VANESSA MURADIAN

Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP)

São Paulo

2009

VANESSA MURADIAN

Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental 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 Aplicada às Zoonoses

Orientadora:
Profª. Drª. Solange Maria Gennari

São Paulo

2009

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.2119
FMVZ

Muradian, Vanessa
Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP) / Vanessa Muradian. – São Paulo : V. Muradian, 2009.
109 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Toxoplasma gondii. 2. Neospora caninum*. 3. Roedores. 4. Caracterização molecular. 5. Genótipos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização biológica e molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* de roedores sinantrópicos urbanos e rurais do Estado de São Paulo", protocolo nº696/2005, utilizando 50 roedores capturados e 300 camundongos Swis, 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 referendun".

(We certify that the Research "Biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from urban and rural rodents from São Paulo State", protocol number 696/2005, utilizing 50 rats and 300 Swis, under the responsibility of Prof. Dr. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 30 de junho de 2005

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-270 - Cidade Universitária. "Armando de Salles Oliveira"
Fax: (011) 3032-2224 Fone: (011) 3091-7671 -3091-7676 e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MURADIAN, Vanessa

Título: Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental 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: _____

Dedicatória

À minha mãe Rita que certamente está
comemorando essa vitória comigo...
... e aos meus diversos outros amigos
"do lado de lá"

Agradecimentos

Á professora e amiga **Dra Solange Gennari**, pelo companheirismo e orientação em todos esses anos

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Soares** pelo auxílio em todas as etapas envolvendo as técnicas de biologia molecular

À **Dra Hilda F. Pena** pelos ensinamentos em técnicas de laboratório e pela realização da genotipagem do isolado de *T. gondii* desse estudo.

Aos funcionários **Pedro**, pelos cuidados com os camundongos do biotério e auxílio na captura dos roedores, **Renato**, pelo auxílio nos laboratórios e **Antonio (Tonhão)** também pela auxílio na captura dos roedores.

À **Sheila** e toda a "turma" do **LABMAS** (Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia Aplicada), VPS-FMVZ-USP, pelo acolhimento e auxílio quando da necessidade da utilização das instalações, equipamentos e materiais do laboratório.

A estagiária **Luciana Nunes de Oliveira** e a então residente **Leandra Ribeiro Ferreira**, pelo auxílio com a realização dos bioensaios, além da captura de roedores pela última.

As mestrandas **Estela G. Lopes** e **Mikaela R. Funada**, pelo ensinamento e auxílio na execução das técnicas de extração de DNA

Às mestrandas **Patrícia de O. Esmerini** e **Mikaela R. Funada** pelo auxílio com a realização das reações de *nested* PCR.

Aos médicos veterinários **Dr. Minekazu Matsuo**, **Dr. Bernardo J. Dicezare** e **Dra Edna Diniz Paula**, das SUVIS (Supervisão de Vigilância em Saúde) Santana-Tucuruvi, Butantã e Lapa-Pinheiros, respectivamente, subordinadas a Secretaria Municipal de Saúde (SMS), Prefeitura Municipal de São Paulo (PMSP), pelo auxílio com a captura dos roedores e a todos os funcionários envolvidos.

A **Zenaide**, **Gi** e toda a equipe de estagiários e pós-graduandos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas (VPS-FMVZ-USP) pelo encaminhamento dos roedores por eles recebidos

À mestranda **Juliana Martins**, pelo auxílio com a purificação das amostras de DNA

Ao funcionário **João** do VPS-Pirassununga pelo auxílio na realização final das técnicas de biologia molecular

A **todas as funcionárias da biblioteca da FMVZ-USP**, sempre dispostas a ajudar e tirar nossas dúvidas em localização de periódicos e redação da tese, em especial a **Elza**, **Fátima** e **Rosa** pela correção da tese e à **Claudia Pestana**, que mesmo de lá da biblioteca da Faculdade de Odontologia (USP) continua com a mesma disposição em me "socorrer" nas diversas dúvidas de última hora.

Aos secretários **Danival**, **Cristina**, **Virgínia** e **Tania**, por toda a disposição em nos atender

A todos os **funcionários**, **professores**, **pós-graduandos**, **estagiários** e **amigos** que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo financiamento da pesquisa e concessão da bolsa de doutorado

À todos os ratos e camundongos cujas vidas foram sacrificadas para a realização dessa pesquisa, sem sombra de dúvida os indivíduos mais importantes e que merecem meu agradecimento especial

O QUE EU SEI

Sei que o saber é bom,

porém custa

sei que o homem não vive para saber,

mas sabe para viver

sei que o homem não pode saber tudo,

mas pode saber alguma coisa

sei que o homem pode saber muita coisa

e ignorar o necessário

sei que o homem não é apreciado pelo o que sabe,

mas pelos benefícios que presta a humanidade

sei que há muitos néscios que vivem mais felizes

do que quem sabe

e sei que é um dever

procurar saber as coisas

Benvindo Alves, meu tio de coração

(Extraído do livro Variedades, publicado pelo autor aos 99 anos de idade)

RESUMO

MURADIAN, V. **Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP).** [Isolation, molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* and survey for *Neospora caninum* in urban rodents from Great São Paulo (SP)]. 2009. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Com o objetivo de identificar *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP) 217 roedores (quatro camundongos -*Mus musculus*, 20 ratazanas - *Rattus norvegicus* e 193 ratos de telhado - *Rattus rattus)* foram capturados entre abril de 2005 e fevereiro de 2008, para realização do diagnóstico biológico e molecular. Das 20 ratazanas (*Rattus norvegicus*) capturadas apenas uma foi positiva para *T. gondii* pelo bioensaio, correspondendo a 5% de positividade entre as ratazanas e 0,46% entre todos os roedores capturados. O isolado obtido dessa ratazana foi caracterizado como genótipo recombinante I, III e u-1 por PCR-RFLP, similar ao isolado previamente descrito e obtido de duas ovelhas e um gato, todos do Estado de São Paulo. Quatro amostras de roedores negativos ao bioensaio resultaram como positivas ao *T. gondii* pela *nested* PCR B1. Entretanto, quando submetidas à *nested* PCR ITS1 e à restrição enzimática (RFLP) não houve confirmação desse resultado em três delas. Em relação ao *N. caninum*, amostras de tecido cerebral e cardíaco de 121 roedores foram examinadas por *nested* PCR Nc5, tendo sido encontradas 12 amostras positivas, provenientes de 10 roedores. Quando submetidas à *nested* PCR ITS1 e à restrição enzimática (RFLP) *N. caninum* não foi confirmado em nenhuma das amostras. Este estudo conclui que a ocorrência de *T. gondii* e *N. caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP) é baixa, sugerindo que estes animais não possuem papel importante na cadeia epidemiológica como reservatórios desses agentes para predadores como os cães e gatos urbanos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii. Neospora caninum*. Roedores. Caracterização molecular. Genótipos.

