valores entre 37 a 58% de soropositividade em crianças e mulheres gestantes (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No Brasil, a prevalência é mais elevada, variando de 50 (ARAÚJO¹, 1970 *apud* DUBEY; BEATTIE, 1988) a 80% (SOUZA² et al., 1987 *apud* DUBEY; BEATTIE, 1988).

As diferenças observadas nos valores de prevalência do agente entre os grupos étnicos pela pesquisa de anticorpos séricos, está intimamente ligada a aspectos ambientais e sócio-culturais como hábitos alimentares e condições higiênico-sanitárias, refletindo na epidemiologia do *T. gondii* (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Normalmente, *T. gondii* parasita o hospedeiro sem produzir 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, como retardo mental e cegueira em crianças. Em ovinos, caprinos e suínos, leva a abortamentos e mortalidade neonatal; (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).

¹ARAÚJO, F.G. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em doadores de sangue. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.12, p.105, 1970

²SOUZA, W.J.S.; COUTINHO, S.G.; LOPES, C.W.G.; DOS SANTOS, C.S.; NEVES, N.M.; CRUZ, A.M. Epidemiological aspects of toxoplasmosis in school children residing in localities in the urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, p.457, 1987.

A toxoplasmose é relativamente comum em pequenos ruminantes (MAINAR et al., 1996) sendo responsável por problemas reprodutivos gerando grandes perdas econômicas em rebanhos de ovinos e caprinos, onde a infecção torna-se a principal causa de abortamentos, malformações fetais, nascimento de animais prematuros e mortes neonatais (MALIK; DREESEN; CRUZ, 1990).

Os sinais clínicos observados em ovinos diferem de acordo com o estágio reprodutivo da ovelha no momento da infecção. Ovelhas não gestantes susceptíveis geralmente não apresentam sintomas (VAUGHAN, 1996), ocorrendo a formação de cistos em tecidos nervoso e muscular (MARCA et al., 1996). A infecção de ovelhas com dois a quatro meses de gestação pode resultar em placentite severa, infecção fetal levando o feto à morte, mumificação e abortamento (VAUGHAN, 1996).

Os caprinos são considerados os mais susceptíveis ao agente dentre os animais de produção (DUBEY et al., 1980; DUBEY, 1987b). Nesta espécie, além de distúrbios reprodutivos, o *T.gondii* pode causar encefalite, nefrite, hepatite, enterite e cistite em animais adultos (MEHDI; KAZACOS; CARLTON, 1983). Entretanto, na maioria dos caprinos adultos, os sinais clínicos da toxoplasmose se restringem ao trato reprodutivo, levando a quadros de abortamentos, morte, absorção ou retenção fetal, nascimento de cabritos prematuros, fracos ou debilitados e morte de animais jovens (DUBEY, 1987b).

O Brasil conta com rebanho ovino e caprino que somados representam aproximadamente 28 milhões de cabeças (IBGE, 2006), equivalente a 1,02 % do efetivo mundial que é de aproximadamente 2.800.000 milhares de cabeças de ovinos e caprinos (ANUALPEC, 2006). No período que compreende os anos de 1999 a 2004; o crescimento da criação de ovinos e caprinos no Brasil foi de aproximadamente 4,6% e 16,5% respectivamente (IBGE, 2006).

O rebanho ovino brasileiro é estimado em aproximadamente 15 milhões de cabeças; sendo 493 mil animais mantidos na região sudeste e destes, 55,7% localizados no Estado de São Paulo, sendo considerado o maior criador da espécie na região. Nos últimos cinco anos a ovinocultura paulista apresentou um crescimento de 29,5% (IBGE, 2006).

O rebanho caprino é estimado em 10 milhões de cabeças (IBGE, 2006) e um crescente mercado consumidor dos seus produtos e derivados. Nos últimos

anos, intensificou-se o interesse pela caprinocultura como alternativa ao leite de origem bovina (CORDEIRO, 1998).

Apesar do consumo médio de carne ovina e caprina no Brasil ser muito baixo, cerca de 700 g por habitante/ano nos últimos anos, este produto considerado nobre, vem sendo encontrado em supermercados, boutiques de carnes, açougues e restaurantes finos das grandes cidades, quebrando o paradigma do consumo apenas rural e em pequenas cidades do interior. As estimativas de consumo interno são crescentes tanto para carne ovina como caprina, apesar dos dados serem inferiores à realidade, devido a informalidade na criação dessas espécies ser alta. No período de 1992 a 2000, a taxa de crescimento do mercado foi de 1,8 t/ano para a carne ovina e 911,4 kg/ano para a carne caprina (COUTO, 2001).

Levando em consideração que uma das formas de transmissão do *T. gondii* é pela ingestão de carne crua ou mal cozida, ou através do leite *in natura*, os caprinos e ovinos podem representar uma fonte de infecção para o homem e para os animais carnívoros (DUBEY, 1980; CHIARI; NEVES, 1984; VITOR et al., 1991). Bonametti et al. (1997) relataram um surto de toxoplasmose aguda humana adquirida após a ingestão de carne crua de ovino. Todos os animais da propriedade foram testados para a detecção de anticorpos anti- *T. gondii* e 23,1% foram soropositivos.

A eliminação do parasito no período de lactação já foi observada em cabras, infectadas experimentalmente, havendo eliminação do *T. gondii* em 12,7% (9/71) das cabras (VITOR et al., 1991) e determinando que este pode sobreviver no leite por sete dias à temperatura de 4°C (WALSH et al., 1999). Há relatos de infecção de indivíduos pelo *T. gondii* pela ingestão de leite de cabra *in natura*. Num surto de toxoplasmose numa propriedade rural na Califórnia, foi observada associação entre o consumo de leite *in natura* e a toxoplasmose aguda em 10 indivíduos da localidade. Anticorpos anti-*T. gondii* (IgM e IgG) foram observados apenas em duas cabras que produziam leite para o consumo dos envolvidos, nos demais animais não foi observada soropositividade (SACKS et al., 1982).

Em Minas Gerais, também houve relato de um surto de toxoplasmose em membros da mesma família devido à ingestão de leite de cabra *in natura*. Anticorpos

anti-*T.gondii* foram detectados nos caprinos e pela inoculação do leite foi possível o isolamento do parasito em camundongos (CHIARI et al., 1984).

Relatos da prevalência de anticorpos anti-*T.gondii* em ovinos e caprinos têm sido descritos em vários países, numa revisão realizada por Tenter; Heckerroth; Weiss (2000) observaram valores que variam de 23 a 72% em ovinos e de 3 a 69% dentre os caprinos em estudos de soroprevalência em 40 países entre os anos de 1990 a 2000.

No Brasil, foi observada uma variação na soropositividade de 14,5 (MAINARDI et al, 2003) a 44,8% (SILVA et al., 2006) em ovinos e entre 8,0 (SILVA et al., 2002) a 40,4% (SILVA et al., 2002) em caprinos procedentes de diversos Estados. No quadro 1 podem ser observados valores de soroprevalência do *T. gondii* em ovinos e caprinos.

Estado	Espécie	Nº. Examinados/ Nº. Positivos	Ocorrência (%)	Teste	Autor
Bahia	ovina	45/240	18,8	LAT	Gondim et al. (1999)
	caprina	127/439	28,9	LAT	
Distrito Federal	ovina	364/1028	38,2	RIFI	Ueno et al. (2005)
Minas Gerais	caprina	34/174	19,5	RIFI	Figueiredo et al. (2001)
Paraná	ovina	157/305	51,4	RIFI	Romanelli (2002)
Pernambuco	caprina	42/100	42,0	RIFI	Oliveira et al. (1995)
	ovina	61/173	35,3	RIFI	
	caprina	50/123	40,4	RIFI	
Rio Grande do Sul	ovina	39/87	44,8	RIFI	Silva et al. (2006)
Rondônia	ovina	66/141	46,8	RIFI	Cavalcante et al. (2004)
São Paulo	ovina	23/100	23,0	RIFI	Silva et al. (2002)
	caprina	8/100	8,0	RIFI	
	ovina	62/200	31,0	RIFI	
	caprina	34/200	17,0	RIFI	Mainardi et al. (2003)
	ovina	64/442	14,5	RIFI	
	ovina	207/597	34,7	RIFI	
	caprina	113/394	28,7	RIFI	Figliuolo et al. (2004)
	caprina	216/923	23,4	RIFI	
					Stachissini (2005)

LAT: teste de aglutinação em látex, RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

Quadro 1 – Soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* de ovinos e caprinos em diferentes Estados Brasileiros

Para a detecção dos 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). O bioensaio em camundongos é importante, pois o número de cistos em animais maiores é baixo, ao redor de um cisto por 25-250 g de órgão. A digestão dos tecidos com 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, do hospedeiro e do tempo de infecção (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY et al., 1997a).

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, em gatos naturalmente infectados estes tem sido mais prevalentes em

tecidos musculares (DUBEY et al. 2004g; PENA; 2004). Em ovinos experimentalmente infectados foi observada a maior ocorrência do agente no coração e cérebro pela histopatologia, pelo bioensaio em camundongos e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1998; ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). Silva e Langoni (2001) observaram melhores índices de isolamento pelo bioensaio em camundongos, utilizando cérebro e diafragma de ovinos naturalmente infectados.

Em caprinos experimentalmente infectados, há relatos de maior detecção de cistos teciduais na musculatura esquelética, diafragma, coração e cérebro (DUBEY et al., 1980). Nishi; Kasai e Gennari (2001) observaram maior frequência de isolamento do agente nos bioensaios em camundongos pela inoculação de tecidos da musculatura e cérebro de caprinos infectados experimentalmente com o parasito.

Há considerável variabilidade em relação à virulência nos diferentes isolados de *T. gondii*, sejam de origem humana como de animais. O camundongo (*Mus musculus*) é o principal animal de laboratório usado como modelo experimental da toxoplasmose e através da realização de bioensaios nessa espécie animal, resultou em vários estudos de observação da virulência das amostras obtidas durante o isolamento do agente (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Além da quantidade de parasitos encontrados nos tecidos, há relatos de diferença entre os diversos tipos de hospedeiros (COSTA et al., 1977; ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1997). Segundo Costa et al. (1977), apesar de serem considerados resistentes ao agente por não apresentarem abortamentos como os ovinos, os bovinos também são susceptíveis à infecção quando inoculados experimentalmente, apresentando sinais clínicos evidentes e desenvolvendo lesões oculares e detecção de anticorpos, porém o isolamento do agente foi observado apenas nos linfonodos, nos tecidos do cérebro, coração, pulmão e fígado não foi detectado parasitismo.

Comparando a resposta imune entre ovinos e bovinos foi observado que nos bovinos, esta é mais efetiva do que nos ovinos, no entanto a primoinfecção nas ovelhas resulta em abortamento ou nascimento de animais debilitados porém em bovinos o parasito é eliminado rapidamente dos tecidos e não há relatos de abortamento pelo *T. gondii* (ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1997).

Também são observadas diferenças nas manifestações clínicas da toxoplasmose. Em humanos imunocompetentes cronicamente infectados pelo *T. gondii*, a doença é tipicamente assintomática ou apresentam sinais clínicos moderados (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; MORGAN et al., 2000), entretanto há indivíduos infectados que apresentam sinais clínicos da toxoplasmose (MOURA et al., 2006). Aproximadamente, metade dos indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida, e infectados pelo *T. gondii*, apresentam principalmente encefalite toxoplásmica (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992).

Para o estabelecimento experimental da associação entre genótipo do parasito com a respectiva virulência aguda em camundongos (fenótipo), é realizada a inoculação intraperitoneal em camundongos de quantidade previamente conhecida de taquizoítos de *T. gondii*. Apesar da virulência das amostras pode ser influenciada por vários fatores, incluindo via de inoculação, estágio do parasito, espécie animal e genótipo do parasito (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995; DUBEY et al., 2004b), há relatos de heterogeneidade do comportamento biológico de diferentes isolados do agente sugerindo a existência de polimorfismos de DNA, influenciando na patogenicidade da infecção pelo *T. gondii* (CRISTINA et al., 1991; HOWE; SIBLEY, 1995).

Em camundongos, os isolados de *T.gondii* também diferem em sua virulência. Nesses animais a virulência é medida pela taxa de mortalidade, morbidade e o tempo até a morte de camundongos experimentalmente infectado com inóculos do parasito. Essas observações têm levado à classificação das amostras como altamente virulentas, não-virulentas ou de virulência intermediária (DUBEY; BEATTIE, 1988)

Estudos *in vitro* com amostras virulentas para camundongos revelaram variação na capacidade de penetração celular, na taxa de crescimento e na interconversão taquizoíto-bradizoíto, demonstrando a heterogeneidade no fenótipo de virulência entre amostras de *T. gondii* (APPLEFORD; SMITH, 1997; DARDÉ, 2004).

Além dos estudos de virulência, Sibley et al. (1995) consideram o *T.gondii* um importante modelo para estudos genéticos devido as seguintes características: (1) facilmente mantido em laboratório, (2) seu crescimento não é seletivo em relação à

linhagem celular, (3) há produção de mutantes que podem ser clonados e (4) apresenta disponibilidade de mapas genéticos, uma vez que dezenas de genes constitutivos, codificadores de antígenos de superfície e proteínas secretoras e genes ribossomais já foram clonados e caracterizados.

Nos primeiros estudos de genotipagem de *T. gondii* os autores observaram que mesmo diferindo em algumas propriedades biológicas, apresentar uma fase sexual no seu ciclo biológico com oportunidade de recombinação genética no hospedeiro definitivo (DARDÉ et al., 1992; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995) e apresentar distribuição mundial; as amostras conhecidas de *T. gondii* são similares antigenicamente, morfologicamente, na sua capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros e ainda apresentaram baixa variação genética quando diferentes amostras foram analisadas através do polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP) (CRISTINA et al., 1991; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992) ou marcadores isoenzimáticos (DARDÉ et al., 1992), revelando, nessas amostras, uma estrutura populacional clonal (HOWE; SIBLEY, 1995).

Ainda baseados nesses estudos com amostras da Europa e EUA, Sibley e Boothroyd (1995), comentaram que a transmissão horizontal do parasito através da cadeia alimentar pode ter contribuído para a difusão das linhagens clonais. A clonalidade dos isolados de *T. gondii*, é manifestada pelo isolamento repetitivo do mesmo genótipo em amostras não relacionadas e pela ausência dos vários genótipos recombinantes possíveis. Assim observaram que amostras do agente isoladas do homem e dos animais podiam ser agrupadas em três linhagens clonais, designadas como tipos I, II e III. (DARDÉ et al., 1992; HOWE; SIBLEY, 1995).

Modelos de evolução clonal na população são constituídos por organismos que geram progênie idêntica ou quase idêntica, de forma que os genótipos se propagam pelas gerações e são estáveis por longos períodos, sendo mínimas as modificações genotípicas (SOARES, 2004). A grande vantagem do baixo grau de variabilidade genética é que os marcadores desenvolvidos para uma determinada amostra podem ser úteis para todas as amostras (SIBLEY et al, 1995).

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T.gondii* através de métodos moleculares tem sido realizada com amostras de humanos e animal.

Segundo Dardé (2004), várias técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a diversidade genotípica entre amostras de *T. gondii* como a eletroforese isoenzimática, a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), PCR-RFLP e marcadores microssatélites (seqüências simples repetidas – SSR).

Os primeiros relatos da existência de linhagens bem definidas dentre os isolados de *T. gondii* foram demonstradas inicialmente pelos perfis eletroforéticos de isoenzimas (DARDÉ et al., 1992; DARDÉ et al., 1998).

A técnica de RAPD – PCR é baseada na amplificação de fragmentos de DNA por iniciadores únicos, curtos e de seqüência aleatória. O método detecta polimorfismos que podem ser utilizados para aplicação de mapeamento genético, diagnóstico e comparação genética inter e intra-específica (WILLIAMS et al., 1993). Os marcadores microssatélites, representam outra classe de marcadores genéticos que consistem de pequenas seqüências com dois a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (OLIVEIRA et al., 1997; AJZENBERG et al., 2002). Os microssatélites são altamente polimórficos devido à variabilidade no número de repetições e, conseqüentemente, à existência de múltiplos alelos que os tornam muito informativos para diferenciação e caracterização de espécies, estudos de diversidade genética ou estabelecimento de relações filogenéticas (RODRIGUES et al., 1997; AJZENBERG et al., 2002).

Apesar do uso de microssatélites ser mais específico do que outros métodos utilizados na genotipagem, a PCR-RFLP ainda é a técnica mais utilizada mundialmente para caracterização genotípica de *T. gondii*. A utilização de estudos baseados na RFLP, contribuíram positivamente na caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* do mundo todo (HOWE; SIBLEY, 1995).

Vários marcadores genéticos com baixo polimorfismo já foram caracterizados; entre eles há marcadores de antígenos de superfície (SAG1, SAG2, SAG3, SAG4, BSR4, SRS1), de antígenos constitutivos (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA6, ROP1), de função ainda desconhecida (TUB1, B10, FOL1) e microssatélites (TUB2, TgM-A) (DARDÉ, 2004).