ABSTRACT

MURADIAN, V. **Isolation, molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* and survey for *Neospora caninum* in urban rodents from Great São Paulo (SP)** [Isolamento e caracterização molecular e biológica de *Toxoplasma gondii* e pesquisa de *Neospora caninum* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP)] 2009. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In order to identify *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in urban rodents from the Great São Paulo (SP) 217 rodents (four *Mus musculus*, 20 *Rattus norvegicus* and 193 *Rattus rattus*) were captured between April 2005 and February 2008 to biological and molecular diagnosis. One out of the 20 *Rattus norvegicus* was considered positive by bioassay in mice, corresponding to a 5% positivity among *Rattus norvegicus* and a 0.46% positivity considering all captured rodents. The isolate from this rat was characterized as a recombinant I, III and u-1 genotype by RFLP-PCR. This characterization had been previously described from isolates obtained from two sheep and one cat also from São Paulo state. Four samples from rodents with negative results by bioassay were positive to *T. gondii* by *nested* PCR B1. However, when tested with *nested* PCR ITS1 and RFLP these results were not confirmed in three of these samples. Regarding *N. caninum*, brain and heart samples of 121 rodents were examined by *nested* PCR Nc5 and 12 samples from 10 rodents were positive. When tested with *nested* PCR ITS1 and RFLP all of these samples turned out to be negative. This study concludes that *T. gondii* and *N. caninum* have low occurrence in urban rodents in the Great São Paulo area, and they are not important as *T. gondii* and/or *N. caninum* reservoirs to predators like urban cats and dogs.

Keywords: *Toxoplasma gondii. Neospora caninum*. Rodents. Molecular characterization. Genotypes.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR B1 para identificação de *T. gondii* 58

Quadro 2 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR Nc5 para identificação de *N. caninum*..... 60

Quadro 3 - Informações referentes aos marcadores genéticos e endonucleases utilizados para genotipagem da amostra de *T. gondii* detectado em roedor da Grande São Paulo (SP)..... 62

Quadro 4 - Padrão das amostras clonais Tipos I, II e III e amostras atípicas para *T. gondii* utilizadas como controles positivos na PCR-RFLP para genotipagem do isolado de *T.gondii* do roedor da Grande São Paulo (SP)..... 63

Quadro 5 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR ITS1 para identificação de *T. gondii* e *N. caninum*..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade, espécie e região de origem dos roedores capturados nos municípios de São Paulo, Osasco, Guarulhos, Jandira e Carapicuíba. São Paulo - 2009..... 68

Tabela 2 - Quantidade, espécie e região de origem dos roedores capturados na Grande São Paulo cujos tecidos foram armazenados para diagnóstico por técnicas de biologia molecular. São Paulo - 2009..... 68

Tabela 3 - Quantidade e espécie dos roedores com resultado positivo para *T. gondii* ou *N. caninum* pelo bioensaio, *nested* PCR B1 ou *nested* PCR Nc5. São Paulo – 2009..... 69

Tabela 4 - Genótipo do isolado de *T. gondii* de *Rattus norvegicus* da Grande São Paulo (SP) e das demais amostras similares encontradas anteriormente. São Paulo - 2009..... 70

Tabela 5 - Resultados obtidos com as técnicas de biologia molecular utilizadas para detecção de *T. gondii* e *N. caninum* nos roedores capturados na Grande São Paulo (SP) de acordo com o n° da amostra, quantidade de alíquotas pesquisadas e espécie do roedor. São Paulo – 2009..... 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A e B Cistos de *T. gondii* em lâmina de tecido cerebral do camundongo inoculado com tecidos do rato 218..... 69

Figura 2 - Produtos de RFLP com as enzimas RsaI e TaqI. Note que as amostras estão duplicadas: a primeira coluna (à esquerda) representa a digestão com a enzima RsaI e a segunda coluna (à direita) representa a digestão com a enzima TaqI. A coluna B13 representa o padrão de bandas do controle positivo de *T. gondii*..... 70

Figura 3 - Produtos da *nested* PCR ITS1. A coluna 13 representa o padrão de bandas do controle positivo de *T. gondii.* A coluna 1 (à direita da foto) representa o padrão de bandas do controle positivo de *N. caninum*..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AP	Estado do Amapá
BA	Estado da Bahia
CDC	Center of Disease Control
CE	Estado do Ceará
cm	centímetros
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DNA	Desoxiribonucleic Acid
DT	Dye Test
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	e outros; e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	gramas
IHAT	Teste de Hemaglutinação Indireta
ITS	Internal Transcribed Spacer
Kg	quilogramas
Km	quilômetros
M	Molar
MAT	Modified Agglutination Test
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitros
mM	milimolar
mm^2	milímetro quadrado
MT	Estado do Mato Grosso
N	Normal
nm	nanômetros
PA	Estado do Pará
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction

PE	Estado do Pernambuco
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Pós inoculação
PMSP	Prefeitura Municipal de São Paulo
PR	Estado do Paraná
RFLP	restriction fragment length polymorphisms
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RS	Estado do Rio Grande do Sul
SAC	Serviço de Atendimento ao Cidadão
SAG	Surface Antigen
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
seg	segundo
SP	Estado de São Paulo
SUVIS	Supervisão de Vigilância em Saúde
U	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
μL	microlitros
μg	microgramas
μm	micrometro
<	menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO DE LITERATURA 24