A análise de RFLP vem sendo utilizada para o estudo de diferentes protozoários como o *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Naegleria* e *Acanthamoeba*, e helmintos como *Schistosoma*, *Acantamoeba* e *Taenia* (CRISTINA et al., 1991). O Polimorfismo por Tamanho de Restrição é um método que detecta variações mínimas em um gene, onde uma única substituição de bases pode criar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido por uma endonuclease (SINGH et al., 1997).

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, seis ou 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, originam bandas de diferentes pesos moleculares (CLARK³; RUSSEL, 1997 *apud* PENA, 2004)

Relativamente à pesquisa genética com *T. gondii*, com o desenvolvimento das técnicas de PCR, tornou-se possível amplificar *loci* genéticos 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).

Literák et al. (1998) caracterizaram pela RFLP utilizando a sonda *TGR1E*, 22 isolados de *T. gondii* de animais e observaram que apenas um isolado pertencia a uma linhagem virulenta a camundongos, posteriormente foi avaliada a possibilidade de uso de variantes gênicas TGR como marcadores na identificação de isolados de *T. gondii*, parecendo ser um alvo promissor para tipagem e estudos de distância genética entre isolados do agente (HOGDAL et al., 2000).

Sibley e Boothroyd (1992) utilizaram sondas de genes cópias – SAG1, que codifica a proteína P30, principal antígeno de superfície de taquizoítos de *T. gondii*, a 850, obtida de uma biblioteca de cDNA de clone 850, cuja função codificadora não é conhecida e uma sonda derivada de um fragmento repetitivo, BS, também com função codificadora desconhecida. Esses estudos sugeriram que isolados virulentos de *T. gondii* compreendiam uma única linhagem clonal, enquanto isolados não virulentos possuíam um genótipo heterogêneo.

Analisando 25 isolados de *T. gondii* por PCR-RFLP em três *locus* (v22, fragmento interno de 438 pb do gene P22, ou SAG2, que codifica para o segundo principal antígeno de superfície de taquizoítos, SAG1 e 850), foi também considerada a possibilidade de haver três linhagens clonais entre as amostras, denominadas grupo A (composto por amostras virulentas para camundongos), grupo B e grupo C (compostos por cepas não virulentas)) (PARMLEY et al., 1994).

Howe e Sibley (1995) analisaram 106 isolados de *T. gondii* de várias espécies procedentes de cinco continentes para determinar a estrutura populacional de *T. gondii* e avaliar a correlação entre o genótipo do parasito e a toxoplasmose humana e animal. Os resultados, obtidos por análise de RFLP em seis fragmentos de DNA (SAG1, SAG2, ROP1, 850, L328 e 62), mostraram que o *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional clonal, constituída de três linhagens predominantes, designadas Tipo I (virulenta), Tipo II e Tipo III (não virulentas).

Em 1997, Howe et al. determinaram os genótipos de 68 amostras humanas de pacientes com toxoplasmose pela análise de restrição de fragmentos do gene SAG2 amplificado por *nested* PCR, e o genótipo II foi encontrado em 80% das amostras.

Vários estudos de isolados de *T. gondii* de origem humana e animal realizados mundialmente, correlacionando a severidade da doença com a genotipagem no SAG2 através da PCR – RFLP (MONDRAGON et al., 1998; FUENTES et al., 2001; GRIGG; SUZUKI, 2003; ASPINALL et al., 2003), relatam que os isolados tipo I têm se apresentado extremamente virulentos em camundongos com alta parasitemia quando comparados aos tipo II ou III (DUBEY et al., 2002 DUBEY et al., 2006f) e com uma possível correlação entre tipo I e infecções congênitas em humanos (FUENTES et al., 2001).

Já isolados do tipo II foram os mais prevalentes em várias partes do mundo, seja em humanos ou em animais, havendo uma possível correlação com a reativação da doença em pacientes imunocomprometidos ou infecções congênita (HOWE et al., 1997; MONDRAGON et al., 1998; FUENTES et al., 2001, GRIGG, SUZUKI, 2003). Isolados tipo III parece ser menos comum em humanos, porém vêm sendo mais encontrado em animais (HOWE; SIBLEY, 1995; OWEN; TREES, 1999; DUBEY et al.; 2002; DUBEY et al. 2005a; DUBEY et al., 2006a). É importante ressaltar que a grande maioria de isolados de origem humana provém de casos de indivíduos com toxoplasmose clínica, enquanto as oriundas de animais provêm, na maior parte, de animais assintomáticos (SOARES, 2004).

Aspinall et al. (2003), através da PCR – RFLP no SAG2, observaram infecções únicas (tipo I ou tipo II) ou simultâneas (tipo I e tipo II) em amostras oriundas de humanos com infecção congênita ou de pacientes imunocomprometidos apresentando encefalite toxoplásmica. Não foi possível associar os genótipos encontrados com as manifestações clínicas apresentadas, demonstrando que a correspondência entre virulência e padrão genotípico não necessariamente deve ser observada em todos os hospedeiros (GRIGG; SUZUKI, 2003).

Contrariando as expectativas sobre o padrão genotípico de amostras de *T.gondii* de origem animal, Dubey et al. (2002) encontraram, em amostras de galinhas provenientes de criações domésticas do Estado de São Paulo, 64% (16/25) de positividade para o tipo I e o restante para o tipo III. A partir deste relato, iniciaram vários estudos de genotipagem de isolados de *T. gondii* em galinhas do mundo todo (Quadro 2). Esses animais foram escolhidos devido ao íntimo contato com o meio ambiente ao se alimentarem, podendo ser considerados sentinelas de contaminação ambiental (DUBEY et al., 2002).

Comparando os isolados obtidos de galinhas de diferentes países, pela PCR – RFLP no SAG 2, pode-se observar que os isolados obtidos da Colômbia, Costa Rica, México e Peru apresentaram perfil semelhante à maioria dos isolados obtidos no Brasil, não sendo observada a ocorrência do genótipo tipo II. A ocorrência dos três genótipos é relatada em isolados procedentes da Argentina, Congo, Grenada e Nicarágua. Nos demais países observou-se características semelhantes

às encontradas nas amostras dos E.U.A. e países europeus, não ocorrendo o tipo I (Quadro 2).

País	Nº de isolados genotipados	Genótipos				Referência
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo I + Tipo III	
Argentina	9	1	1	7	0	Dubey et al. (2003a)
Argentina	17	4	3	10	0	Dubey; Marcet; Lehmann. (2005c)
Áustria	67	0	67	0	0	Dubey et al. (2005a)
Brasil (AM)	24	14	0	10	0	Dubey et al. (2006)
Brasil (MG)	11	07	0	4	0	Ferreira et al. (2006)
Brasil (PA)**	11	6	1	4	0	Dubey et al. (2007)
Brasil (PR)	13	7	0	6	0	Dubey et al. (2003e)
Brasil (RJ)	48	34	0	13	1	Dubey et al. (2003d)
Brasil (RS)**	07	3	0	4	0	Dubey et al. (2007)
Brasil (SP)	25	16	0	9	0	Dubey et al. (2002)
Burkina Faso	1	0	1	0	0	Dubey et al. (2005)
Chile*	22	0	17	14	0	Dubey et al. (2006a)
Colômbia	24	07	0	17	0	Dubey et al. (2005b)
Costa Rica*	12	10	0	2	0	Dubey et al. (2006b)
Egito	20	0	3	17	0	Dubey et al. (2003b)
Estados Unidos	19	0	5	14	0	Dubey et al. (2003c)
Congo	10	1	1	8	0	Dubey et al. (2005)
Grenada	36	5	1	29	1	Dubey et al. (2005d)
Índia	7	0	2	5	0	Sreekumar et al. (2003)
Israel	19	0	16	3	0	Dubey et al. (2004)
Kenya	1	0	1	0	0	Dubey et al. (2005)
México	06	1	0	5	0	Dubey; Morales; Lehmann (2004a)
Nicarágua*	48	30	3	14	1	Dubey et al. (2006f)
Peru	10	7	0	3	0	Dubey et al. (2004b)
Portugal	12	0	8	4	0	Dubey et al. (2006e)
Sri Lanka	12	0	6	6	0	Dubey et al. (2005f)
Venezuela	13	0	3	10	0	Dubey et al. (2005e)

*SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6

** SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, C-29-2, L358, PK1 e new SAG2

Quadro 2 – Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas de diferentes países no período de 2002-2007 pela análise no locus SAG2

Estudo de caracterização genotípica do parasito também foi realizado na espécie suína. Em Portugal foram obtidos 15 isolados de porcos (*Sus scrofa*) mantidos no sistema de criação semi-intensivo. A caracterização genotípica no SAG2 resultou em isolados do tipo II (11) e do tipo III (4). Nenhum isolado tipo I foi observado dentre as amostras (SOUSA et al., 2006).

Em gatos provenientes da Colômbia, foram isolados 35,7% (15/42) do agente através do bioensaio em camundongos; destes foram obtidas amostras dos três tipos (I, II e III) quando analisadas no SAG2, sendo 10 isolados do tipo I, quatro do tipo III e apenas um do tipo II. Quando utilizando outros marcadores (SAG1, SAG3, BTUB E GRA6), foi observada a ocorrência de amostras recombinantes (DUBEY et al., 2006g).

Até o momento há poucos estudos de caracterização genotípica de amostras do agente dentre os ruminantes, como os ovinos e caprinos. Owen e Trees (1999) detectaram o *T. gondii* em tecidos (placenta) de 13 ovelhas que abortaram e de duas amostras proveniente de musculatura cardíaca de cordeiros com toxoplasmose no Reino Unido. Através da PCR- RFLP no SAG 2, a caracterização genotípica do agente resultou em todas as amostras do tipo II.

Na França, foram coletadas amostras de sangue e tecidos de ovinos em abatedouros. Anticorpos anti-*T.gondii* foram observados em 37,3% (97/260) e dentre os soropositivos foram realizados 30 bioensaios resultando em oito isolados do agente. Para a análise genotípica do parasito, foram utilizados cinco marcadores (TUB2, TgM-A, W35, B17, B18) e todos exibiram a ocorrência do genótipo II do *T. gondii* e todas avirulentas para camundongos (DUMÈTRE et al., 2006).

Aspinall et al. (2002) examinaram 71 produtos alimentícios a base de carne ovina, bovina ou suína, provenientes de mercados do Reino Unido; foram detectadas, (PCR- RFLP no SAG2), 27 amostras positivas; sendo que 21 apresentaram o genótipo I e seis tinham o tipo I e o II. Dentre as seis amostras de ovino foram observados tipo I em quatro e tipo I e II em duas delas.

No Brasil, há alguns trabalhos que relatam a genotipagem do *T. gondii* em animais e humanos. Vallochi et al. (2005), utilizando 92 amostras de um banco de olhos provenientes do Município de São Paulo de pacientes que apresentavam retinocoroidite e de duas amostras de Erechim, Rio Grande do Sul, realizaram

estudos moleculares através da PCR-RFLP no SAG2 e detectaram DNA para *T.gondii* em 11 amostras, todas compatíveis com o genótipo I.

Num surto de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí, Paraná, em 2002, 426 indivíduos foram acometidos, apresentando anticorpos anti-*T.gondii*. Sinais clínicos de toxoplasmose foram relatados em 155 indivíduos e lesões oculares em aproximadamente 10% (40/408) das pessoas que realizaram exames oftalmológicos. O agente foi isolado da água do reservatório de abastecimento do Município e pela análise genotípica no *locus* SAG2 foi caracterizado como tipo I (MOURA et al., 2006).

Recentemente, no Brasil houve o primeiro relato da ocorrência do genótipo II do agente em humanos num estudo de caracterização genotípica do parasito pela *nested* PCR-RFLP no *locus* SAG2 em indivíduos HIV-positivos que apresentavam toxoplasmose cerebral. Apesar de ser o primeiro relato do genótipo em humanos no Brasil, a maioria das amostras (91%) genotipadas eram do tipo I (FERREIRA et al., 2006).

Dubey et al. (2004g) estudaram a prevalência de *T. gondii* em gatos procedentes de um único Município (Santa Isabel do Ivaí, PR), através de isolamento do agente e posterior genotipagem pela PCR – RFLP no *locus* SAG 2. Dos 37 isolados obtidos, 15 eram do tipo I e 22 do tipo III. Nenhuma amostra mista ou tipo II foi observada.

Utilizando método molecular semelhante, foram analisados isolados de *T. gondii* de gatos do Estado de São Paulo. Dentre as 47 amostras de gatos provenientes de 15 municípios, foram observados 72,4% (34) do tipo I, 25,5% (12) do tipo III e uma infecção mista tipo I e tipo III (PENA et al., 2006).

Num estudo realizado em 111 cães com sintomatologia nervosa no Estado de São Paulo, 34 apresentaram-se soropositivos para o *T.gondii*, sendo obtidos nove isolados para o agente e a análise através da PCR-RFLP no SAG 2, mostrou que quatro eram do tipo I e cinco do tipo III (SILVA et al., 2005). Em Minas Gerais, num estudo de genotipagem de *T. gondii* obtidos de tecidos de oito cães cronicamente infectados, (*nested*-PCR no *locus* SAG 2), também encontrou-se os genótipos I (6) e III (2) (BRANDÃO et al., 2006)

Em 118 cães capturados no Município de São Paulo, foram detectados anticorpos anti-*T. gondii* em 35,8%. Dos 42 animais cronicamente infectados, foram realizados 36 bioensaios em camundongos e/ou gatos, resultando em 19 isolamentos do agente. Foi observada mais uma vez a ocorrência dos genótipos tipo I e III em 11 e oito amostras respectivamente através da análise genotípica dos isolados no *locus* SAG 2 (DUBEY et al, 2007a). As mesmas amostras analisadas utilizando outros marcadores (SAG1, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e novo SAG2), resultou a ocorrência de variabilidade genotípica dos isolados obtidos, indicando grande possibilidade destas amostras serem recombinantes.

Em sete isolados de suínos procedentes do Estado de São Paulo também foram observados o tipo I e tipo III, em dois e cinco isolados, respectivamente (SANTOS et al., 2005). Em 70 amostras de lingüiças suínas de 55 estabelecimentos comerciais do Município de Botucatu, São Paulo, Silva et al. (2005b) encontraram em 27,14% o agente através da PCR-RFLP, 14 amostras do tipo I (73,7%) e cinco do tipo III (26,3%).

Cavalcante et al. (2006), através do bioensaio em camundongos, obtiveram apenas dois isolados de *T. gondii* tecidos de caprinos procedentes do Ceará e a realização da caracterização genotípica das amostras foi pela PCR-RFLP multilocus (SAG2, SAG3, GRA6 e L363) e detectaram a ocorrência de perfil atípico ou recombinante tipo I/III. No Distrito Federal, foram coletadas 11 amostras de tecidos cerebrais de ovino, sendo detectada a ocorrência do genótipo I em uma única amostra (9,09%) pela *n*PCR-RFLP no *locus* SAG2 (UENO, 2005)

Foram analisadas 20 amostras de origem humana e animal procedentes dos Estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, quatro amostras foram oriundas de pacientes com toxoplasmose congênita e 16 de origem animal (uma de coelho, uma de camundongo, uma de caprino, três de galinhas e 10 de cães). De acordo com a genotipagem no *locus* SAG2, todas as amostras pertenciam ao genótipo I porém ao analisarem o polimorfismo em outros sete *loci* através da PCR-RFLP multilocus, pela técnica de PCR-RAPD e PCR-SSR observaram que as amostras brasileiras apresenta padrão recombinante (FERREIRA et al., 2004; FERREIRA et al., 2006).

Khan et al. (2006), analisando 25 amostras (17 humanas e oito animal) procedentes dos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, observaram através da análise genotípica pela *nested*-PCR multilocus (SAG2, SAG3, BTUB e GRA6), a ocorrência de amostras recombinantes ou atípicas.

Num outro estudo de genotipagem do *T. gondii* utilizando a PCR-RFLP multilocus com os marcadores SAG2, GRA6, SAG3 e BTUB, com 11 amostras de pacientes soropositivos para HIV que apresentavam lesões neurológicas também foi observada a ocorrência de padrões recombinantes (KHAN et al., 2005).

T. gondii foi anteriormente descrito com uma estrutura clonal com baixa variabilidade genética, porém essas informações foram provenientes de isolados obtidos na Europa e América do Norte. Recentes estudos, com isolados de outras regiões, em especial das Américas Central e do Sul, revelaram que o *T. gondii* apresenta um polimorfismo e utilizando novos marcadores para caracterização genotípica, foi observada grande variabilidade genotípica, fato que anteriormente não havia sido descrito (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004).

O uso de métodos de caracterização molecular de *T. gondii* através de marcadores com maior grau de polimorfismo vem indicando a existência de linhagens recombinantes (AJZENBERG et al.; 2002, LEHMANN et al., 2004; FERREIRA, 2006), mesmo assim, o reconhecimento das linhagens I, II e III já é uma condição consagrada pela comunidade científica em todo mundo e mantém em uso até o momento (DUBEY et al., 2002; DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004a; SREEKUMAKER, et al., 2003; DUBEY et al; 2005).