2.1 *TOXOPLASMA GONDII* 24

2.1.1 Ciclo de vida e modo de transmissão 24

2.1.2 Comportamento de caça dos gatos 25

2.1.3 Aspectos epidemiológicos 27

2.1.3.1 Toxoplasmose em seres humanos 27

2.1.3.2 Infecção por *T. gondii* nos gatos 29

2.1.3.3 Infecção por *T. gondii* em roedores 30

2.1.4 Diagnóstico 34

2.1.4.1 Identificação molecular – PCR direcionada ao gene B1 36

2.1.4.2 Caracterização molecular 37

2.2 *NEOSPORA CANINUM* 39

2.2.1 Ciclo de vida 39

2.2.2 Aspectos epidemiológicos 40

2.2.2.1 Perdas causadas pelo *N. caninum* em animais de produção 40

2.2.2.2 *N. caninum* em roedores 41

2.2.3 Diagnóstico molecular 42

2.3 CO-INFECÇÃO *TOXOPLASMA GONDII* E *NEOSPORA CANINUM* 43

2.4 ROEDORES 44

2.4.1 Ratazana – *Rattus norvegicus* 46

2.4.2 Rato de telhado – *Rattus rattus* 46

2.4.3 Camundongo – *Mus musculus* 47

3 OBJETIVOS 50

4 MATERIAL E MÉTODOS 52

4.1 CAPTURA E EUTANÁSIA DOS ROEDORES 52

4.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS 52

4.2.1 Digestão péptica dos tecidos 53

4.2.2 Pesquisa de *T. gondii* nos tecidos dos camundongos 54

4..2.3 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* 54

4.3 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA 55

4.4 ESPECTROFOTOMETRIA 57

4.5 *NESTED* PCR B1 - *TOXOPLASMA GONDII* 58

4.6 *NESTED* PCR Nc5 - *NEOSPORA CANINUM*..... 60
4.7 GENOTIPAGEM DO ISOLADO DE *T. GONDII*..... 61
4.8 *NESTED* PCR-ITS1 E RFLP PARA *T. GONDII* / *N. CANINUM* 64
4.8.1 Amplificação pela *nested* PCR ITS1..... 64
4.8.2 Restrição enzimática – RFLP..... 66
5 RESULTADOS 68
6 DISCUSSÃO..... 74
6.1 *TOXOPLASMA GONDII*..... 74
6.2 *NEOSPORA CANINUM*..... 76
7 CONCLUSÕES..... 81
8 REFERÊNCIAS 83
ANEXO A 103
ANEXO B 107

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose parasitária de distribuição cosmopolita causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, que pode infectar o homem e animais de sangue quente. Os felídeos são os hospedeiros definitivos e únicos animais onde ocorre o estágio sexual do parasita (TENTER, 1999).

De maneira geral, os gatos domésticos domiciliados são infectados pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de carne crua ou mal cozida, e gatos semi-domiciliados ou selvagens pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de pequenas presas, como roedores e pássaros. Outros animais podem se infectar pela ingestão de água e alimentos contaminados com fezes de gatos contendo oocistos ou pela ingestão de cistos em tecidos de animais infectados (LUCAS et al., 1999).

Modelos experimentais de toxoplasmose têm sido desenvolvidos em animais de laboratório para estudar variados aspectos dessa enfermidade. Como observado com outras doenças parasitárias, a patologia da infecção pelo *T. gondii* resulta da interação entre fatores parasitários e do hospedeiro. Isto reforça as dificuldades em comparar os dados, algumas vezes discordantes, obtidos por diversos laboratórios, uma vez que geralmente os modelos experimentais variam em muitos aspectos: a linhagem do animal, a cepa do *T. gondii* utilizada, as condições de manutenção e o número de passagens do parasita (ZENNER et al., 1998).

Os camundongos são extremamente susceptíveis à infecção por *T. gondii,* portanto, são muito utilizados para isolamento e caracterização do parasita (INNES, 1997). Camundongos, ratos e pequenos pássaros parecem ser as presas mais importantes para os gatos domésticos, por viverem próximos às residências facilitando o estabelecimento da relação presa-predador (RUIZ; FRENKEL, 1980). Os roedores se infectam ao ingerirem oocistos esporulados presentes na água ou em alimentos contaminados. Cistos teciduais desenvolvem-se em seu organismo, tornando-os reservatório para os seus predadores (felinos), principalmente os pequenos roedores, como os camundongos e os ratos domésticos (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Oocistos de *T. gondii* possuem papel importante na transmissão da infecção para os roedores bem como para os seres humanos, por serem resistentes ao tratamento de água comum com cloração e decantação (DUBEY; BEATTIE 1988). Pelo fato da detecção desses oocistos na água e no solo ser difícil de ser realizada (ISAAC-RENTON et al., 1998) animais de vida livre, como os ratos e camundongos, poderiam ser utilizados como sentinelas ambientais para o *T. gondii* em áreas urbanas densamente povoadas, já que eles são expostos, sem nenhuma proteção, a todas as formas infectantes do parasita (MEIRELES et al., 2004).

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, reconhecido como nova espécie e gênero em 1988 tendo sido, certamente, confundido com *T. gondii* até então (DUBEY et al., 1988). Desde sua descoberta em 1984 em cães da Noruega (BJERKAS et al., 1984) e sua descrição como novo gênero e espécie por Dubey et al. (1988) a neosporose tem se mostrado uma séria doença em bovinos e cães pelo mundo inteiro (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). O agente já foi detectado em bovinos, ovinos, canídeos, bubalinos, caprinos e animais selvagens como veados, rinocerontes, guaxinis, macacos e outros (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007).

Atualmente existe muita especulação sobre qual papel os animais silvestres podem ter como reservatórios à infecção pelo *N. caninum* (GONDIM, 2006). Descobertas recentes indicam que pequenos mamíferos como camundongos (*Mus domesticus* e *Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) podem atuar como hospedeiros intermediários naturais (HUANG et al., 2004; HUGHES et al., 2006; JENKINS et al., 2007; FERROGLIO et al., 2007; BARRATT et al., 2008).