Outra hipótese para a ocorrência de amostras atípicas é o fato das amostras de *T. gondii* derivarem de um ancestral comum, que por sua vez deve ter emergido da recombinação meiótica entre duas linhagens primárias (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; GRIGG; SUZUKI, 2003), resultando nos três genótipos (I, II, III) observados em estudos de caracterização genotípica do agente (GRIGG; BOOTHROYD, 2001). Segundo Lehmann et al. (2006), no Brasil poderia estar ocorrendo o encontro das duas amostras arquetipos com maior frequência do que na Europa e América do Norte, resultando na maior ocorrência de amostras recombinantes ou atípicas, porém até o momento ainda não está esclarecido o nível da diversidade nos isolados de *T. gondii* obtidos no Brasil, resultando em

recombinações gênicas ou uma grande variedade de linhagens do agente (DUBEY, et al., 2007a).

A virulência observada entre as amostras de *T. gondii* obtidas no Brasil, tem se apresentado diferente da observada em isolados de outras localidades. Dubey et al. (2006) sumariza os estudos de caracterização genotípica e biológicas realizados em galinhas procedentes de várias localidades do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Amazônia) e observaram que dos 126 isolados obtidos nesses estudos, 83,3% causaram mortalidade nos camundongos infectados, sendo a grande maioria dos óbitos (96,3%) entre os dias 10 e 28 P.I., enquanto isolados obtidos em galinhas de outras localidades comportam-se, geralmente, de forma avirulenta (DUBEY et al., 2005a; DUBEY et al., 2005e; DUBEY et al., 2006b).

Em virtude do grande potencial zoonótico da toxoplasmose, pode ser de grande valor informativo a investigação de genótipos provenientes de infecções em animais e de genótipos de produtos de origem animal, seja para a verificação de correlação entre a variante encontrada e as propriedades biológicas, seja no rastreamento epidemiológico do agente para identificação de fontes de infecção ou vias de transmissão (OWEN; TREES⁴, 1999 *apud* SOARES, 2004).

É certo que métodos para caracterização genotípica do *T. gondii* com maior resolução que aqueles capazes de reconhecer as três linhagens arquétipos (I, II, III) são desejáveis, especialmente em situações onde seja necessário a rastreabilidade do agente ou uma capacidade mais refinada de associação entre o genótipo e a apresentação clínica da infecção (BLACKSTON et al., 2001; AJZENBERG et al., 2002; SOARES, 2004). Entretanto, segundo Ajzenberg et al. (2002), esses objetivos somente poderão ser alcançados na medida que marcadores moleculares com elevado poder de resolução sejam investigados bem como seja investido no conhecimento da estrutura populacional do agente no meio em que se encontra.

É certo que métodos para caracterização genotípica do *T. gondii* com maior resolução que aqueles capazes de reconhecer as três linhagens arquétipos (I, II, III) são desejáveis (BLACKSTON et al., 2001; AJZENBERG et al., 2002; SOARES, 2004), porém há a necessidade de padronização dos marcadores utilizados para possibilitar comparações de genotipagem e atributos biológicos (SU;

⁴OWEN, 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.

ZHANG; DUBEY, 2006) como vem sendo realizado através da PCR-RFLP no *locus* SAG 2 com amostras de animais e humanos no mundo todo.

2 OBJETIVOS

Devido à importância dos ovinos e caprinos, como potenciais hospedeiros intermediários do *T. gondii* e à falta de informações sobre as características biológicas e genóticas dos isolados de *T.gondii* no país, o estudo teve como **objetivos**:

- ❖ Isolamento e caracterização biológica de *T. gondii* de ovinos e caprinos naturalmente infectados do Estado de São Paulo, através de bioensaio em camundongos, e
- ❖ caracterização genotípica dos isolados obtidos, pela utilização da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) pelo método de Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP), usando o marcador no *locus* SAG2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

Para coletar material de ovinos foi realizado primeiramente um contato com a Associação Paulista dos Criadores de Ovinos (ASPACO) a qual forneceu os endereços dos frigoríficos responsáveis pelo abate desses animais no Estado. A partir desta lista, foram realizadas coletas em frigoríficos localizados nos Municípios de: Araçatuba, Boituva, Leme e São Manoel. Vale lembrar que apesar do frigorífico estar localizado em um determinado Município, animais de outros locais do Estado são abatidos

Para a espécie caprina a CAPRIPAULO (Associação dos Criadores de Caprinos do Estado de São Paulo) divulgou que não há frigoríficos que realizem abate desta espécie no Estado de São Paulo e que a maioria das propriedades possuem animais de aptidão leiteira ou para a obtenção de reprodutores. Deste modo foi feito o contato diretamente com os criadores. As propriedades que participaram do estudo localizam-se nos Municípios de: Botucatu, Marília e Ribeirão Preto. O abate desses animais não é realizado em grande escala, ocorrendo de acordo com a necessidade de consumo ou descarte, geralmente se concentrando no final do ano, e feito na própria propriedade. Após um ano do início das coletas nessas localidades, devido ao pequeno número de caprinos obtidos, os contatos foram ampliados e decidiu-se coletar material em outros Estados. Assim amostras de caprinos foram obtidos dos Estados do Rio Grande do Norte (Ouro Branco e Jardim de Seridó) e da Bahia (Jequié).

3.1.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

Todo 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).

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTADOS

Ovinos

No período de março de 2004 a julho de 2006, foram obtidos para o experimento 495 ovinos. Esses animais foram provenientes de frigoríficos e de criadores que autorizaram a coleta do material (sangue e amostras teciduais de cérebro, coração e diafragma).

Do total de 495 ovinos, 451 (91,1%) eram machos e 44 (8,9%) eram fêmeas; destes, 457 (92,3%) possuíam menos de um ano de idade e 38 (7,7%) eram adultos. As raças amostradas foram: Hampshire Down (12), Ile de France (73), Santa Inês (102) Suffolk (59) e animais mestiços (249). Segundo sistema de produção os ovinos pertenciam ao sistema intensivo (353), semi-intensivo (94) e extensivo (48). Os ovinos foram provenientes de 36 Municípios do Estado de São Paulo como ilustrado no tabela 1 e mapa 1.

Caprinos

No período de março de 2004 a setembro de 2006, foram obtidos 143 caprinos, sendo os animais provenientes do Estado de São Paulo de criadores e os caprinos da Bahia e Rio Grande do Norte de frigoríficos. Sangue e amostras teciduais de cérebro, coração, masseter e diafragma foram coletados quando dos abates realizados nas propriedades. Em algumas oportunidades amostras de sangue foram obtidas antes do abate e a coleta de tecidos foi realizada somente dos animais positivos.

Do total de 143 caprinos, 91 (63,6%) eram machos e 52 (36,4%) fêmeas, destes, 119 (83,2%) apresentavam idade inferior a um ano e 24 (16,8%) eram adultos. Dentre o aspecto racial; 44,8% (64/143) eram animais mestiços e 55,8% (79/143) puros das raças Pardo Alpina (55) e Saanen (24). Segundo sistema de produção os ovinos pertenciam ao sistema intensivo (62), semi-intensivo (52) e extensivo (29). Dos 143 animais, 114 (79,7%) foram provenientes do Estado de São Paulo, 10 (7%) da Bahia e 19 (13,3%) do Rio Grande do Norte (Tabela 2 e Mapa 2).

Tabela 1 – Número de ovinos no Estado de São Paulo, obtidos para detecção de anticorpos anti-*T.gondii* segundo Município de procedência, faixa etária e sexo. São Paulo - 2007

Município	Número de ovinos examinados						Total
	<1 ano			≥ 1 ano			
	Macho	Fêmea	Total	Macho	Fêmea	Total	
Araçariguama	38	0	38	0	0	0	38
Araçatuba	87	0	87	0	0	0	87
Areiópolis	07	0	07	0	0	0	07
Assis	08	0	08	0	0	0	08
Avaré	12	0	12	0	0	0	12
Bauru	12	0	12	0	0	0	12
Birigui	12	0	12	0	0	0	12
Botucatu	08	0	08	0	0	0	08
Cel Macedo	01	0	01	0	0	0	01
Dracena	20	02	22	0	0	0	22
Eng. Coelho	20	0	20	0	0	0	20
Fartura	08	0	08	0	0	0	08
Guararapes	03	0	03	0	0	0	03
Holambra	04	0	04	0	0	0	04
Itatinga	02	02	04	0	0	0	04
Itu	20	0	20	0	0	0	20
Laranjal	04	0	04	0	0	0	04
Paulista							
Lins	04	0	04	0	0	0	04
Marília	0	0	0	0	12	12	12
Mococa	15	0	15	0	0	0	15
Morungaba	04	0	04	0	0	0	04
Pardinho	03	01	04	0	0	0	04
Pereira Barreto	04	0	04	0	0	0	04
Pirassununga	09	0	09	0	0	0	09
Porangaba	04	0	04	0	0	0	04
Pratânia	03	05	08	4	22	26	34
Pres. Prudente	06	0	06	0	0	0	06
São Manoel	08	0	08	0	0	0	08
Serra Negra	28	0	28	0	0	0	28
Sumaré	02	0	02	0	0	0	02
Suzanópolis	04	0	04	0	0	0	04
Tatuí	04	0	04	0	0	0	04
Tietê	67	0	67	0	0	0	67
Tupi Paulista	04	0	04	0	0	0	04
Urupês	04	0	04	0	0	0	04
Valparaíso	08	0	08	0	0	0	08
Total	447	10	457	04	34	38	495

Mapa 1 – Localização dos Municípios, no Estado de São Paulo, origem das amostras dos soros ovinos. São Paulo - 2007

Tabela 2 – Número de caprinos obtidos para detecção de anticorpos anti-*T.gondii* segundo Município e Estado de procedência, faixa etária e sexo. São Paulo - 2007

Município	Número de caprinos examinados						Total
	<1 ano			≥ 1 ano			
	Macho	Fêmea	Total	Macho	Fêmea	Total	
Marília - SP	35	1	36	0	0	0	36
Botucatu - SP	27	27	54	0	16	16	70
Ribeirão Preto - SP	0	0	0	0	08	08	08
Jequié - BA	10	0	10	0	0	0	10
Ouro Branco - RN	07	0	07	0	0	0	07
Jd de Seridó - RN	12	0	12	0	0	0	12
Total	91	28	119	0	24	24	143

Mapa 2 – Localização dos Municípios e Estados de origem das amostras de soros caprinos. São Paulo - 2007

3.3 COLETA DE SANGUE E ÓRGÃOS

As amostras de sangue foram obtidas durante a sangria no momento do abate dos animais e quando possível antes da realização deste. Quando a coleta se deu previamente ao abate, o sangue foi obtido através da venopunção da jugular.

O abate dos animais nos frigoríficos foi realizado através de pistola automática para sensibilização e posterior sangria. Depois de abatidos os tecidos foram coletados na linha de abate e acondicionados individualmente em sacos plásticos, armazenados em isopor com gelo e levados diretamente ao laboratório. Quando os abates foram realizados nas propriedades, era realizada a sangria, coleta e armazenamento dos órgãos.

As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente até a chegada ao laboratório onde foram centrifugadas a 2000 g por 15 minutos para obtenção do soro.

3.4 EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*T. gondii*

Os soros dos ovinos e caprinos foram examinados para pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii* através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, REMINGTON 1980).

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 45 µm de porosidade.

Paralelamente foi preparada a solução para diluição do antígeno; composta de 2,5mL de solução salina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; 0,12 H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03m; albumina sérica bovina para uma solução uso a 0,4%), 35µL de mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Em seguida, foi acrescido 100µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina). Essa mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço. Os soros diluídos

foram 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 (WERRE, et al., 2002; KLUN et al., 2005). Inicialmente, para a triagem 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 Biologia, Epidemiologia e Sistemática de Parasitos, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviado por via aérea.

3.5 ISOLAMENTO DE *T. gondii* EM CAMUNDONGOS

3.5.1 Digestão péptica de tecidos

Os tecidos (cérebro, coração e diafragma) foram mantidos refrigerados até o resultado do MAT. Seguindo o protocolo preconizado por Dubey (1998b), os tecidos dos animais soropositivos foram primeiramente cortados em pequenos pedaços, sendo removidos a gordura e o tecido conectivo. De cada órgão foi utilizado, aproximadamente 16,6g até completar o total de 50g 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 banho-maria sob agitação a 37°C por uma hora.

Após incubação, a suspensão foi coada através de duas camadas de gaze, o coado transferido para cinco tubos cônicos de 50mL e centrifugado a 1200 g por 10 minutos.

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

Após homogeneização, o material foi transferido para um único tubo cônico, completando-se o volume para 50mL com salina e centrifugando a 1200g por 10 minutos.

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

Imediatamente a amostra foi inoculada nos grupos de camundongos.

3.5.2 Bioensaio em camundongos

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

Para as amostras de ovinos, cada grupo era constituído de cinco camundongos, individualmente identificados e alojados na mesma caixa. Cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0 - 1,2 mL da amostra digerida, e identificados individualmente com números e/ou marcados em locais diferentes do corpo com ácido pícrico e observados diariamente.

Devido ao baixo índice de isolamentos obtidos nos ovinos, os primeiros a serem ensaiados, e para aumentar a chance de isolamentos em caprinos, as

amostras foram divididas em dois grupos para a realização do bioensaio nessa última espécie. Um grupo composto de amostras teciduais de cérebro e coração e o outro de masseter e diafragma, compostos de 10 e cinco camundongos inoculados respectivamente.

Os animais que vinham a óbito foram examinados para a pesquisa de *T.gondii* nos tecidos, como descrito em 3.5.2.1 Camundongos que sobreviviam até seis semanas pós-inoculação (P.I.) foram examinados sorologicamente para pesquisa de anticorpos anti-*T.gondii*, através do MAT, na diluição 1:25 (DUBEY, 1997), como descrito no item 3.4. Para isso, a coleta de sangue foi feita pelo plexo retro-orbital, usando tubo capilar para microhematócrito, após a sedação dos camundongos com uma associação de quetamina 10% e xilazina 2% injetada pela via intraperitoneal.

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

3.5.2.1 Pesquisa de *T. gondii*

Todos os camundongos usados nos bioensaios foram examinados para a pesquisa de *T.gondii* nos tecidos, como descrito previamente por Dubey e Beattie (1988).

Impressões de fragmentos de pulmão e cérebro dos animais que vinham 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 do pulmão, o excesso de sangue na superfície de corte era removido e essa superfície era aplicada sobre uma lamínula. Fragmentos de cérebro de 3-5mm² 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.

3.5.3 Congelamento dos Isolados de *T. gondii* e Criopreservação

Para a análise genotípica dos isolados de *T. gondii*, amostras do pulmão ou do cérebro dos camundongos positivos foram macerados com salina usando gral e pistilo, e cerca de 0,5 mL foi colocado em microtubo e conservado em freezer - 70°C.

Objetivando a preservação dos isolados o restante do material foi criopreservado em DMSO 50% em meio RPMI-1640 e BSA 16% em RPMI-1640 (concentração final, DMSO 12,5% e BSA 4%) segundo Dubey e Beattie (1988).

3.6 ANÁLISE GENOTÍPICA

3.6.1 Extração e purificação do DNA

A extração e purificação do DNA dos isolados de *T. gondii* foi baseada no protocolo de extração descrito por Ausubel et al. (1999).

Alíquotas de 100µL foram separadas após descongelamento das amostras de camundongo e da amostra RH (SABIN, 1941). As amostras foram lavadas três vezes com tampão TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM), centrifugando-se a 12000g por 5 minutos.

Após as lavagens foi acrescentado o tampão de extração que foi calculado para um volume final de 500µL (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%; 10µL de proteinase K; água ultrapura autoclavada). As amostras foram homogeneizadas e incubadas durante a noite em banho seco, com agitação automática de 15 segundos a cada 15 minutos.

Após incubação foi adicionado fenol tamponado (v/v), o qual era então homogeneizado e centrifugado a 12000g por 5 minutos. Recuperava-se o máximo de sobrenadante (fase aquosa), evitando contaminação com fenol, aspirando a fase orgânica.

Adicionou-se fenol e clorofórmio (v/v) às amostras, as quais foram homogeneizadas e centrifugadas a 12000g por 5 minutos, recuperando-se o máximo de sobrenadante, tomando-se cuidado de não aspirar a interface orgânica.

Adiciona-se TE (v/v) e em seguida clorofórmio (v/v), homogeneiza-se e centrifuga-se por 5 minutos a 12000g. O máximo de sobrenadante foi recuperado, sendo o volume final de DNA obtido. Para insolubilização do DNA, acrescentou-se o acetato de sódio 3M (CH₃COONa), pH 8,0, cujo volume foi calculado em 1/10 do volume da amostra. Em seguida foi acrescentado duas vezes esse volume de etanol absoluto. Após homogeneização as amostras foram deixadas em freezer a -20°C durante a noite.