Sabendo-se que os roedores urbanos podem estar envolvidos na epidemiologia do *T. gondii* e do *N. caninum* e pela falta de informações sobre a ocorrência desse agente nesses animais em nosso meio, o presente trabalho teve como objetivos determinar a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em roedores urbanos da Grande São Paulo pelo isolamento do agente em camundongos e caracterização biológica e molecular dos isolados, além da detecção de *N. caninum* nos tecidos desses animais por técnicas de biologia molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *TOXOPLASMA GONDII*

2.1.1 Ciclo de vida e modo de transmissão

Um hospedeiro susceptível pode se infectar pelo *T. gondii* de três formas distintas: (1) ingerindo oocistos contendo esporozoítos em seu interior; (2) entrando em contato com taquizoítos eliminados na urina, leite, esperma; (3) ingerindo taquizoítos ou cistos contendo bradizoítos na carne crua ou mal passada. A fase inicial de infecção – fase proliferativa – caracteriza a fase aguda da doença. Neste ponto, a evolução poderá ir até a morte do hospedeiro, o que poderá ocorrer em fetos e indivíduos com comprometimento imunológico, ou diminuir e cessar pelo surgimento de anticorpos específicos. Com o aparecimento da imunidade, os parasitas extracelulares desaparecem do sangue, linfa e dos órgãos viscerais, havendo diminuição da multiplicação intracelular (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; FRENKEL, 1974; DUBEY; BEATTIE, 1988; KAWAZOE, 1995). Os taquizoítos resistentes desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoítos, que formarão cistos principalmente no cérebro e na musculatura esquelética e cardíaca (DUBEY, 1998a). Esta fase cística, juntamente com a diminuição da sintomatologia, constituem a fase crônica da doença, que pode permanecer por longos períodos ou, por mecanismos ainda não esclarecidos inteiramente (diminuição da imunidade ou alterações hormonais) poderá haver reagudização, com sintomatologia semelhante à primoinfecção (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; FRENKEL, 1976; DUBEY; BEATTIE, 1988).

A fase sexuada ocorre somente nas células epiteliais do intestino delgado dos gatos domésticos e de outros felídeos que são, por isso, considerados hospedeiros definitivos (DUBEY; BEATTIE, 1988). A ingestão de cistos teciduais leva à liberação de bradizoítos que darão início ao ciclo enteroepitelial com a produção de oocistos não-esporulados no intestino delgado; outros bradizoítos podem iniciar o desenvolvimento como taquizoítos em diversas células do organismo, produzindo infecções crônicas. Essa é a via de transmissão mais comum, ocorrendo principalmente quando os filhotes de gatos começam a caçar pássaros e pequenos mamíferos ou ingerem carcaças trazidas por suas mães (CHILDS, 1986; DUBEY; BEATTIE, 1988).

O período de patência dura de uma a três semanas e um único gato pode excretar milhões de oocistos, geralmente sem apresentar sinais clínicos da doença (DUBEY;

FRENKEL, 1972). Após a infecção um gato pode produzir mais que cem milhões de oocistos em suas fezes, que podem permanecer viáveis no ambiente por mais de um ano (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Todos os sexos, idades e raças de gatos domésticos são susceptíveis à infecção (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977), e aqueles com menos de um ano de idade produzem o maior número de oocistos; animais adultos não-infectados também eliminam oocistos ao ingerirem cistos, mas a excreção é menor e por um período mais curto (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977; DUBEY; BEATTIE, 1988; LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 1997). A excreção de oocistos pelos gatos depende, dentre outras coisas, da forma como eles foram infectados. Menos de 50% dos gatos eliminam oocistos após a ingestão de taquizoítos ou oocistos enquanto que virtualmente todos os gatos eliminam oocistos após ingerirem cistos teciduais (DUBEY; FRENKEL, 1976).

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

2.1.2 Comportamento de caça dos gatos

O gato doméstico, *Felis catus*, é um membro da ordem Carnivora, que inclui muitas espécies de animais especializadas em carnivorismo. Entretanto, essa especialização não é regra para a maioria dos membros dessa ordem, pois a mesma engloba animais onívoros e até herbívoros, como os pandas por exemplo (BRADSHAW, 2006).

O gato doméstico tem sua origem no gato selvagem do norte da África, *Felis silvestris lybica* (SERPELL, 1988), um predador extremamente especializado nas técnicas de caça. Como os gatos foram domesticados há relativamente pouco tempo (quando comparado à domesticação dos cães) houve menores modificações em seus hábitos quando comparados aos seus ancestrais selvagens (BRADSHAW, 2006).

O fato dos gatos descenderem de um predador especializado pode ser visto em sua dentição, dominada por grandes caninos (utilizados para quebrar as vértebras dos pescoços de pequenos mamíferos utilizados como presas) e dentes carniceiros desenvolvidos (para separar

a carne dos ossos); os incisivos e molares são relativamente pequenos (VAN VALKENBURGH, 1989).

Os gatos são caçadores solitários e costumam caçar presas com peso corpóreo muito menor que os deles próprios, necessitando ingerir diversas caças por dia. Isso se reflete no comportamento *ad libitum* dos gatos domésticos, que se alimentam em pequenas porções, várias vezes ao longo do dia (BRADSHAW; THORNE, 1992).

Na natureza, os gatos concentram-se em caçar o que eles conseguem pegar e não necessariamente aquilo que gostam de comer (BRADSHAW, 2006). É possível que haja base genética para a especialização de alguns gatos em caçar pássaros e outros por escolherem pequenos mamíferos (TURNER; MEISTER, 1988). Os gatos que vivem em associação com os seres humanos costumam ter maior variabilidade de alimentos disponíveis quando comparados aos seus ancestrais, que dependiam exclusivamente da caça (BRADSHAW, 2006). Dessa forma, gatos domiciliados bem alimentados continuam com o comportamento de caça por prazer ou por instinto, e não mais por necessidade nutricional.

A prevalência da infecção por *T. gondii* nas populações de gatos irá depender em parte da disponibilidade e do contato com presas infectadas. Nas áreas urbanas os roedores, em especial os camundongos, são considerados as principais presas para os gatos domésticos e, em propriedades infestadas, o camundongo pode agir como um importante reservatório para *T. gondii* (MURPHY et al., 2008).

Pequenos roedores possuem um papel importante no ciclo de vida do *T. gondii,* pois acredita-se que eles representam a principal fonte de infecção para os gatos domésticos ou selvagens (DABRITZ et al., 2008). Estudos sobre comportamento predatório de gatos em vida livre sugerem que os roedores compreendem cerca de dois terços da presa consumida, embora esse dado possa variar de acordo com a época do ano, abundância de roedores e disponibilidade de outras caças (HUBBS, 1951; EBERHARD, 1954; MOLSHER; NEWSOME; DICKMAN, 1999).

Gatos de rua em áreas urbanas costumam ingerir alimentos encontrados no lixo doméstico, frequentemente restos de alimentos preparados para consumo humano, embora possa haver caça ocasional. As únicas presas disponíveis aos gatos urbanos são pequenos pássaros, como pequenas espécies de pombos e pardais, ou roedores provenientes do sistema de esgotos, apesar de que um deles, a ratazana (*Rattus norvegicus*), pode ser considerada uma presa difícil de ser consumida por gatos, devido a sua força e tamanho (MEIRELES et al., 2004).

Uma outra forma de infecção para os gatos é a ingestão de oocistos de *T. gondii* em água contaminada. Essa via de transmissão está facilmente disponível em áreas urbanas densamente povoadas através da água da chuva ou da água utilizada para lavagem de garagens, calçadas e quintais que possam estar contaminados com oocistos em fezes de gatos que, dessa forma, são lavados para as ruas e sistemas de esgotos (MEIRELES et al., 2004).

Vivendo no mesmo ambiente, gatos e roedores são expostos de maneira similar a infecção por *T. gondii*, apesar de suas diferenças de comportamento em relação à higiene. Os roedores urbanos também consomem restos de comida encontrados no lixo doméstico e também podem ter contato com os oocistos presentes no ambiente (MEIRELES et al., 2004). Dessa forma, a taxa de infecção por *T. gondii* em roedores pode ser um indicador epidemiológico importante relacionado à transmissão do parasita aos gatos. O grau de infecção por *T. gondii* em gatos e roedores no município de São Paulo, onde a estimativa de propriedades infestadas por roedores é considerado alto (SANTOS et al., 2006) pode, portanto, ser utilizado como uma medida indireta da contaminação ambiental, auxiliando no entendimento da epidemiologia da toxoplasmose na região (GUIMARÃES et al.,1993)

2.1.3 Aspectos epidemiológicos

2.1.3.1 Toxoplasmose em seres humanos

Nos EUA, pela análise dos dados de sistemas nacionais de notificação em saúde e dados publicados em periódicos especializados, estimam-se um milhão e quinhentas mil infecções anuais por *T. gondii*, sendo cerca de 15% assintomáticas. Neste país, entre 1992 e 1996, a toxoplasmose foi responsável por cerca de 5.000 hospitalizações, com pelo menos 2.500 casos de origem alimentar, representando 4,1% das internações causadas por infecções alimentares. No mesmo período foram registrados 750 óbitos por toxoplasmose, com cerca de 50% de infecções adquiridas pelo consumo de alimentos contaminados, o que representa 20,7% das mortes associadas às infecções de origem alimentar (MEAD et al, 1999).

A maioria das infecções por *T. gondii* em seres humanos é assintomática mas há casos em que o parasita pode produzir uma doença devastadora. As infecções podem ser congênitas ou adquiridas pós natal, sendo que as infecções congênitas ocorrem apenas quando a mulher

se infecta durante a gravidez. Os efeitos das infecções nos fetos podem ir desde a diminuição da acuidade visual até completa perda da visão, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral (DESMONTS; COUVREUR, 1974; REMINGTON et al., 2001).

O impacto socioeconômico da toxoplasmose em seres humanos, além das seqüelas deixadas pela doença, se dá nos custos com os cuidados com as crianças doentes, em especial àquelas que nascem com retardo mental e cegueira (ROBERTS; FRENKEL, 1990; ROBERTS; MURREL; MARKS, 1994). Por conta disso, o exame para *T. gondii* em todas as mulheres grávidas é compulsório em alguns países europeus, incluindo a França e a Áustria. A relação custo-benefício de tal procedimento está sendo discutida em outros países (REMINGTON et al., 2001).

A toxoplasmose é uma das causas mais importantes de morte em pacientes com AIDS. Estima-se que aproximadamente 10% dos pacientes com AIDS nos EUA e cerca de 30% na Europa morrem por toxoplasmose (RENOLD et al., 1992).

Hábitos culturais podem interferir nas taxas de infecção de seres humanos por *T. gondii* (COOK et al., 2000). Na França, por exemplo, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* é muito alta em seres humanos: enquanto 84% das mulheres grávidas em Paris possuem anticorpos anti-*T. gondii* isso ocorre em apenas 32% na cidade de Nova Iorque e 22% em Londres (DUBEY; BEATTIE, 1988). A alta ocorrência de infecção por *T. gondii* em humanos na França parece estar relacionada, em parte, ao hábito francês de ingerir alimentos cárneos mal cozidos ou crus. Por outro lado a prevalência de *T. gondii* na América Central e do Sul ocorre provavelmente por causa dos altos níveis de contaminação do ambiente por oocistos (DUBEY; BEATTIE, 1988; GLASNER et al., 1992; NETO et al., 2000). De qualquer forma, é difícil determinar se uma infecção pelo *T. gondii* ocorreu pela ingestão de carne crua contendo cistos ou por alimento e água contaminados com oocistos eliminados nas fezes de gatos, não existindo testes até o momento para determinar a forma como tal infecção possa ter ocorrido (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Em algumas regiões do Brasil, anticorpos anti-*T. gondii* foram detectados em 60% de crianças entre seis e oito anos de idade, o que foi associado à ingestão de oocistos em um ambiente altamente contaminado (BAHIA-OLIVEIRA et al.,2001).