As amostras foram centrifugadas a 12000g por 25 minutos a 4°C. Despreza-se o sobrenadante e adiciona-se 1000µL de etanol a 70%. Centrifuga-se novamente e o sobrenadante descartado e os microtubos ficam em posição invertida, até secarem completamente, em temperatura ambiente.

As amostras foram homogeneizadas em TE (1/10 do volume final de DNA obtido) e incubadas em banho seco (pré-aquecido) a 56°C, por 10 minutos. As amostras foram então armazenadas em freezer a -20°C para posterior amplificação.

3.6.2 PCR-RFLP

A determinação dos genótipos de *T. gondii* presentes nas amostras analisadas foi feita como descrito por Howe et al. (1997) utilizando como marcador a PCR-RFLP de segmentos do *locus* SAG2 que contém o gene codificador do antígeno de superfície p22.

Resumidamente, dois fragmentos obtidos após amplificação em *nested* de dois fragmentos do *locus* gênico que contém o gene mencionado foram,

amplificados em PCR ou *nested* PCR, e submetidos à clivagem enzimática com as endonucleases *MboI* e *Hin6I*.

Os produtos dos dois ensaios em PCR ou *nPCR* produzem fragmentos de 241 e 221 pares de bases para qualquer isolado do agente. O primeiro fragmento é oriundo da fração correspondente à região 5' e o segundo é correspondente à região 3' do *locus* SAG2.

O maior fragmento é submetido à clivagem com enzima *MboI* e o menor à endonuclease *Hin6I*. 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. Por outro lado, a enzima *Hin6I* somente cliva fragmentos oriundos de alelos característicos do tipo II. A determinação de genótipos proposta pode ser visualizada na figura 1 e quadro 3.

Figura 1 Representação esquemática do sistema proposto por Howe et al. (1997) para genotipagem de *T. gondii*, baseado na PCR-RFLP de fragmentos do *locus* SAG2. Neste procedimento, dois produtos de *nested*-PCR são produzidos e submetidos à restrição enzimática

Genótipo	Enzimas de Restrição	
	<i>MboI</i>	<i>Hin 6I</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 3'	Fragmento 3' NÃO clivado

Quadro 3: Comportamento dos produtos de *nested*-PCR oriundos dos genótipos I, II e III frente à restrição enzimática com as enzimas *MboI* e *Hin 6I*

3.6.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

O quadro 4 relaciona os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usados na PCR e *n*PCR.

PCR	Nome do <i>primer</i> SAG2	Seqüência de bases
5 'PCR primária	SAG2F4	5' GCTACCTCGAACAGGAACAC3' 5'
	SAG2 R4 (<i>primers</i> externos 1 e 2)	GCA TCAACAGTCTTCGTTGC 3'
3 'PCR primária	SAG2 F3	5'TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC3' 5'
	SAG2 R3 (<i>primers</i> externos 1 e 2)	TCAAAGCGTGCATTATCGC 3'
5' <i>nested</i> -PCR	SAG2 F	5' GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 3" 5'
	SAG2 R2 (<i>primers</i> internos 1 e 2)	GCAAGAGCGAACTTGAACAC3'
3' <i>nested</i> -PCR	SAG2 F2	5' ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3' 5'
	SAG2 R (<i>primers</i> internos 1 e 2)	AACGTTTCACGAAGGCACAC 3'

*Fonte: Howe et al. (1997)

Quadro 4 – Nomes e seqüências dos *primers* usados na PCR e *nested*-PCR para amplificação de fragmentos do gene SAG2 de *Toxoplasma gondii*

3.6.2.2 PCR

Para o controle positivo do genótipo I, foi utilizada a amostra RH (SABIN, 1941), mantida em camundongos no VPS, para o genótipo tipo II, foi utilizado um isolado de *T. gondii* de veado e para o genótipo III era de um isolado de gambá gentilmente cedido pelo Prof. Dr. J. P. Dubey (USDA, Beltsville, Maryland).

Para as amostras de camundongos e para o controle positivo do genótipo tipo I não foi necessária a realização da *n*PCR, pois se obteve uma boa detecção apenas com uma amplificação. Assim, para essas amostras 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 (homogeneizado de tecidos dos ovinos) e para os controles positivos dos genótipos II e III foi feita a PCR seguida da *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.

Para aumentar o número de amostras de *T.gondii* genotipadas foi realizada a *n*PCR em amostras primárias de ovinos que apresentaram títulos acima de 200 nas quais o agente não foi isolado no bioensaio em camundongos, resultando em 21 amostras de ovino. Cada amostra foi realizada em duplicata.

Para a realização da PCR para uma reação em 50µL foi utilizada a seguinte mistura:

- 25,2µL de água ultrapura autoclavada
- 5,0µL de tampão de reação (KCl 50mM: Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- 8,0µL da mistura de dNTPs (200µM de cada nucleotídeo: dATP. dTTP. dCTP. dGTP)
- 2,5µL do *primer* interno ou externo 1 (10pmol/µL)
- 2,5µL do *primer* interno ou externo 2 (10pmol/µL)
- 1,5µL de MgCl₂ (50mM)
- 0,3µL de Taq DNA polimerase
- 5,0µL da amostra de DNA amplificado da PCR - 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 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.

3.6.2.3 *Nested* PCR

Para a realização da *n*PCR para uma reação de 50µL, foi realizada a seguinte mistura:

- 29,2µL de água ultrapura autoclavada
- 5,0µL de tampão de reação (KCl 50mM: Tris-HCl 10mM. pH 9.0)
- 8,0µL da mistura de dNTPs (200µM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP. dCTP. dGTP)
- 2,5µL do *primer* interno 1 (10pmol/L)
- 2,5µL do *primer* interno 2 (10pmol/L)
- 1,5µL de MgCl₂ (50mM)
- 0,3µL de Taq DNA polimerase
- 1,0µL da amostra de DNA amplificado da PCR

3.6.2.4 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

3.6.2.5 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; em seguida submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20µL 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.

3.6.2.6 RFLP

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

- 1µL de enzima de restrição
- 9µL de água ultrapura autoclavada
- 10µL de DNA da amostra

Esse protocolo foi utilizado para os isolados obtidos em camundongos e para as amostra do tipo I, tipo II e tipo III; as quais eram os controles positivos.

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.

A foto-documentação do gel e análise de imagem foi realizada no analisador de imagem Alpha ImagerTM- Imaging System (Alpha Innotech).

4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Possíveis associações entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* nos ovinos e caprinos, em relação a faixa etária, sexo, sistema de produção e aspecto racial dos animais foram verificadas através do teste qui-quadrado.

Para verificar as possíveis associações entre a presença de anticorpos anti-*T. gondii* dos ovinos e caprinos e o isolamento do agente nos bioensaios em camundongos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para a comparação da sobrevida dos camundongos entre os tipos de isolado (I/III) obtido, foi utilizado o teste de Kaplan-Meier.

As diferenças entre os diferentes grupos foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

Foi utilizado o programa estatístico SPSS, versão 9.0. (SPSS, INC.) para todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 OVINOS

5.1.1 Sorologia

Dos 495 ovinos examinados, 120 (24,2%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Entre os animais adultos 63,2 % (24/38) foram positivos e dentre os animais com menos de um ano de idade, 21,0% (96/457) apresentaram soropositividade. Dentre os machos, 21,1% (95/451) foram soropositivos e dentre as fêmeas, 50,0% (22/44). Houve associação da soropositividade com a idade e o sexo, com maior ocorrência nos adultos e nas fêmeas ($p < 0,001$). O gráfico 1 apresenta os valores de ocorrência nos ovinos por faixa etária e sexo.

Gráfico 1 - Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* (MAT $\geq$ 25), em ovinos, segundo idade e sexo - São Paulo - 2007

A distribuição de animais soropositivos segundo a raça encontra-se na tabela 3. Do total de 246 animais com raça definida e 249 mestiços, 54 (22,0%) e 66 (26,5%), respectivamente, apresentaram animais soropositivos para o agente. Dentre os animais com raça definida, a soropositividade observada dentre as raças foi de 16,7% (2/12) para os Hampshire Down, 5,5% (4/73) para os Ile de France, 19,6% para os Santa Inês (20/102) e 47,5% para os Suffolk (28/59). Não houve associação da soropositividade com a raça ($p=0,24$).

Tabela 3 – Frequência de ovinos soropositivos para *Toxoplasma gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo a raça. São Paulo - 2007

Raça	Número de ovinos		
	Examinados	Positivos	%
Hampshire Down	12	2	16,7
Ile de France	73	4	5,5
Santa Inês	102	20	19,6
Suffolk	59	28	47,6
Mestiço	249	66	26,5
Total	495	120	24,2

Com relação ao sistema de produção dos ovinos, a maior soropositividade foi observada dentre os animais procedentes de criações semi-intensiva, com 47,9% de animais soropositivos. Houve associação da soropositividade com os sistemas de produção dos ovinos ($p<0,001$). A distribuição dos animais soropositivos segundo o sistema de criação encontra-se na tabela 4 e gráfico 2.

Tabela 4 – Frequência de ovinos soropositivos para *Toxoplasma gondii* (MAT≥25), segundo a sistema de produção. São Paulo - 2007

Sistema de Produção	Soropositivo	Total	%
Intensivo	58	353	16,4
Semi-intensivo	45	94	47,9
Extensivo	17	48	35,4
Total	120	495	24,2

p<0,001

Gráfico 2 - Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* (MAT≥ 25), em ovinos, segundo sistema de produção - São Paulo - 2007

Os títulos de anticorpos variaram de 25 a 3200, sendo 71,7 (86/120) com títulos de 25 a 200 e 28,3% (34/120) com títulos de 400 a 3200. Os resultados referentes à distribuição de títulos de anticorpos encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Frequência de ovinos soropositivos para *Toxoplasma gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo o título de anticorpos. São Paulo - 2007

Título	Número de Ovinos Soropositivos	%
25	35	29,2
50	21	17,5
100	22	18,3
200	08	6,7
400	06	5,0
800	05	4,2
1600	10	8,3
3200	13	10,8
Total	120	100

Do total de 36 Municípios nos quais ovinos foram amostrados, 27 (75,0%) apresentaram pelo menos um ovino soropositivo para o agente. A distribuição dos ovinos soropositivos, segundo a localidade de procedência encontra-se na tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição do número de ovinos examinados e soropositivos para anticorpos anti-*T.gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo idade e o Município de procedência no Estado de São Paulo. São Paulo - 2007

Município	Número de ovinos				
	Examinados	Soropositivos			
		<1 ano	$\geq$ 1 ano	Total	%
Araçariguama	38	15	0	15	41,7
Araçatuba	87	10	0	10	11,5
Areiópolis	07	01	0	01	14,3
Assis	08	03	0	03	37,5
Avaré	12	02	0	02	16,7
Bauru	12	03	0	03	25,0
Birigui	12	02	0	02	16,7
Botucatu	08	03	0	03	37,5
Cel Macedo	01	01	0	01	100
Dracena	22	03	0	03	13,6
Eng. Coelho	20	13	0	13	65,0
Fartura	08	02	0	02	25,0
Guararapes	03	0	0	0	0
Holambra	04	0	0	0	0
Itatinga	04	02	0	02	50,0
Itu	20	0	0	0	0
Laranjal Paulista	04	02	0	02	50,0
Lins	04	01	0	01	25,0
Marília	12	0	11	11	91,7
Mococa	15	03	0	03	20,0
Morungaba	04	0	0	0	0
Pardinho	04	01	0	01	25,0
Pirassununga	09	03	0	03	33,3
P. Barreto	04	01	0	01	25,0
Porangaba	04	0	0	0	0
Pratânia	34	0	13	13	38,2
Pres.Prudente	06	02	0	02	33,3
São Manoel	08	01	0	01	12,5
Serra Negra	28	07	0	07	25,0
Sumaré	02	0	0	0	0
Suzanópolis	04	0	0	0	0
Tatuí	04	0	0	0	0
Tietê	67	12	0	12	17,9
Tupi Paulista	04	01	0	01	25,0
Urupês	04	0	0	0	0
Valparaíso	08	2	0	02	25,0
Total	495	96	24	120	24,2

5.1.2 Bioensaio em camundongos e isolamento de *T.gondii*

A partir dos animais soropositivos ($\text{MAT} \geq 25$), foram realizados 82 bioensaios em camundongos. Destes, foram obtidos 16 (19,5%) isolados de *T.gondii*, sendo 14 provenientes de animais jovens (<1 ano) e apenas dois de adultos. Não houve associação entre o isolamento do agente e a faixa etária dos ovinos ($p=0,90$).

Com relação ao sexo, 18,8% (03/16) e 81,3% (13/16) dos isolados obtidos foram provenientes de fêmeas e de machos, respectivamente. Não houve associação entre o isolamento e o sexo ($p=0,63$). Dentre as raças, a frequência do isolamento do agente foi observada em 62,5% (10/16) e 37,5% (6/16) dos animais mestiços e com raça definida, respectivamente. Dos seis isolados obtidos dos ovinos com raça definida, um foi procedente de ovino Ile de France, dois de Suffolk e três de Santa Inês. Não houve associação do isolamento do agente e a raça do ovino ($p=0,15$).

Dentre os sistemas de produção foi observado o isolamento de *T. gondii* em 50,0% (8/16), 43,8% (7/16) e 6,3% (1/16) de ovinos procedentes dos sistemas intensivo, semi-extensivo e extensivo. Não houve associação entre isolamento de *T. gondii* e o sistema de produção ($p=0,67$).

Os títulos de anticorpos dos ovinos dos quais foi possível o isolamento do agente variaram de 25 a 3200, sendo 75,0% (12/16) dos isolados obtidos de ovinos com títulos altos (1600 e 3200), conforme apresentado na tabela 7 e gráfico 3.

Houve associação entre os títulos de anticorpos anti-*T.gondii* obtidos e o isolamento do agente no bioensaio em camundongos ($p<0,001$), com maior número de isolados do agente em animais que apresentaram títulos de anticorpos de 1600 e de 3200.

Tabela 7 – Distribuição de bioensaios realizados e isolados obtidos, segundo o título de anticorpos anti-*T. gondii* (MAT $\geq$ 25) em ovinos. São Paulo - 2007

Ovinos			
Título	Nº de Bioensaios	Nº de Isolados	%
25	11	0	0
50	19	01	5,3
100	19	03	15,8
200	05	0	0
400	05	0	0
800	02	0	0
1600	08	03	37,5
3200	13	09	69,2
Total	82	16	19,5

Gráfico 3 - Distribuição dos anticorpos anti-*T.gondii* dos ovinos em relação ao bioensaio em camundongos. São Paulo - 2007

A tabela 8 apresenta o número de bioensaios realizados e de isolados de *T. gondii* obtidos de ovinos por Município de procedência no Estado de São Paulo.

Foram obtidos isolados de *T. gondii* em nove dos 21 Municípios que tiveram ovinos examinados.

Tabela 8 – Distribuição do número de bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de ovinos por Município de procedência no Estado de São Paulo. São Paulo - 2007

Município	Nº de bioensaios	Nº de isolados	%
Araçariguama	11	2	18,2
Araçatuba	10	1	10,0
Assis	1	0	0,0
Avaré	2	0	0,0
Bauru	2	0	0,0
Birigui	2	0	0,0
Botucatu	3	2	66,7
Cel Macedo	1	1	100,0
Dracena	3	1	33,3
Eng. Coelho	6	3	50,0
Fartura	2	0	0,0
Itatinga	2	0	0,0
Marília	11	2	18,2
Mococa	3	0	0,0
Pardinho	1	0	0,0
Pirassununga	3	0	0,0
P. Barreto	1	0	0,0
Pres.Prudente	2	2	100,0
Serra Negra	4	0	0,0
Tiete	10	2	20,0
Valparaíso	2	0	0,0
Total	82	16	19,5

Para a realização dos 82 bioensaios em camundongos para o isolamento do *T. gondii* dos tecidos de ovinos, foram utilizados 410 camundongos. Destes 12,0% (49/410) se infectaram e em 42,9% (21/49) dos infectados o agente foi fatal para os camundongos. Os óbitos dos camundongos por toxoplasmose ocorreram dos dias 18 a 32 pós infecção (P.I.), com média de 23,6 dias.

A porcentagem de óbitos por toxoplasmose entre os camundongos infectados em três grupos foi de 20 a 80%, em seis grupos de 100% e em sete grupos não ocorreram óbitos (Gráfico 4).

Todos os camundongos sorologicamente negativos não estavam infectados com *T. gondii*, não sendo encontrados cistos do parasito nos fragmentos cerebrais examinados microscopicamente. Nos camundongos que apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* e que sobreviveram até o término do período de observação (60 dias), cistos cerebrais foram encontrados quando examinados microscopicamente.