Em comunidades indígenas brasileiras a prevalência da infecção por *T. gondii* variou entre 39 e 100% (BARUZZI, 1970; LESER; CAMARGO; BARUZZI, 1977; LOVELACE; MORAES; HAGERBY, 1978; FERRARONI; LACAZ, 1982; SOBRAL et al., 2005).

Em um estudo conduzido em diferentes tribos indígenas dos estados do Pará, Amapá e Mato Grosso foram encontradas soroprevalências nos índios de 57.3% (PA), 57.7% (AP) e

78.8% (MT). Os autores sugerem que as diferenças na positividade entre as tribos podem ter ocorrido pelo contato com solo contaminado por oocistos eliminados por felinos selvagens ou pelo variações no consumo de carne de caça infectada (SOBRAL et al.,2005).

Estudos realizados em gestantes de diversos estados brasileiros têm mostrado variações na soropositividade para *T. gondii*, como 42% em Salvador (BA) (MOREIRA, 1988), 71,5% em Fortaleza (CE) (REY; RAMALHO, 1999), 73% em Belém (PA) (OLIVEIRA, 2002), 59,8% em Porto Alegre (RS) (VARELLA et al., 2003) e 74,7% em Recife (PE) (PORTO et al., 2008). No estado de São Paulo a soropositividade encontrada, também em gestantes, variou entre 58% e 67,4% na capital (VAZ et al., 1990; PEDREIRA,1995), 55,2% em Bragança Paulista (BRISIGHELLI NETO, 1998), 60,4% em Campinas (SP) (STELLA, 2004). Esses trabalhos também consideram como fatores associados à infecção por *T. gondii* os hábitos alimentares das gestantes e o contato com solo contaminado com oocistos eliminados em fezes de gatos.

2.1.3.2 Infecção por *T. gondii* nos gatos

A transmissão do *T. gondii* para os gatos através da ingestão de oocistos parece ser menos infectante do que pela ingestão de cistos teciduais (DUBEY, 2006), sendo que a predação é considerada a maior causa de infecção em populações de gatos que têm acesso às ruas (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Os gatos são predadores oportunísticos que podem rapidamente adaptar sua dieta às presas disponíveis em seu ambiente (TURNER; BATTESON, 2000). As diferenças de prevalência entre os gatos domiciliados e os semi ou não domiciliados está estreitamente relacionada aos níveis dietéticos de sua caça (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000), ou seja, nos gatos com acesso à predação, os níveis de infecção devem depender, conseqüentemente, dos níveis de infecção por *T. gondii* em suas presas (TURNER; BATTESON, 2000) .

Segundo Hill; Chirukandoth; Dubey (2005) as taxas de infecção por *T. gondii* em gatos podem ser determinadas pelas taxas de infecção da população local de pássaros e/ou roedores, pelo fato dos gatos poderem se infectar ingerindo esses animais. Quanto maior a quantidade de oocistos em um ambiente mais provável a infecção das espécies animais consumidas como presa e isso, conseqüentemente, aumentaria a taxa de infecção dos gatos.

Tenter; Heckeroth; Weiss (2000) reuniram estudos sobre prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos em 12 países ao redor do mundo entre 1990 e 2000. Observaram que a soroprevalência variou entre seis e 71% em gatos domiciliados e entre 13 e 73% em gatos de rua.

O diagnóstico da presença de *T. gondii* nos gatos pode ser complicado, pois a infecção por esse agente nessa espécie animal costuma ser assintomática e, mesmo quando há sinais clínicos (como febre, sinais neurológicos, uveíte anterior e perda de peso), estes podem se confundir com os provocados por outras doenças (MONTOYA et al., 2009).

Os métodos padrões para diagnóstico da infecção pelo *T. gondii* em gatos são baseados no sorodiagnóstico e coprodiagnóstico, entretanto, os resultados produzidos por essas técnicas são frequentemente difíceis de serem interpretados (DUBEY, 1973). A detecção de oocistos em fezes de gatos em um dado momento costuma ser baixa, dificultando o diagnóstico coprológico. Já os testes sorológicos podem certamente detectar anticorpos, mas os títulos não correspondem à severidade da doença. Além disso, os anticorpos podem persistir em níveis elevados por anos após a primoinfecção (LAPPIN; BUSH; REDUKER, 1994; DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

2.1.3.3 Infecção por *T. gondii* em roedores

Assim como os humanos, os roedores servem como hospedeiros intermediários para o *T. gondii.* Os roedores se infectam, em geral, após ingestão de solo, vegetação ou água contaminada com oocistos (DABRITZ et al., 2008).

Infecções assintomáticas por *T. gondii* são amplamente prevalentes em pequenos mamíferos, incluindo ratos (DUBEY; FRENKEL, 1998), várias espécies de camundongos (DUBEY; BEATTIE, 1988; BRILLHART et al., 1994; SMITH; FRENKEL, 1995) e coelhos (COX; EDMONDS. SHEPHERD, 1981; DUBEY e BEATTIE, 1988; DUBEY et al., 1992), mas a ocorrência de toxoplasmose clínica nesses animais é relativamente rara (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

A ocorrência de toxoplasmose em ratos e seres humanos é similar quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos e transmissão transplacentária. Infecção em ratos pode ser utilizada como modelo para doença em humanos, em relação a patogenia, tratamento e imunoprofilaxia (SMITH, 1997; DUBEY; FRENKEL, 1998).

Os ratos são considerados um dos hospedeiros mais resistentes ao *T. gondii* em relação a manifestação da toxoplasmose clínica. Fatores importantes de variações no comportamento do *T. gondii* nesse modelo experimental são a cepa utilizada, o estágio infectante do parasita e a rota de inoculação utilizada (DUBEY; FRENKEL, 1998).

Como ocorre em outros hospedeiros os ratos também se infectam pela ingestão de cistos de *T. gondii*. Infecções induzidas pela ingestão de cistos teciduais são geralmente subclínicas em ratos imunocompetentes (DUBEY; FRENKEL, 1998).