Gráfico 4 – Número de isolados obtidos através do bioensaio em camundongos com tecidos de ovinos do Estado de São Paulo, por porcentagem de óbitos dos camundongos. São Paulo - 2007

5.1.3 Análise Genotípica

5.1.3.1 PCR – RFLP

Pela análise de restrição dos segmentos do *locus* SAG2, foram identificados os genótipos tipo I e tipo III em ovinos e em nenhum animal, isolados do tipo II ou infecções mistas foram encontrados.

Na figura 2 podem ser visualizados os padrões observados na PCR-RFLP para a diferenciação dos genótipos de isolados de origem ovina obtidos em camundongos.

A

B

Figura 2 – PCR – RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem e isolados de *Toxoplasma gondii* de ovinos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados de fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras do tipo I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com endonuclease *Hin6I*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos ovinos, seguidos dos números dos camundongos correspondentes aos isolados analisados. Ov=Ovino, Linha I= controle tipo I (amostra RH), Linha II = controle tipo II (isolado de veado), Linha III = controle tipo III (amostra de gambá). M= marcador (peso molecular de 100pb, Fermentas)

5.1.3.2 PCR – RFLP - Amostras Primárias

A *n*PCR foi realizada com 21 amostras de ovinos (amostras primárias, homogeneizados de tecidos), correspondendo aos bioensaios nos quais não foi conseguido o isolamento em camundongos apesar de apresentarem título de anticorpos acima de 200. Em nenhuma dessas amostras primárias ocorreu a amplificação.

5.1.4 – Genótipos de *T.gondii*

Do total de 16 isolados de *T. gondii* de ovinos, 14 (87,5%) eram tipo I e dois tipo III (12,5%). Os ovinos dos Municípios de Araçatuba (nº 245) e de Tietê (nº 479) foram os únicos a apresentar isolados do tipo III, nos outros sete Municípios (Araçariguama, Botucatu, Coronel Macedo, Dracena, Engenheiro Coelho, Marília e Presidente Prudente) só foram encontrados isolados do tipo I e apenas um Município, Tietê, apresentou isolado do tipo I (nº 485) e III (nº 479).

A localização dos Municípios de origem dos isolados de ovinos e a distribuição dos genótipos encontram-se no mapa 3.

Na genotipagem dos isolados de *T. gondii*, foram observados em ovinos jovens amostras tipo I e tipo III em 85,7% (12/14) e 100%, respectivamente. Apenas dois (14,3%) isolados tipo I foram provenientes de ovinos adultos. Não houve associação entre a faixa etária dos ovinos e o isolamento do agente ($p=0,76$).

Com relação ao sexo, 78,6% (11/14) e 21,4% (3/14) do genótipo I foram provenientes de machos e fêmeas respectivamente. Os dois genótipos tipo III observados foram provenientes de machos ($p=0,65$). Dentre as raças, genótipo tipo III ocorreu na mesma proporção (50,0%) dentre os animais mestiços ou com raça definida. Já o genótipo I foi observado em 64,3% (9/14) e 35,7% (5/14) dos isolados de *T. gondii* de ovinos mestiços e com raça definida, respectivamente. Não houve associação entre genotipagem e a raça do ovino ($p=0,63$).

Dos 14 genótipos tipo I, oito (57,1%), cinco (35,7%) e apenas um (7,2%) foram provenientes dos sistemas de produção semi-extensivo, intensivo e extensivo, respectivamente. Ambos genótipos tipo III foram provenientes do sistema intensivo. Não houve associação entre genotipagem de *T. gondii* e o sistema de produção ($p=0,23$).

Os títulos de anticorpos dos ovinos dos quais foi possível o isolamento do agente variaram de 25 a 3200, sendo 75,0% (12/16) dos isolados obtidos de ovinos com títulos altos entre 1600 e 3200, conforme apresentado na tabela 7 e gráfico 3.

Houve associação entre o título de anticorpos anti-*T.gondii* e o isolamento do agente no bioensaio em camundongos ($p<0,001$), com maior número de isolados do agente em animais que apresentaram títulos de anticorpos de 1600 e de 3200.

Mapa 3 – Localização dos Municípios no Estado de São Paulo, nos quais isolados de *T. gondii* foram obtidos e genótipos encontrados pela PCR-RFLP no locus SAG2. São Paulo - 2007

Com relação ao título de anticorpos dos ovinos nos quais foi possível o isolamento do agente; o genótipo tipo I, foi isolado de ovinos com títulos de 50 (2), 100 (3), 1600 (2) e 3200 (8) e do genótipo tipo III de animais com títulos de 1600 (1) e 3200 (1). Não houve diferença estatística entre os títulos de anticorpos e os genótipos dos isolados de *T. gondii* obtidos de ovinos ($p=0,75$)

Dentre os camundongos infectados dos 17 grupos dos bioensaios, 88,7% (47/53) apresentavam genótipo tipo I e 11,8% (6/53) genótipo tipo III. A distribuição dos genótipos de *T. gondii* segundo a porcentagem de óbitos nos grupos de camundongos pode ser vista no gráfico 5.

Gráfico 5 – Distribuição dos fenótipos de *Toxoplasma gondii* isolados de ovinos naturalmente infectados no Estado de São Paulo, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose nos grupos de camundongos. São Paulo - 2007

Dos sete grupos de camundongos que não apresentavam mortalidade, cinco estavam infectados com o genótipo I e dois com o genótipo III, resultando em 18 camundongos sobreviventes do tipo I e três sobreviventes do tipo III; nenhum apresentava sinais clínicos da toxoplasmose.

Em relação à sobrevida, 64,3% (9/14) dos camundongos com o genótipo tipo I tiveram óbitos entre o 20º e 30º dia P.I.. Dentre os isolados com genótipo tipo III, os camundongos infectados não apresentaram óbitos.

Em relação à sobrevida, 80,1% (17/21) dos camundongos com o genótipo tipo I tiveram óbitos entre o 20º e 30º dia P.I.

No gráfico 6 estão representadas as proporções de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo tipo I e tipo III.

Gráfico 6 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com os genótipos I e III de *Toxoplasma gondii* do dia 0 até o término do experimento (60 dias). São Paulo - 2007

Não houve diferença na proporção de grupos com óbitos de camundongos no genótipo tipo I em relação ao genótipo tipo III ($p=0,45$).

A tabela 9 apresenta os resultados dos bioensaios em camundongos dos tecidos dos ovinos por Municípios de origem.

Tabela 9 – Isolamento de *Toxoplasma gondii* de ovinos através do bioensaio em camundongos, segundo Município de procedência no Estado de São Paulo e título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* dos ovinos. São Paulo - 2007

Título de anticorpos	Nº do ovino	Bioensaio em camundongos					
		Nº de óbito/ Nº infectado	% de óbitos	Sobrevida (dias P.I.)	Média (dias)	Procedência	Genótipo
50	472	1/1	100	20	20,0	P. Prudente	I
100	476	2/2	100	20; 28	24,0	P.Prudente	I
	07	2/2	100	23; 26	24,5	Araçariguama	I
	16	1/3	33,3	21	21,0	Araçariguama	I
1600	245	0/4	0	sobreviveram	0,0	Araçatuba	I
	191	0/1	0	sobreviveram	0,0	Marília	III
	196	0/2	0	sobreviveram	0,0	Marília	I
3200	81	3/3	100	19; 19; 25	21,0	Botucatu	I
	83	4/5	20	18; 20; 21; 30	22,3	Botucatu	I
	01	3/3	100	15; 19; 20	18,0	Cel. Macedo	I
	497	4/4	100	31; 31; 32; 34	32,0	Dracena	I
	108	0/5	0	sobreviveram	0,0	Eng. Coelho	I
	112	1/5	25	23	23,0	Eng. Coelho	I
	115	0/5	0	sobreviveram	0,0	Eng. Coelho	I
	479	0/2	0	sobreviveram	0,0	Tietê	III
	485	0/2	0	sobreviveram	0,0	Tietê	I

P.I.= pós inoculação

5.2 CAPRINOS

5.2.1-Sorologia

Do total de 143 caprinos examinados, 46 (32,2%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Dentre os animais adultos 66,7 % (16/24) foram positivos e dentre os com menos de um ano de idade, 25,2% (30/119). Houve associação da positividade na sorologia com a idade, com os adultos apresentando maior ocorrência ($p < 0,001$).

Em relação ao sexo, do total de 52 fêmeas e 91 machos, 18 (34,6%) e 28 (30,8%) dos animais, respectivamente, apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Não houve associação da positividade na sorologia com o sexo ($p = 0,64$).

A distribuição dos animais segundo idade e sexo e a presença de anticorpos anti-*T. gondii* encontra-se no gráfico 7.

Gráfico 7 - Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* (MAT $\geq$ 25), em caprinos, segundo idade e sexo - São Paulo - 2007

Do total dos 64 animais mestiços e 78 de raça definida, 10 (15,6%) e 36 (46,2%), respectivamente, apresentaram-se soropositivos para o agente. Dentre os animais com raça definida, a soropositividade foi de 54,5% (30/55) para a Pardo Alpina e 25,0% (6/24) para a Saanen. Houve associação da positividade na sorologia com a raça dos animais com caprinos de raça definida apresentando maior ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* ($p < 0,001$).

A distribuição dos animais segundo a raça e a presença de anticorpos anti-*T.gondii* encontra-se na tabela 10.

Tabela 10 – Frequência de caprinos soropositivos para *T. gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo a raça. São Paulo - 2007

Raça	Número de caprinos		
	Examinados	Positivos	%
Pardo Alpino	55	30	54,5
Saanen	24	6	22,2
Mestiço	64	10	15,6
Total	143	46	32,2

Com relação ao sistema de produção dos caprinos, a maior soropositividade foi observada dentre os animais procedentes de criações intensiva, com 48,4% de animais soropositivos, havendo associação entre os sistemas de criação dos ovinos ($p < 0,001$). A distribuição dos animais soropositivos segundo o sistema de criação encontra-se na tabela 11 e gráfico 8.

Tabela 11 – Frequência de caprinos soropositivos para *T. gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo a sistema de produção. São Paulo - 2007

Sistema de Produção	Soropositivo	Total	%
Intensivo	30	62	48,4
Semi-intensivo	11	52	21,2
Extensivo	5	29	17,2
Total	46	143	31,5

Gráfico 8 - Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* (MAT $\geq$ 25), em caprinos, segundo sistema de produção - São Paulo - 2007

Os títulos de anticorpos variaram de 25 a 3200, com títulos de 25 a 200 em 91,3% (42/46) e de 800 a 3200 em 8,7% (04/46) dos caprinos. A distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* apresenta-se na tabela 12.

Tabela 12 – Frequência de caprinos soropositivos para *T. gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo título de anticorpos. São Paulo - 2007

Título	Número de Caprinos Soropositivos	%
25	18	39,1
50	14	30,4
100	07	15,2
200	03	6,5
1600	02	4,4
3200	02	4,4
Total	46	100

Dos seis Municípios amostrados, quatro (66,7%) apresentaram animais soropositivos para o *T. gondii*. A distribuição dos caprinos soropositivos segundo a localidade de procedência encontra-se na tabela 13.

Tabela 13 – Frequência de caprinos soropositivos para *T. gondii* (MAT $\geq$ 25), segundo Município e Estado de procedência e idade. São Paulo - 2007

Município/ Estado	Nº de caprinos examinados	Caprinos soropositivos			
		<1 ano	$\geq$ 1 ano	Total	%
Marília - SP	36	14	0	14	38,6
Botucatu - SP	70	11	16	27	38,9
Ribeirão Preto - SP	08	0	0	0	0
Jequié – BA	10	0	0	0	0
Ouro Branco - RN	07	03	0	03	42,8
Jd. de Seridó - RN	12	02	0	02	16,7
Total	143	30	16	46	31,5

5.2.2 Bioensaio em camundongos e isolamento de *T.gondii*

A partir dos caprinos soropositivos foram realizados 26 bioensaios em camundongos. Destes foram obtidos 12 isolados, sendo nove dos isolamentos provenientes de animais adultos e apenas dois de caprinos com menos de um ano de idade. Houve associação entre a idade e o isolamento do agente ($p=0,02$) com maior número de isolados entre os adultos.

Com relação ao sexo, dos 12 isolados de *T. gondii* obtidos, dois foram provenientes de machos (16,7%) e 10 de fêmeas (66,7%). Houve associação do isolamento do agente e o sexo ($p=0,02$), com maior número de isolados provenientes de fêmeas.

Dentre as raças, a frequência do isolamento do agente foi observada em 25% (3/12) e 75% (9/12) dos animais mestiços e com raça definida, respectivamente. Os nove isolados obtidos dos animais com raça, foram provenientes da raça Pardo Alpina. Não houve associação entre animais mestiços e com raça em relação ao isolamento do agente ($p=0,84$).

Dentre os sistemas de produção foi observado 75,0% (9/12) e 8,3 (1/12) de caprinos de sistema intensivo e extensivo, respectivamente. Dois isolados pertenciam a rebanhos que não foi possível obter a informação do sistema de produção. Não houve associação entre isolamento de *T. gondii* e o sistema de produção ($p=0,95$).

O título de anticorpos dos caprinos dos quais foi possível o isolamento do *T. gondii* variou de 25 a 3200, não sendo observados caprinos com títulos de 400 e 800 (Tabela 14 e Gráfico 9).

Tabela 14 – Distribuição do número bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de caprinos, segundo o título de anticorpos anti-*T. gondii*. São Paulo - 2007

Caprinos			
Título	Nº de Bioensaios	Nº de Isolados	%
25	08	02	25,0
50	07	02	28,6
100	05	02	40,0
200	02	02	100
1600	02	02	100
3200	02	02	100
Total	26	12	46,2

Gráfico 9 – Distribuição dos anticorpos anti-*T.gondii* dos caprinos em relação ao bioensaio em camundongos. São Paulo - 2007

Não houve associação entre o título de anticorpos anti-*T.gondii* dos caprinos e o isolamento do agente no bioensaio em camundongos ($p=0,052$).

A tabela 15 apresenta a distribuição do número de bioensaios realizados e isolados obtidos segundo a localização do Município e Estado de origem dos caprinos.

Tabela 15 – Distribuição do número de bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de caprinos por Município e Estado de procedência. São Paulo - 2007

Município	Nº de bioensaios	Nº de isolados	%
Marília - SP	05	0	0
Botucatu - SP	18	10	55,6
Ouro Branco - RN	3	1	33,3
Jd. de Seridó - RN	2	1	50,0
Total	26	12	46,2

Para os 26 bioensaios realizados com tecidos de caprinos, foram inoculados 720 camundongos; 48 (6,2%) se infectaram e destes, em 36 (75%) a infecção levou o animal a óbito que ocorreram dos dias 13^o ao 30^o P.I. com média de 19,9 dias P.I..

A porcentagem de óbitos por toxoplasmose entre os camundongos infectados foi de 80 a 100% em 10 grupos de animais infectados e em dois grupos não ocorreram óbitos (Gráfico 10).

Todos os camundongos sorologicamente negativos não estavam infectados com *T.gondii*, não sendo encontrados cistos do parasito nos fragmentos cerebrais examinados microscopicamente. Nos camundongos que apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* e que sobreviveram até o término do período de observação (60 dias), cistos cerebrais foram encontrados quando examinados microscopicamente.

Gráfico 10 – Número de isolados obtidos através do bioensaio em camundongos com tecidos de caprinos, por porcentagem de óbitos dos camundongos. São Paulo - 2007

5.2.3 Análise Genotípica

5.2.3.1 PCR – RFLP

Pela análise de restrição em segmentos do *locus* SAG2, foi identificado apenas tipo I de *T.gondii* em caprinos. Em nenhum animal, isolados do tipo II, III ou infecções mistas foram encontrados.

Na figura 3 podem ser visualizados os padrões observados na PCR-RFLP para a diferenciação dos genótipos de isolados de origem caprina obtidos em camundongos.

A

B

Figura 3 — PCR – RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para genotipagem e isolados de *T gondii* de caprinos naturalmente infectados. (A) Análise de restrição de produtos amplificados de fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras do tipo I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com endonuclease *Hin6I*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos caprinos seguido pelo número dos camundongos correspondentes aos isolados analisados. Capri= caprino, Linha I= controle tipo I (amostra RH), Linha II = controle tipo II (isolado de veado), Linha III = controle tipo III (amostra de gambá). M= marcador (peso molecular de 100pb, Fermentas)

5.2.4 – Genótipos de *T.gondii* em caprinos

Dentre os caprinos, todos os isolados obtidos pertencem ao genótipo tipo I. Dentre os seis Municípios estudados, de três foram obtidos isolados: Botucatu - SP, Jardim de Seridó - RN e Ouro Branco – RN (Mapa 4).

Não foi possível fazer associações entre idade, sexo, raça e sistema de produção dos caprinos e a genotipagem de isolados de *T. gondii*, devido a observação apenas do genótipo tipo I.

Mapa 4 – Localização dos Municípios e Estados nos quais isolados de *T. gondii* foram obtidos de caprinos. São Paulo - 2007

Nos dois grupos de camundongos que apresentavam animais sobreviventes, 12 dos 15 camundongos inoculados estavam infectados com o agente e apresentavam-se debilitados e com sinais clínicos da toxoplasmose.

Em relação à sobrevida, 62,7% (30/48) dos camundongos tiveram óbitos entre o 15º e 30º dia P.I.. No gráfico 11 está representada a distribuição das proporções de sobrevida dos camundongos infectados com o isolado de *T. gondii* de caprinos naturalmente infectados.

Gráfico 11 – Proporção de camundongos sobreviventes infectados com os isolados de *Toxoplasma gondii* de caprinos naturalmente infectados do dia 0 até o término do experimento (60 dias). São Paulo - 2007

A tabela 16 apresenta os resultados dos bioensaios em camundongos dos caprinos por Município e Estado de origem.

Tabela 16 – Isolamento de *T. gondii* de caprinos através do bioensaio em camundongos, segundo Município e Estado de procedência e título de anticorpos anti-*T. gondii* dos caprinos. São Paulo - 2007

Bioensaio em camundongos							
Título de anticorpos	Nº do caprino	Nº de óbito/ Nº infectado	% de óbitos	Sobrevida (dias P.I.)	Média (dias)	Procedência	Genó tipo
25	113 [§]	7/7	100	20; 21; 22; 23; 23; 25; 26	22,9	Botucatu - SP	I
	117**	1/1	100	31	31,0	Botucatu - SP	I
50	119*	5/5	100	13; 14; 14; 19; 19	15,8	Botucatu - SP	I
	124**	10/10	100	14; 14; 16; 16; 16; 16; 16; 17; 18; 25	16,8	Botucatu - SP	I
100	114**	2/2	100	19; 19	19,0	Botucatu - SP	I
	115*	1/1	100	27	27,0	Botucatu - SP	I
200	126**	2/2	100	23; 24	23,5	Botucatu - SP	I
	67*	0/1	0	sobreviveu	0,0	Jd. de Seridó -RN	I
1600	125**	1/1	100	30	30,0	Botucatu - SP	I
	79 [§]	0/11	0	sobreviveram	0,0	Ouro Branco - RN	I
3200	51 [§]	2/2	100	20; 24	22,0	Botucatu - SP	I
	137*	5/5	100	17; 17; 18; 20; 20	18,4	Botucatu - SP	I

P.I.= pós inoculação, * Diafragma e masseter, ** coração e cérebro, § em ambos grupos (Diafragma, Masseter, Coração e Cérebro).

5.3 SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS DO GENÓTIPO TIPO I DE OVINOS E CAPRINOS

Comparando a sobrevivência dos camundongos infectados com o genótipo I em ambas espécies, pôde-se observar que as médias foram de 19,9 e 23,6 dias, respectivamente para caprinos e ovinos como apresentado no gráfico 12.

Gráfico 12 - Proporção de camundongos sobreviventes infectados com o genótipo I de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos do dia 0 até o término do experimento (60 dias). São Paulo, 2006

Houve associação entre a sobrevivência dos camundongos infectados com o genótipo I de caprinos e ovinos ($p < 0,001$), com os isolados do tipo I de caprinos sendo mais letais para os camundongos e com menor intervalo de tempo entre a infecção e o óbito dos camundongos.

6 – DISCUSSÃO

As amostras de ovinos e caprinos foram coletadas de acordo com o fluxo de abate dos frigoríficos e das necessidades dos proprietários sendo assim, uma amostragem por conveniência, não havendo cálculo estatístico prévio para coleta de material segundo sexo, raça, idade e origem dos mesmos. Os valores de ocorrência obtidos são dados complementares ao estudo de isolamento e genotipagem de *T. gondii* nessas espécies animais. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 24,2% dos ovinos e 32,2% dos caprinos.

A prevalência da toxoplasmose, nas diferentes regiões do mundo, varia de acordo com as condições climáticas, presença de felinos, com o tipo de criação e com o manejo dos rebanhos. Em ovinos, estudos de ocorrência vêm sendo realizados no mundo todo, e apresentam uma variação de 23 a 72% (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). No Brasil, a soropositividade observada nesta mesma espécie variou entre 14,5% (MAINARDI et al., 2003) a 44,8% (SILVA et al., 2006) e no Estado de São Paulo a ocorrência foi observada de 34,7% (FIGLIUOLO et al., 2004).

Não foi possível obter com exatidão a idade dos ovinos, sendo considerados jovens, os ovinos com até um ano de idade e adultos aqueles com mais de um ano de idade. Foram observadas diferenças ($p < 0,001$) entre os grupos em questão, com maior soropositividade nos adultos (63,2%) do que os jovens (21,0%). Garcia et al. (1999) e Figliuolo et al. (2004) no Brasil observaram que a soropositividade aumentou com a idade dos animais. Outros autores (LUNDÉN; NÄSHOLM; UGGLA, 1994; GORMAN et al., 1999; VAN DER PUIJE et al., 2000) também obtiveram resultados semelhantes e sugeriram que com a idade aumenta as chances de contato com as formas do parasito no ambiente, ocorrendo a infecção e soroconversão dos hospedeiros.

Apesar da grande diferença entre o número de ovinos amostrados com relação ao sexo (número maior de machos em relação às fêmeas), diferença ($p < 0,001$) foi observada com maior soropositividade dentre as fêmeas (50,0%) do que entre os machos (21,3%). Silva et al. (2003) observaram maior ocorrência entre os machos, apesar do número de machos amostrados (38) ter sido superior ao de fêmeas (135).

Os ovinos mestiços apresentaram maior soropositividade ao agente (26,5%); que aqueles com raça pura (22,0%), porém esta diferença não foi significativa ($p=0,24$). Dentre os animais com raça definida, os Sulffolk foram os que apresentaram um maior número de animais soropositivos (47,6%) porém, devido ao baixo número de ovinos dentre de cada raça estudada, associação só foi possível de ser determinada entre os mestiços e os com raça, Silva et al. (2003) encontraram a mesma diferença entre os ovinos de raça definida e mestiços e relatam que esta associação poderia estar ocorrendo devido ao menor cuidado no manejo higiênico-sanitário das criações de animais mestiços.

No presente trabalho, foi observada associação em relação ao sistema de produção ($p<0,001$), com maior ocorrência de ovinos soropositivos no sistema semi-intensivo (47,9%) em relação ao sistema intensivo (16,4%) e extensivo (35,4%), demonstrando que a soropositividade para *T. gondii* pode estar associada ao manejo. Segundo Engeland et al. (1996), na Noruega, a pastagem contaminada pode ser considerada como a principal fonte de infecção para os herbívoros. Estudos de prevalência do *T. gondii* em fazendas de ovinos com manejo intensivo no Reino Unido ressaltam a importância da transmissão congênita e relatam que o risco de outras vias de infecção é reduzido, podendo ser a transmissão congênita suficiente para explicar a manutenção do agente nessas populações (ENGELAND et al., 1996; DUNCANSON et al., 2001). Entretanto, o aumento, em nosso meio, de ovinos soropositivos com o avançar da idade em nosso meio, indica que, em nossas condições, a via vertical de infecção tem menor importância.

Nos ovinos, os títulos de anticorpos variaram de 25 a 3200, com 71,7% dos animais com títulos baixos, entre 25 a 200. Ovinos soropositivos foram observados em 72,2% das localidades de procedência das amostras. Gondim et al. (1999) também observaram diferenças na soropositividade em amostras de ovinos e caprinos procedentes de regiões distintas do Estado da Bahia, com influência provável da região e do manejo adotado nas criações desses animais.

As amostras dos caprinos foram colhidas principalmente de animais de descarte em propriedades de leite. Anticorpos anti-*T.gondii* foram observados em 31,5%. Os títulos de anticorpos variam de 25 a 3200 e 66,7% dos Municípios dos quais caprinos foram amostrados apresentaram pelo menos um animal soropositivo.

Estudos de soroprevalência em caprinos também vêm sendo realizados no mundo todo, na revisão de Tenter; Heckerroth; Weiss (2000), uma variação de 3 a

75%, nos valores de ocorrência já foram observadas em diversos países. No Brasil, a soropositividade nesta espécie variou entre 8,0 (SILVA et al., 2002) a 40,8% (SILVA et al., 2003). Nos Estados de São Paulo e Bahia, valores similares de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* foram observados, com 28,7% (FIGLIUOLO et al., 2004) e 28,5% respectivamente (GONDIM et al., 1999). Entretanto, vale lembrar que no presente estudo a amostragem foi por conveniência.

Os caprinos também apresentam importante papel na epidemiologia da toxoplasmose. Além da possibilidade de transmissão ao homem pela ingestão de carne contaminada com o parasito, estes também podem transmitir o *T. gondii* através do leite. Surto de toxoplasmose relacionados ao consumo de leite cru de cabras infectadas já foram relatados (RIEMANN et al., 1975; SACKS et al., 1982; CHIARI; NEVES, 1984; SKINNER; TIMPERLEY; WIGHTMAN, 1990).

Como nos ovinos, também não foi possível obter com exatidão a idade dos caprinos, sendo os animais igualmente separados por faixa etária em dois grupos, jovens (até um ano) e adultos (maior que um ano). Foi observada diferença ($p < 0,001$) entre os grupos em questão; com maior soropositividade nos adultos (66,7%) do que nos jovens (25,2%). A associação positiva entre presença de anticorpos e caprinos adultos também foi observada por outros autores no Estado de São Paulo (FIGLIUOLO et al., 2004; STACHISSINI, 2005) e Minas Gerais (FIGUEIREDO et al., 2001).

A caprinocultura no Brasil está mais voltada para a produção leiteira, havendo maior proporção de fêmeas em relação a machos e sistema de produção intensivo. Segundo Silva et al. (2003) esses fatores podem influenciar na soropositividade do *T. gondii* em relação ao sexo. No presente estudo foi observada maior proporção de fêmeas soropositivas, porém não observou-se diferença estatística ($p = 0,64$) com 34,6% e 30,8%, respectivamente de fêmeas e machos positivos. Stachissini (2005) também não observou diferenças entre a soropositividade ao *T. gondii* e sexo dos caprinos do Estado de São Paulo.

Em relação ao aspecto racial dos caprinos, foi observada associação ($p < 0,001$) da soropositividade entre animais com raça pura (46,2%) e mestiços (15,6%). Dentre as raças caprinas, a Pardo Alpina foi a que apresentou a maior ocorrência de animais soropositivos (54,4%), porém, como já discutido anteriormente, para os ovinos, os dados obtidos para cada uma das raças não foram possíveis de análise estatísticas. Os títulos de anticorpos variaram de 25 a 3200, e

na distribuição dos títulos foi observada a ocorrência de 91,3% dos caprinos com títulos baixos (25 a 200).

Como já discutido, a soropositividade para *T. gondii* pode estar associada ao manejo, e dentre os caprinos, foi observada maior ocorrência de soropositivos no sistema intensivo (48,4%) em relação aos outros sistemas de produção: semi-intensivo (21,2%) e extensivo (17,2%) ($p < 0,001$), comportando-se diferentemente do observado nos ovinos, com maior soropositividade no sistema semi-intensivo (47,9%).

O isolamento de *T. gondii* nos ovinos foi obtido em 19,5% (16/82), e aumentou significativamente ($p < 0,001$) com o aumento dos títulos de anticorpos, sendo obtidos isolados de *T. gondii* em 75,0% (12/16) dos animais com títulos acima de 1600, indicando aumentar a probabilidade de isolamento conforme aumentam os títulos de anticorpos. No presente estudo o índice de recuperação pelo bioensaio (19,5%), foi relativamente baixo, indicando que havia poucos parasitos nos inóculos dos ovinos testados nos camundongos, porém resultado semelhante foi observado em isolamento do *T. gondii* de ovinos na França (DUMÈTRE et al., 2006).

Silva (1999), através do bioensaio em camundongos, isolaram *T. gondii* em 85,0% das amostras de ovinos inoculados, porém o número de camundongos e a quantidade de tecido utilizada foi maior do que a do presente estudo, reforçando a importância do uso de um grande número de camundongos e de tecido utilizados para a recuperação do agente. Owen e Trees (1999) isolaram *T. gondii* de todas as amostras analisadas, porém estas eram provenientes de abortamento de ovinos, provavelmente material mais rico e favorável para o isolamento desse parasito.

Dos 21 Municípios onde foram encontrados ovinos soropositivos e realizados bioensaios, em 42,9% desses foi obtido, pelo menos, um isolado de *T. gondii*. Neste estudo, apesar do maior número de isolamentos ter sido obtido de ovinos mestiços ($p = 0,15$), machos ($p = 0,63$) e jovens ($p = 0,90$), não houve associação entre o isolamento do agente e essas variáveis.

Dubey; Thulliez; Powell (1995), através de bioensaios em camundongos, relatam que o número de parasitos encontrados nos tecidos é baixo. Portanto, com a finalidade de se obter maior concentração do *T. gondii* no inóculo, os tecidos são digeridos em pepsina. Outro fato que contribui para o sucesso do isolamento do agente está relacionado com o número de camundongos inoculados, além da quantidade de tecido utilizada e a concentração do parasito nas amostras teciduais

(DUBEY et al., 2005). Neste estudo, foi escolhido um *pool* de tecidos (cérebro, coração e diafragma), baseado nos trabalhos de Dubey et al. (1986), Esteban-Redondo; Innes (1998), Esteban-Redondo et al. (1999) e Silva e Langoni (2001). Nesses estudos a maior proporção de isolamentos foi observada em amostras oriundas do coração, cérebro (ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1998) e diafragma (SILVA; LANGONI, 2001).

Dentre os isolados de ovinos, em 43,8% (7/16) dos grupos de camundongos inoculados não foi observado nenhum óbito. Dos camundongos inoculados 12,0% (49) se infectaram e em 42,8% (21) destes, o isolamento do agente foi fatal. Os óbitos dos camundongos por toxoplasmose ocorreram dos dias 18º a 32º P.I., com média de 23,6 dias. Em estudo semelhant, na França, não foram observados óbitos e 34,4% dos camundongos inoculados não se infectaram (DUMÈTRE et al., 2006).

Dentre os caprinos, o isolamento de *T. gondii* foi obtido em 46,2% (12/26). Diferentemente aos ovinos, não foi observada associação ($p=0,052$) entre título de anticorpos e isolamento do agente, sendo obtidos dois isolados em cada título de anticorpos (25, 50, 100, 200, 1600 e 3200), indicando haver a mesma probabilidade de isolamento do agente, independente do título de anticorpo do caprino. Há fortes evidências de aumentarem as chances de isolamento de acordo com o aumento dos títulos de anticorpos, porém há relatos de isolamentos de *T. gondii* de galinhas com títulos bastante baixos (SREEKUMAR et al., 2003; DUBEY et al., 2003e).

Há poucos estudos de isolamento de *T. gondii* em camundongos à partir de tecidos de caprinos. Cavalcante (2004) utilizando apenas a musculatura cardíaca e cinco camundongos inoculados por grupo, obtiveram 20% de isolamento resultando em apenas dois isolados de *T. gondii* de amostras de 10 caprinos soropositivos.

Neste estudo os bioensaios iniciaram-se nos ovinos e foi observado que o índice de isolamento era baixo, assim nas amostras de caprinos, além do maior número de camundongos inoculados (de cinco para 15), também foi aumentada a quantidade de tecido utilizado (de 50g para 100g). A obtenção de maior porcentagem de isolamentos dos caprinos (46,2%) em relação aos ovinos (19,5%) provavelmente tenha ocorrido devido a essas alterações nos bioensaios.

Com relação aos tecidos utilizados, nos caprinos há relatos de maior detecção do parasito na musculatura esquelética (DUBEY.,1980; NISHI; KASAI;

GENNARI, 2001). Neste estudo masseter foi acrescido, fazendo dois *pools* de tecidos: (1) masseter e diafragma e (2) cérebro e coração. Os isolamentos de *T. gondii* obtidos nos camundongos infectados com masseter mais diafragma e cérebro e coração foram de quatro e cinco isolados respectivamente, e em três o agente foi obtido nos dois grupos.

Dentre os 12 isolamentos foram observados óbitos em dez grupos de camundongos (83,3%). Como observado nos ovinos, dentre os caprinos também não houve associação entre isolamento do agente e o sexo ($p=0,02$) e a raça ($p=0,84$). Com relação à faixa etária, foi observada associação ($p=0,02$) com maior número de isolamentos nos animais adultos como anteriormente discutido, provavelmente isso tenha ocorrido pela maior oportunidade de aquisição da infecção com a idade.

Os valores de sobrevivência e número de camundongos infectados foi inferior para os caprinos (19,9 dias e 6,7%, respectivamente) quando comparado aos ovinos (23,6 dias e 12,0%, respectivamente). Entretanto a taxa de mortalidade dos camundongos ensaiados com tecidos dos caprinos (75,0%) foi superior à dos ovinos (42,9%).