Existem roedores que sobrevivem a infecção em aparente boa saúde com títulos de anticorpos anti-*T. gondii* de 1:64. Entretanto, é provável que alguns camundongos fiquem doentes em conseqüência de uma infecção primária e, por isso, sejam presas fáceis aos gatos e seus filhotes (RUIZ; FRENKEL, 1980). Ratos adultos não costumam adoecer por toxoplasmose enquanto que ratos jovens podem morrer pela doença. Ainda não se sabe sobre variações genéticas na susceptibilidade clínica à toxoplasmose em mamíferos superiores incluindo os seres humanos (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Em um estudo de campo, em sete camundongos soronegativos, cinco tinham parasitas viáveis em seus tecidos (DUBEY et al, 1995). Em outro estudo utilizando 16 ratos infectados congenitamente, todos soronegativos, cinco possuíam parasitas viáveis em seus tecidos (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977). Aparentemente algumas espécies de roedores infectados podem desenvolver tolerância imunológica ao *T. gondii* (DeFEO et al, 2002). Anteriormente, alguns autores já haviam chamado atenção ao fato dos ratos poderem ser resistentes à infecção por *T. gondii* dependendo da idade (CHAMPS et al., 1998), inclusive sendo considerados um dos hospedeiros mais resistentes a esse agente (DUBEY, 1996).

Dubey e Frenkel (1998) concluíram que ratos infectados congenitamente podem portar formas viáveis de *T. gondii* na ausência de anticorpos detectáveis em seu soro e que ratos com títulos baixos podem portar poucas ou nenhuma forma do parasita. Concluíram também que nenhum teste sorológico disponível é adequado para avaliar infecção latente por *T. gondii* em ratos e que o isolamento de formas viáveis de *T. gondii* por bioensaio em camundongos é o único método confiável para determinar a persistência de uma infecção crônica de *T. gondii* em roedores de vida livre.

Silva e Langoni (2005) avaliaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* em ratos inoculados experimentalmente e detectaram soroconversão em todos eles. Entretanto, os ratos utilizados nesse experimento eram jovens (cerca de 30 dias de vida) e o título anti-*T. gondii* caiu ao longo das 12 semanas pesquisadas, chegando a zero em alguns grupos após a oitava

semana pós inoculação (PI), mostrando que realmente roedores infectados por *T. gondii* podem não ter anticorpos detectáveis em seu sangue.

Na Costa Rica, Ruiz e Frenkel (1980) examinaram 120 ratazanas (*Rattus norvegicus*) e 202 camundongos (*Mus musculus*), isolando *T. gondii* de 15 (12,5%) e sete (3,5%), respectivamente. Um desses sete camundongos era soronegativo. Anteriormente, no mesmo país, Chinchilla (1978) havia observado anticorpos anti-*T. gondii* em 5% de 100 camundongos (*Mus musculus)* e 30,4% de 23 ratos (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus)* examinados. O parasita foi isolado de dois camundongos.

Na Arábia Saudita, Morsy et al. (1994) examinaram roedores utilizando o Teste de Hemaglutinação Indireta e encontraram soropositividade de 12,5% em *Mus musculus* e 41,7% em *Rattus norvegicus*.

Smith e Frenkel (1995) encontraram cerca de 3% de prevalência de anticorpos em roedores examinados entre 1974 e 1987 em Missouri e Kansas (EUA). Os roedores examinados eram das seguintes espécies: *Mus musculus*, *Peromyscus* spp., *Rattus norvegicus* e *Sigmodon hispidus*. Na Florida, Burridge et al. (1979) encontraram prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* de 13% em *Rattus rattus* e 25% em *Rattus norvegicus*, através do teste de hemaglutinação indireta. Também nos EUA (Maryland), Childs e Seegar (1986) examinaram 109 *Rattus norvegicus* e encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em 49,5% deles. Notaram também taxas de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* fortemente relacionadas à idade, com maiores taxas associadas a animais mais velhos.

DeFeo et al (2002) examinaram 756 pequenos roedores silvestres capturados em Rhode Island (EUA) e encontraram 0,8% de soropositividade, não sendo realizado bioensaio para isolamento. Essa baixa taxa de soroprevalência entre os roedores pode ser atribuída a propriedades biológicas do *T. gondii* a algumas espécies de roedores, que podem ser soronegativos mesmo estando infectados.

Freyre et al. (2003) encontraram uma taxa de transmissão transplacentária de *T. gondii* em ratos de laboratório de 51%, variando de 10 a 80% dependendo da cepa utilizada. Observaram que as cepas mais patogênicas aos camundongos foram transmitidas por via transplacentária com mais freqüência que as cepas de patogenicidade intermediária ou baixa.

Dubey et al. (2006) examinaram 238 ratazanas (*Rattus norvegicus*) capturadas em Granada (Caribe), encontrando dois (0,8%) animais soropositivos através do MAT (diluição ≥ 1:40). Desses, foi possível isolar *T. gondii* do cérebro e coração de apenas um roedor, com título 320, através do bioensaio. Todos os camundongos inoculados com os órgãos desse roedor permaneceram assintomáticos, apesar de terem cistos teciduais em seus cérebros, e os

autores concluíram que essa espécie de roedor não era importante na história natural da toxoplasmose naquela região.

Marshall et al. (2004) examinaram 200 camundongos capturados em 27 propriedades residenciais na região de Manchester, Reino Unido, em busca de DNA de *T. gondii* por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e testes sorológicos. Houve grandes diferenças entre os dois testes utilizados. Por PCR, 59% dos camundongos pesquisados continham DNA de *T. gondii*, sendo considerados como infectados. Já os testes sorológicos foram realizados em 190 dos 200 camundongos e apenas dois (1,0%) testaram positivo para a infecção (MURPHY et al., 2008). Evidências de transmissão vertical foi encontrada nas fêmeas de camundongos capturadas. Dezesseis fêmeas estavam grávidas e dessas, 12 testaram positivas para *T. gondii*. Dos 78 fetos testados dessas fêmeas grávidas 63 (74,6%) testaram positivos para *T. gondii*. Todas as fêmeas testadas haviam transmitido a infecção para pelo menos um dos seus fetos (MARSHALL et al, 2004; MURPHY et al., 2008).