Diferenças no comportamento biológico do *T. gondii* também podem ser influenciadas pela espécie do hospedeiro. Num estudo com infecção experimental do agente em ovinos e bovinos, observou-se que o parasita persistiu no tecido dos ovinos enquanto que nos bovinos, após seis semanas da infecção, *T. gondii* não foi mais observado (ESTEBAN-REDONDO et al., 1999). Outros estudos também relatam diferenças entre os diversos tipos de hospedeiros em relação ao comportamento biológico do *T. gondii* (COSTA et al., 1977; ESTEBAN-REDONDO; INNES, 1997).

Os primeiros estudos com genotipagem do *T. gondii* de diferentes espécies, realizados com amostras dos EUA e Europa, relatam que o agente apresenta uma estrutura populacional clonal, fato este que forneceu, com grande confiabilidade, base inicial para a tipagem de amostras utilizando um único *locus*, principalmente o SAG2 (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995).

Howe e Sibley (1995) subdividiram o *T. gondii* em três linhagens distintas denominadas tipo I, II e III, através da PCR-RFLP no *locus* SAG2. Desde então vários estudos vêm sendo realizados para a genotipagem do *T. gondii* em diferentes partes do mundo com amostras humanas e animais, sendo encontrado os três

genótipos (I, II e III), apresentando freqüências diferentes. De modo geral, em humanos foram mais observadas amostras tipo I e em animais tipo II ou III, com maior freqüência de isolados do tipo II (HOWE et al., 1997; MONDRAGON et al., 1998; OWEN; TREES; 1999; DUBEY et al.; 2005a; DUBEY et al.; 2005c).

Em 2002, Dubey e colaboradores publicaram o primeiro de uma série de trabalhos de caracterização genotípica do *T. gondii* de galinhas. Este primeiro estudo foi realizado com aves do Estado de São Paulo, utilizando a PCR-RFLP no *locus* SAG2 e, contrariando as expectativas sobre o padrão genotípico das amostras de *T.gondii* de origem animal, foi observado 64% de positividade para o tipo I, 36% para o tipo III e nenhum isolado tipo II.

Desde então vários trabalhos semelhantes vêm sendo realizados com amostras brasileiras de humanos e animais, sendo observado um padrão diferente do preconizado por Howe e Sibley (1995), como no presente estudo a ocorrência do tipo I, bastante elevada com 87,5% dos ovinos e 100 % dos caprinos e do tipo III com 12,5% dos ovinos e o não encontro da amostra tipo II.

Estudos de genotipagem com outros marcadores moleculares vêm sendo utilizados em amostras brasileiras e de outros países, em especial, da América Latina. Caracterização genotípica e isolados do parasito de galinhas do Chile (DUBEY et al., 2006a), Nicarágua (DUBEY et al., 2006f) e Costa Rica (DUBEY et al., 2006b), utilizando cinco marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB e GRA6) observaram a ocorrência de amostras atípicas ou recombinantes, ocorrendo genótipos múltiplos (I/III) no mesmo isolado.

No Brasil, em amostras de humanos também foi observada a ocorrência de isolados atípicos ou recombinantes quando analisados outros marcadores além do SAG2 (FERREIRA et al., 2006; KHAN et al., 2006).

Estudo semelhante foi realizado com galinhas do Pará e do Rio Grande do Sul, porém foram utilizados, além dos cinco marcadores citados anteriormente, mais seis (c2-8, c29-2, L358, PK1, *new* SAG2 e Apico), observando que apenas um isolado de *T. gondii* comportou-se de forma idêntica em todos os marcadores (linhagem clonal tipo I). Todos os outros isolados comportaram-se de forma atípica ou recombinante (DUBEY, et al.; 2007).

Num estudo com amostras de *T.gondii* de cães do Município de São Paulo, também foi detectada ocorrência de variabilidade genotípica dos isolados obtidos, sendo observada a ocorrência de isolado tipo III nos 11 marcadores

utilizados em apenas uma amostra, enquanto os outros 18 isolados foram considerados atípicos ou recombinantes (DUBEY et al.; 2007a).

Ainda no Brasil, foi observado perfil atípico ou recombinante (I/III) na caracterização genotípica de dois isolados de caprinos obtidos no Ceará, (CAVALCANTE et al., 2006) utilizando seis marcadores (SAG2, SAG3, GRA6, L363, cS10-A6, cB21-4). Essas amostras quando analisada no pela PCR-RFLP no SAG2, apresentaram perfil tipo I e tipo III. Em Minas Gerais em uma única amostra de *T. gondii* obtida de caprino também foi detectada a ocorrência de genótipo recombinante (FERREIRA et al., 2006).

Através dos estudos de genotipagem do *T. gondii* das amostras brasileiras, pode-se observar um comportamento diferente dos isolados de outros países. Em nenhum estudo de caracterização genotípica do parasito pela PCR-RFLP no *locus* SAG2, a ocorrência do tipo II foi observada, porém em outras localidades este é considerado o genótipo mais prevalente em isolados de animais e, mesmo utilizando marcadores com maior capacidade de detecção de heterogeneidade, o tipo II não vem sendo observado nos isolados de *T. gondii* de amostras brasileiras.

É certo que a utilização de um único *locus* é menos específica do que marcadores com maior grau de polimorfismo, porém a PCR- RFLP no *locus* SAG 2, utilizada no presente estudo, possibilitou a observação de heterogeneidade na genotipagem e no comportamento biológico dos isolados obtidos de ovinos, uma vez que dados de isolamento, caracterização biológica e genotípica de *T. gondii* de ovinos e caprinos eram praticamente inexistente no país.

Vale ressaltar que todos os estudos nos quais além do SAG2, outros marcadores foram utilizados, são bastante recentes, (de 2005 a 2007). Quando da realização do projeto deste estudo, ainda acreditava-se que os três arquétipos do *T. gondii* seguiam o padrão clonal, entretanto as observações do fenótipo (sobrevida dos camundongos) e o genótipo do SAG2 vem trazendo grandes evidências de que, em nosso país esse comportamento clonal não esteja ocorrendo. O comportamento fenotípico observado com os isolados do presente estudo trazem grandes evidências que as amostras de *T. gondii* se analisadas por mais marcadores, apresentariam, em sua maioria, um padrão misto ou recombinante.

No presente estudo como todos os isolados dos caprinos foram tipo I, associação entre, sexo, idade, raça, sistema de produção e títulos de anticorpos e a genotipagem não foram analisadas. Já para os ovinos, apesar de 75,0% dos

isolados obtidos serem de animais com títulos maiores que 1600, não houve associação entre o título e a obtenção de isolados. ($p=0,745$). Pena (2004) observou diferença na resposta de anticorpos anti-*T. gondii* em camundongos infectados com o genótipo I e III, apresentando maiores títulos de anticorpos em camundongos com o genótipo I.

Apesar dos isolados de *T. gondii* dos ovinos apresentarem maior número de genótipo I dentre os machos, jovens, mestiços e de sistema de criação semi-intensivo e o genótipo III em machos, jovens e sistema de produção intensiva, não houve associação entre sexo, idade, raça, sistema de produção e a genotipagem dos isolados de *T. gondii* dos ovinos ($p<0,001$).

São poucos os trabalhos de genotipagem de *T. gondii* de origem de ovina e caprina. Em amostras de abortamentos de ovinos ocorridos no Reino Unido detectaram amostras tipo II (OWEN; TREES, 1999). Tecidos de produtos alimentícios de origem ovina no País de Gales apresentaram os genótipos I e II (ASPINALL et al., 2002). Na França, mesmo utilizando cinco marcadores (TUB2, TgM-a, W35, B17, B18), a ocorrência observada foi apenas do genótipo II (DUMÈTRE, et al., 2006).

Para aumentar a quantidade de amostras genotipadas, foi realizada a *n*PCR em amostras primárias dos ovinos, porém não foi possível a amplificação em nenhum dos homogeneizados dos tecidos, provavelmente devido a pouca quantidade do parasito nesses tecidos. Owen e Trees (1999) conseguiram obter 100% de amplificação pela PCR, porém eram amostras ricas em *T. gondii* devido serem proveniente de abortamento de ovelhas determinado pelo parasito.

Se somente o SAG2 for analisado, observa-se que o perfil da caracterização genotípica dos ovinos e caprinos obtidos no presente estudo foi semelhante aos dados obtidos anteriormente em estudos semelhantes realizados no Brasil em outras espécies animais como em cães (SILVA et al, 2005; BRANDÃO et al., 2006), galinhas (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003d; ; DUBEY et al., 2003e), gatos (DUBEY et al., 2003; PENA et al., 2006), suínos (SANTOS et al., 2005, SOUSA et al., 2006) e capivaras (YAI et al., 2006), ocorrendo de forma predominante os genótipos I ou III, quando o *locus* SAG2 é utilizado na genotipagem. Em humanos há relatos da ocorrência principalmente de amostras tipo I (VALLOCHI et al., 2005; FERREIRA et al., 2004; MOURA et al., 2006), entretanto grande parte dessas amostras são de pacientes com casos clínicos de

toxoplasmose, enquanto as amostras animais são de indivíduos clinicamente normais.

Esta marcante diferença no perfil de isolamentos do SAG2 associada à observação de mortalidade de camundongos em todos os haplótipos encontrados (tipo I e III), também de forma diversa à anteriormente preconizada, traz evidências de que as amostras brasileiras apresentem maior polimorfismo de DNA e que um único marcador, como o SAG2 não está detectando essas diferenças.

Desde a classificação por Howe e Sibley (1995) das amostras de *T. gondii* em tipo I, II e III, vêm sendo realizados vários estudos para correlacionar o genótipo do parasito com a severidade da doença em isolados de origem humana e animal (MONDRAGON et al., 1998; FUENTES et al., 2001; ASPINALL et al., 2003). Os isolados tipo I têm se apresentando virulentos a camundongos com alta parasitemia quando comparados com os outros genótipos e com uma possível correlação com infecção congênita em humanos. Isolados tipo II foram os mais prevalentes tanto em humanos como em animais em várias partes do mundo, havendo uma possível correlação com reativação da toxoplasmose em indivíduos imunocomprometidos (HOWE et al., 1997; MONDRAGON et al., 1998; FUENTES et al., 2001). Isolados tipo III parecem ser menos freqüentes em humanos porém, comumente encontrados em animais (HOWE, SIBLEY, 1995).

Os resultados observados na genotipagem de *T. gondii* de galinhas caipiras assintomáticas do Estado de São Paulo, também apresentaram-se diferentemente em relação à virulência em camundongos, com o tipo I nem sempre causando mortalidade em camundongos e tipo III algumas vezes apresentando-se virulento. A partir deste relato, iniciaram vários trabalhos de genotipagem em galinhas procedentes de criações domésticas e do total de 139 amostras obtidas de várias localidades do Brasil, 62,5% eram tipo I, não foi observado tipo II e o tipo III apresentou-se virulento a camundongos (DUBEY et al., 2002, DUBEY et al., 2003d, DUBEY et al., 2003e, DUBEY et al., 2006; FERREIRA et al., 2006, DUBEY et al. 2007). Outras espécies animais estudadas no Brasil, também apresentaram perfil semelhante (DUBEY et al., 2004, SANTOS et al., 2005, PENA et al., 2006, YAI, et al., 2006).

Isolados *T. gondii* de galinhas de alguns países da América Latina como Costa Rica, México e Peru, apresentam perfil semelhante às das amostras brasileiras (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004a; DUBEY et al., 2004b; DUBEY et

al., 2006b), porém na Argentina, apesar da proximidade, a maioria dos isolados obtidos não foram patogênicos para os camundongos e isolado tipo II foi encontrado.

No presente estudo, foi observada diferença na taxa de mortalidade dos camundongos infectados com amostras de tecido dos ovinos, com isolados tipo I apresentando-se virulentos a camundongos, causando mortalidade em 51,0% destes, porém 42,9% das amostras tipo I não causaram mortalidade e apresentaram poucos cistos teciduais no cérebro dos camundongos infectados. Genótipo tipo III não causou mortalidade nos camundongos infectados. Apesar de não ser observado mortalidade no genótipo tipo III, não houve associação entre óbitos e genótipos I e III ($p=0,45$), podendo ser influenciado pela diferença entre os números de isolados obtidos do genótipo I (14) e genótipo III (2).

Dentre os caprinos, apesar de todas as amostras apresentarem o perfil tipo I, foi observada diferença na taxa de mortalidade dos camundongos, com mortalidade em 83,4% dos grupos inoculados e dois grupos não apresentaram mortalidade.

Os óbitos dos camundongos infectados ocorreram em média em 23,6 dias e 19,9 dias nos ovinos e caprinos respectivamente. Quando comparadas às sobrevivências dos camundongos dos isolados tipo I dos ovinos com os dos caprinos, pode-se observar que não há associação ($p<0,001$), porém os isolados de *T. gondii* tipo I dos caprinos causaram maior mortalidade com média de sobrevivência inferior. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que em nosso meio, a avaliação do fenótipo e a correlação com o genótipo pelo SAG2, nem sempre corresponde ao anteriormente observado com amostras européias e norte americanas.

Pena (2004) obteve resultado semelhante aos obtidos nos isolados dos caprinos, na média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de tecidos de gatos e relata que não foi possível determinar previamente a quantidade de parasitos inoculados, podendo esta quantidade estar influenciando o fenótipo expresso nos camundongos infectados. A mesma observação é válida no presente estudo, no qual também não pode controlar a quantidade de parasitos inoculados.

Embora o reconhecimento das linhagens I, II e III seja uma condição consagrada pela comunidade científica em todo mundo, há demonstrações da existência, no Brasil, de linhagens divergentes das três linhagens arquétipos, bem como linhagens recombinantes ou atípicas (LEHMANN et al., 2004; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; FERREIRA et al., 2006). Vale ressaltar que a genotipagem de

amostras de *T. gondii* baseada na identificação de polimorfismo num único *locus* não permite o conhecimento da ocorrência de isolados recombinantes ou atípicos (GENNARI; SOARES, 2006). Blackston et al. (2001) e Ajzenberg et al. (2002) preconizam que em situações de rastreabilidade do *T. gondii* ou para associar o genótipo e a apresentação clínica, é indicada a utilização de métodos com maior resolução que aqueles capazes de reconhecer apenas as três linhagens arquétipos, porém esses não foram os objetivos da presente estudo.

Utilizando métodos moleculares com maior resolução, é observada a ocorrência de padrões recombinantes ou atípicos entre as amostras brasileiras (CAVALCANTE et al., 2006b; DUBEY et al. 2007; DUBEY et al., 2007a). É certo que a utilização de um único *locus* é menos específica do que marcadores com maior grau de polimorfismo, porém a PCR- RFLP no *locus* SAG 2, utilizada no presente estudo, possibilitou a observação de heterogeneidade na genotipagem e no comportamento biológicos dos isolados obtidos de ovinos, uma vez que dados de isolamento, caracterização biológica e genotípica de ovinos e caprinos eram praticamente inexistente.

Os resultados baseados em métodos de tipagem de isolados de *T. gondii*, indicam que ainda há muito para se conhecer sobre a epidemiologia deste parasito e seus genótipos nos humanos e nos animais. Apesar da alta clonalidade dos isolados de *T. gondii* encontrada em vários estudos (HOWE; SIBLEY, 1995; DUBEY et al., 2002; DUBEY, et al., 2003c; SREEKUMAR et al., 2003; DUBEY; MARCET; LEHMANN, 2005c), Mondragon et al. (1998) observaram que a clonalidade não exclui a recombinação genotípica e não significa que os isolados de um mesmo tipo sejam absolutamente idênticos.

É certo que métodos para caracterização genotípica do *T. gondii* com maior resolução que aqueles capazes de reconhecer as três linhagens arquétipos (I, II, III) são desejáveis (BLACKSTON et al., 2001; AJZENBERG et al., 2002; SOARES, 2004), porém Su; Zhang; Dubey (2006) recomendam a padronização dos marcadores utilizados para possibilitar comparações de genotipagem e atributos biológicos do *T. gondii* isolado em diferentes partes do mundo como foi inicialmente realizado através da PCR-RFLP no *locus* SAG2 com amostras de animais e humanos e que vêm sendo, mais recentemente ampliado para seis e até onze marcadores.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- *Toxoplasma gondii* encontra-se presente na população ovina do Estado de São Paulo e caprina dos Estados de São Paulo e Rio Grande do Norte
- O título de anticorpos anti-*T. gondii* é um fator relevante na seleção de ovinos para o bioensaio em camundongos.
- Os genótipos tipo I e III estão distribuídos na população ovina do Estado de São Paulo.
- Os genótipos I e III dos isolados dos ovinos apresentaram comportamento biológico diferente nos camundongos, sendo a linhagem tipo III avirulenta a camundongos e a linhagem tipo I apresentando isolados virulentos e não virulentos a camundongos
- A utilização da *n*PCR não permitiu detectar *T. gondii* pela análise direta nos homogeneizados de tecidos de ovinos.
- Foi encontrado apenas o genótipo I na população caprina estudada, sendo observada diferenças no comportamento biológico nos camundongos
- A idade é um fator que deve ser considerado na seleção de caprinos para o bioensaio em camundongos,
- Amostras tipo I de caprinos apresentou-se mais virulenta a camundongos que as do tipo I de ovinos

REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; TIBAYREN, C. M.; DARDE, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27-38, 2002.
- AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDE, M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.
- ANUALPEC: **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006. p. 277-279.
- APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal Parasitology**, v. 30, n. 2, p. 1187-1191, 1997.
- ASHBURN, D. History and general epidemiology. In: HO-YEN, D. O.; JOSS A. W. L. (Ed.): **Human toxoplasmosis**. **Oxford University Press**, Oxford: 1992. p. 1-26.
- ASPINALL, T. V.; GUY, E. C.; ROBERTS, K. E.; JOYNSON, D H.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications **International Journal 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 or thought? **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 193-1199, 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.
- BLACKSTON, C. R.; DUBEY, J. P.; DOTSON, E.; SU, C.; THULLIEZ, P.; SIBLEY, O.; LEHMANN, T. High-resolution typing *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. **Journal Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1472-1475, 2001.
- BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; SILVA, E. M. K. da; BORTOLIERO, A. L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 21-25, 1997.
- 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.
- BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, n. 2, p. 143-149, 2006.
- CAVALCANTE, A. C. R. **Epidemiologia e caracterização do *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceau, 1909) em Caprinos no Ceará**. 2004, 146 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- CAVALCANTE, A. C. R.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; FUX, B.; BRANDÃO, G. P.; VITOR, R. W. A; Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. **Small Ruminant Research**, 2006 (no prelo).
- CAVALCANTE, G. T.; AGUIAR, D. M.; CHIEBAO, D. P.; MEIRELES, L.R.; ANDRADE JR., H.F.; CAMARGO, L. M. A, LABRUNA, M. B; RUIZ, V. L. A, GENNARI, S. M. Ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em humanos e animais domésticos da zona rural do município de Monte Negro, Rondônia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 217, 2004. Suplemento 1.
- CHIARI, C. de A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 3, p. 337-340, 1984.
- CORDEIRO, P. R. C. O desenvolvimento econômico da caprinocultura leiteira. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 13, p. 28-30, 1998.
- COSTA, A. J.; ARAUJO, F. G.; COSTA, J. O.; LIMA, J. D.; NASCIMENTO, E. Experimental infection of bovine with oocysts of *Toxoplasma gondii*. **Journal Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 212-218, 1977.

- COUTO, F. A. A. Dimensionamento do Mercado de Carne Ovina e Caprina no Brasil. In: CNPq. **Apoio à cadeia produtiva da ovinocaprinocultura brasileira**. Relatório final. Brasília, 2001. p. 10-15
- 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. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Ann. Isnt. Super Sanità**, v. 40, n. 1, p. 57-63, 2004.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 36 *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. **Journal of Parasitology**, v. 39, n. 6, p. 551-558, 1998.
- 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.
- 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, 1997.
- 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. 216-219, 2001.
- DUBEY, J. P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 177, n. 12, p. 1203-1207, 1980.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 76-77, 1998b.
- 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, 1997a.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 206, n. 11, p. 1693-1698, 1994.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, v. 17, n. 6, p. 1389-1404, 1987a.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in cat. **Feline Practice**, v. 16, n. 4, p. 12-45, 1986b.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in goats: A review. **Agri-Practice**, v. 8, p. 43-62, 1987b.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In- PALMER, S. R., SOULSBY, E. J. L., SIMPSON, D. J. H. (eds.): **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, , 1998a. p. 679-697.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988. p. 1-40.
- 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., GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C. B.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E. O.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **Journal Parasitology**, v. 93, n. 1, 2007a.
- 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. 99-106, 2002.
- DUBEY J. P.; LENHART, A.; CASTILLO, C. E.; ALVAREZ, L.; MARCET, P.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in chickens from Venezuela: isolation, tissue distribution, and molecular characterization. **Journal Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1332-1334, 2005e.

- DUBEY, J. P.; MILLER, S.; POWELL, E. C.; ANDERSON, W. R. Epizootologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortions. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, p. 166, 1986.
- DUBEY, J. P.; PATITUCCI, A. N.; SU, C.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. **Veterinary Parasitology**, 2006a.
- DUBEY, J. P.; BHAIYAT, M. I.; DE ALLIE, C.; MACPHERSON, C. N.; SHARMA, R. N.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; LEHMANN, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. **Journal Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 557-560, 2005d.
- DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; VIANNA, M. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36-40, 2006.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 861-863, 2003d.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; HILALI, M.; EL-GHAYSH, A.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; 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, 2003b.
- 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 Parasitology**, v. 89, n. 6, p. 1060-1062, 2003c.
- DUBEY, J. P.; KARHEMERE, S.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; DIABATE, A.; DABIRE, K. R.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C.; LEHMANN, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). **Journal Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 69-72, 2005.
- DUBEY, J. P.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina. **Journal Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1335-1339, 2005c.
- DUBEY, J. P.; MORALES, E. S.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. **Journal Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 411-413, 2004a.
- DUBEY, J. P.; PATITUCCI, A. N.; SU, C.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 76-82, 2006a.
- DUBEY, J. P.; RAJAPAKSE, R. P.; EKANAYAKE, D. K.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens from Sri Lanka. **Journal Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1480-1482, 2005f.
- DUBEY, J. P.; SALANT, H.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; 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, 2004.
- DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P.; LOPES, C. W.; WILLIAMS, J. F.; WILLIAMS, C. S.; WEISBRODE, S. E. Caprine toxoplasmosis: abortion, clinical signs, and distribution of *Toxoplasma* in tissues of goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, n. 7, p. 1072-1076, 1980.
- DUBEY, J. P.; SU, C.; CORTES, J. A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J. E.; PÓLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 42-47, 2006g.
- DUBEY, J. P.; SU, C.; OLIVEIRA, J.; MORALES, J. A.; BOLANOS, R. V.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 29-36, 2006b.

- DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A. da R.; RUAS, J.L.; SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chicken from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.2, p.182-188, 2007.
- DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N. C.; LUNA, L. A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J.B.; KWOK, O. C.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 47-53, 2006f.
- DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; POWELL, E. C. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: compararison 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. B.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal Parasitology**, v. 89, n. 6, p. 1063-1064, 2003a.
- DUBEY, J. P.; VIANNA, M. C.B.; SOUSA, S.; CANADA, N.; MEIRELES, S.; CORREIA DA COSTA, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; DARDE, M. L.; THULLIEZ, P. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Portugal. **Journal Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 184-186, 2006e.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Paraná, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p.229-234, 2003e.
- DUBEY, J.P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004g.
- DUBEY, J. P.; EDELHOFER, R.; MARCET, P.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 299-306, 2005a.
- DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARIN, J. E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C.; HILL, D.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p.67-72, 2005b.
- DUBEY, J. P.; LEVY, M. Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; DAH, E.; THULLIEZ, P.;LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. **Journal Parasitology**, v. 90, n. 6, p. 1015-1018, 2004b.
- DUMETRE, A.; AJZENBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDE, M. L. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: Seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 376-379, 2006.
- DUNCANSON, P.; TERRY, R. S.; SMITH, J. I.; HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. **International Journal Parasitology**, v. 31, n. 14, p. 1699-1703, 2004.
- ENGELAND, I. V.; WALDELAND, H.; KINDAHL, H.; ROPSTAD, E.; ANDRESEN, O. Effect of *Toxoplasma gondii* infection on the development of pregnancy and on endocrine foetal - placental function in the goat. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 61-74, 1996.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1459-1466, 1998.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. **Comparative Immunology Microbiology. Infections Disease**, v. 20, n. 2, p. 191-196, 1997.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; MALEY, S. W.; THOMSON, K.; NICOLL, S.; WRIGHT, S.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Detection of *T. gondii* in tissues of sheep and cattle following oral infection. **Veterinary Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 155-171, 1999.
- FERREIRA, A. D. E. M.; VITOR, R. W.; CARNEIRO, A. C.; BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain

- reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). **Infection Genetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 131-142, 2004.
- FERREIRA, A. D. E. M.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22-31, 2006.
- FIGLIUOLO, L. P.; KASAI, N.; RAGOZO, A. M. A.; DE PAULA, V. S.; DIAS, R. A.; SOUZA, S. L.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from Sao Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 3-4, p. 161-166, 2004.
- FIGLIUOLO, L. P. C.; RODRIGUES, A. A. R.; VIANA, R. B.; AGUIAR, D. M.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 55, n. 1-2, p. 29-32, 2004.
- FIGUEIREDO, J. F.; SILVA, D. A. O.; CABRAL, D. D.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the Indirect Haemagglutination, Immunofluorescence and Immunoenzymatic Tests in the region of Uberlândia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 687-692, 2001.
- FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMIREZ, 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.
- GENNARI, S. M.; SOARES, R. M. Caracterização molecular de isolados brasileiros de *Toxoplasma gondii*. In, 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2006, Ribeirão Preto. p. 149-150
- GONDIM, L. F. P.; BARBOSA JUNIOR, H. V.; RIBEIRO FILHO, C. H. A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 273-276, 1999.
- GORMAN, T.; ARANCIBIA, J. P.; LORCA, M.; HIRD, D.; ALCAINO, H. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and alpacas (*Llama pacos*) in Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n. 3-4, p. 143-149, 1999.
- GRIGG, M. E.; SUZUKI, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes Infectious**, v. 5, n. 7, p. 685-690, 2003.
- HOGDALL, E.; VUUST, J.; LIND, P.; PETERSEN, E. Characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the non-coding *Toxoplasma gondii* (TGR)-gene sequences. **International Journal Parasitology**, v. 30, n. 7, p. 853-858, 2000.
- HOWE, D. K.; I-HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolate 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 Infectology Disease**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566. 1995.
- IBGE. **Banco de dados agregados**. Disponível em:
 <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=20&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 13 de out. 2006.
- JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 65-105, 1989.
- KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFORT, R. JR.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p.942-949, 2006.
- KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D.B.; SIBLEY, L.D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5881-5887, 2005.

- KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KATIC-RADIVOJEĆ, S.; NIKOLIC, A. Cross sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 121-131, 2005.
- LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infectious Genetic Evolution**, v. 4, n. 2, p. 107-114, 2004.
- LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Science U S A**, v. 103, n. 30, p. 1143-1148, 2006.
- LITERÁK I.; RYCIILÍK, I.; SVOBODOVÁ, V.; POSPÍŠIL, Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 1367-1374, 1998.
- LUNDEN, A.; NASHOLM, A.; UGGLA, A. Long-term study of *Toxoplasma gondii* infection in a Swedish sheep flock. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 35, n. 3, p. 273-281, 1994.
- LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Toxoplasmosis: from clinics to basic science. **Parasitology Today**, v. 14, n. 2, p. 43-46, 1998.
- MAINAR, R. C.; DE LA CRUZ, C.; ASENSIO, A.; DOMÍNGUEZ, L.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Prevalence of agglutinating antibodies to *Toxoplasma gondii* in small ruminants of the Madrid region, Spain, and identification of factors influencing seropositivity by multivariate analysis. **Veterinary Research Communications**, v. 20, n. 2, p. 163-169, 1996.
- MAINARDI, R. S.; MODOLO, J. R.; STACHISSINI, A. V. M.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 759-761, 2003.
- MALIK, M. A.; DEESEN, D. W.; CRUZ, A. Toxoplasmosis in sheep in northeastern United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 263-266, 1990.
- MARCA, M. C.; RAMOS, J. J.; LOSTE, A.; SÁEZ, T.; SANZ, M. C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 1-2, p. 99-103, 1996.
- MEHDI, N. A. Q.; KAZACOS, K. R.; CARLTON, W. W. Fatal disseminated toxoplasmosis in a goat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 1, p. 116-117, 1983.
- MEIRELES, L. R. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in food animals from São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 267-271, 2003.
- MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 639-641, 1998.
- MORGAN, U. M.; Detection and characterisation of parasite causing emerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1407-1421, 2000.
- MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOI, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M.; DA SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg Infectious Disease**, v. 12, n. 2, p. 326-329, 2006.
- NISHI, S. M.; KASAI, N.; GENNARI, S. M. Antibody levels in goats fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal for Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 445-447, 2001.
- OLIVEIRA, M. P. B.; GURGEL, A. E. B.; ALENCAR, E. J. M.; PENA, E. J. M.; MACHADO, E. H. L.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em caprinos da sub-região da zona da mata do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 4, n. 2, 1995. suplemento 1.
- OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. **Parasitology Today**, v. 13, p. 196-200, 1997.
- 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, 1994.

PENA, H. F. J. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceau, 1909) de gatos do estado de São Paulo**. 2004. 126 p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

PENA, H. F.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

REMINGTON J. S.; McLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON J. S.; KLEIN, J. O. (Ed.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 4ed., Philadelphia, W B Saunders, 1995. p. 140-267.

RIEMANN, H. P.; MEYER, M. G.; THEIS, J. H.; KELSO, G.; BEHYMER, D. E.; Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. **Journal Pediatric**, v. 87, p. 1728-1732, 1975

RODRIGUES, N.; LIMA, H.; RODRIGUES, A.; BREWSTER, S.; BARKER, D. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. **Parasitology**, v. 115, p. 349-358, 1997.

ROMANELLI, P. R. **Avaliação soroeepimiologica de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em ovinos do Município de Guarapuava- Paraná**. 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2002.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of American Medical Association**, v. 116. p. 801-807. 1941.

SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal American Medical Association**, v. 248, p. 1728-1732, 1982.

SANTOS, C. B. A.; CARVALHO, A. C. F. B.; RAGOZO, A. M. A., SOARES, R. M., AMAKU, M.; YAI, L. E. O., DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from fattening pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 207-211, 2005.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, 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, U. K: Oxford University Press, p. 55-74, 1995.

SILVA, A. V.; CUTOLO, A. A.; LANGONI, H. Comparação da reação de imunofluorescência indireta e do método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-Toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 1, p. 7-11, 2002.

SILVA, K. L. V.; RUE, M. L. de la Possibilidade de transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 892-897, 2006.

SILVA, A. V. **Toxoplasmose ovina: avaliação de métodos diretos na detecção do seu agente em cordeiros sorologicamente positivos, abatidos para consumo humano**. 1999. 161 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

SILVA, A. V.; DA CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R., GOTSCHALK, S.; MOTA, R. A.; LANGONI, H. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 115-119, 2003.

SILVA, A. V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 191-198, 2001.

- SILVA, A. V. ; MENDONÇA, A. O. ; PEZERICO, BERGAMASCHI, S.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 60, n. 1-2, p. 65-68, 2005.
- SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; DE LIMA, V.Y.; D'ARC MORETTI, L.; PINHEIRO, J.P.; TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n.1, p.23-27, 2005.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal Parasitology**, v.27, n.10, p.1135-1145, 1997.
- SKINNER, L. J; TIMPERLEY, A. C.; WIGHTMAN, D. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. Scandinavian. **Journal of Infections Diseases**, v. 22, p. 359-361, 1990.
- SOARES, R. M. Caracterização molecular do *Toxoplasma gondii* **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 17-19, 2004. suplemento 1.
- SOUSA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; COSTA, J. M. C.; DARDÉ, M. L.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 133-136, 2006.
- SREEKUMAR, C.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; LEHMANN, T.; RAMAN, M.; BHALERAO, D.P.; VIANNA, M.C.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. **Veterinary Parasitology**, v. 30, n.3-4, p. 187-194, 2003.
- STACHISSINI, A.V.M., **Influência da infecção pelo vírus da artrite-encefalitecaprina nos perfis sorológico-epidemiológicos em caprinos infectados pelo *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*** Botucatu, FMVZ, 2005, 119p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2005.
- SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a highresolution and simple method for identification of parasites. **International Journal Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841-848, 2006.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1268, 2000.
- UENO, T. E. H. **Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil 2005**. 107f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. JR.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 360-361, 2005.
- VAN DER PUIJE, W. N. A.; BOSOMPEM, K. M.; CANACOO, E. A.; WASTLING, J. M.; AKANMORI, B. D. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. **Acta Thropica**, v. 76, p. 2 1-26, 2000.
- VAUGHAN, L. Abortion in sheep. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 49, n. 3, p. 170-174, 1996.
- VITOR, R. W. A.; LIMA, PINTO, J. B.; CHIARI, C. A. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 147-154, 1991.
- WALSH, C. P.; HAMMOND, S. E.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in goat milk: potential source of human toxoplasmosis. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 73S-74S, 1999.
- WERRE, S. R.; JACOBSON, R.; BOWMAN, D.; DUBEY, J. P.; MOHAMMED, H. O. Evaluation of kinetics and single-read enzyme-linked immunoassays for detection of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 3, p. 225-330, 2002.
- WILLIAMS, J. G.; REITER, R. S.; YOUNG, R. M.; SCOLNIK, P. A. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. **Nucleic Acids Res**, v. 21, n. 11, p.2697-2702, 1993.

YAI, L. E. O.; RAGOZO, A. M. A.; PENA, H.F.J.; SOARES, R.M., DUBEY, J.P.; GENNARI, S. M. Caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2006, Ribeirão Preto. p. 306