Considera-se que os camundongos se infectam pelo *T. gondii* após exposição aos oocistos no meio ambiente. Dessa forma, seriam esperadas taxas de infecção maiores em animais mais velhos, já que estes teriam maiores oportunidades, ao longo do tempo, de se infectarem ao ingerir oocistos, quando comparados aos roedores mais jovens. Nesses estudos (MARSHALL et al, 2004; MURPHY et al., 2008), camundongos mais jovens tiveram a maior taxa de infecção (61% nos mais jovens, contra 55% nos adolescentes e 53% nos adultos) sugerindo que a exposição aos oocistos infectantes no ambiente não foi a principal ou a única fonte de infecção naqueles camundongos (MURPHY et al., 2008).

Em outro estudo também realizado no Reino Unido, pesquisando 235 *Rattus norvegicus* capturados em fazendas a prevalência média de *T. gondii* encontrada foi de 35%. Uma colônia foi formada a partir de cinco ratos (dois machos e três fêmeas), capturados em uma dessas fazendas, e mantida por dois anos e meio num ambiente externo controlado sem a presença de gatos ou qualquer outro mamífero. Após esse período a prevalência de *T. gondii* encontrada nessa população controlada foi de 44% (n=45). Não houve diferença significativa entre a prevalência encontrada nas populações de vida livre e na população controlada. O autor sugere que, primeiro, *T. gondii* pode ser perpetuado em populações de ratos de vida livre sem a presença de gatos e, segundo, a rota predominante de transmissão de *T. gondii* em ratos de vida livre é a rota congênita. Este estudo concluiu que ratos de vida livre representam um significante e persistente reservatório na natureza para toxoplasmose (WEBSTER, 1994).

Diversos autores consideraram que a transmissão vertical é um importante mecanismo de infecção por *T. gondii* em camundongos e outros pequenos roedores (THEIRMANN 1957;

BEVERLEY, 1959; REMINGTON; JACOBS; MELTON, 1961; DeROEVER-BONNET, 1969; OWEN; TREES, 1998; MARSHAL et al., 2004). Conseqüentemente, os níveis das infecções por *T. gondii* podem teoricamente ser mantidos em áreas urbanas pela infestação por roedores, mesmo na ausência da eliminação constante de oocistos por gatos (MURPHY et al., 2008).

No Brasil, um estudo recente analisou 181 ratos (*Rattus rattus*) capturados em depósitos de materiais reciclados em Londrina (PR), utilizando fígado e cérebro desses animais para bioensaio em camundongos. Nove ratos foram considerados positivos, o que representou 5% do total de animais pesquisados (RUFFOLO et al., 2008).

Estudos experimentais têm documentado modificações comportamentais de roedores infectados pelo *T. gondii* que os tornam mais susceptíveis à predação (HUTCHISON et al., 1980; BERDOY; WEBSTER; MACDONALD, 1995; VYAS et al., 2007). Camundongos infectados passam mais tempo se movimentando em locais conhecidos por eles e são menos reativos a estímulos novos do que os controles não infectados (HUTCHISON et al., 1980). Por outro lado, ratos infectados pelo *T. gondii* se aproximam de novos estímulos mais rapidamente, exibem maior atividade física e perdem sua aversão ao cheiro da urina de gato (BERDOY; WEBSTER; MACDONALD, 1995; VYAS et al., 2007). Roedores infectados pelo *T. gondii* podem, dessa maneira, ser mais facilmente capturados pelos gatos quando comparados a roedores não infectados e, dessa forma, eles seriam mais difíceis de ser encontrados em ambientes com grande presença de gatos.

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose é realizado por métodos biológicos, moleculares, sorológicos, histológicos ou por combinações destes. Os sinais clínicos da toxoplasmose não são específicos e não são suficientes para um diagnóstico definitivo, sendo frequentemente confundidos com sinais de diversas outras doenças infecciosas (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Diferentes testes diagnósticos são usados nos levantamentos sorológicos de *T. gondii* nas diferentes espécies animais: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Teste de Aglutinação Direta (DAT), Teste de Hemaglutinação Indireta (IHAT), Teste de Aglutinação em Látex (LAT); Teste de Aglutinação Modificado (MAT), ELISA (*Enzyme-linked*

Immunosorbent Assay) e Sabin-Feldman "dye test" (DT) (DUBEY; THULLIEZ, 1989; DUBEY; LAPPIN; THULLIEZ, 1995).

Cistos tissulares viáveis, particularmente no cérebro de hospedeiros intermediários, têm sido detectados mesmo após o título de anticorpos ter diminuído, ou até desaparecido. Isso pode explicar porque a utilização de um teste sorológico como única técnica diagnóstica pode subestimar os níveis de toxoplasmose latente, como resultado da ausência dessa resposta humoral (REMINGTON; KRAHENBUHL, 1982).

Nos últimos anos estudos têm sido conduzidos com maior freqüência objetivando o diagnóstico da infecção por *T. gondii* através de técnicas moleculares, como a PCR. Essa técnica tem se mostrado ser específica para *T. gondii* sem reação cruzada com outros parasitas (WILLIAMS et al., 2005b).

Em humanos, a infecção também têm sido diagnosticada pela utilização de *nested* PCR com *primers* estágio específicos. Esse diagnóstico tem sido realizado em fluido cerebroespinhal de pacientes com AIDS com suspeita de encefalite toxoplásmica (CONTINI et al., 2002; JOSEPH et al., 2002), em pacientes imunocomprometidos por processo de transplante de órgãos (LEWIS et al., 2002) e em casos suspeitos de toxoplasmose fetal, utilizando-se o fluido amniótico (ANTSAKLIS et al., 2002).

A patogenicidade do *T. gondii* está estreitamente relacionada à virulência da cepa e à espécie hospedeira. O camundongo (*Mus musculus*) tem sido utilizado preferencialmente como modelo animal experimental da toxoplasmose. As cepas de *T. gondii* variam em sua patogenicidade para os camundongos, sendo altamente virulentas, ou não-virulentas, originando infecções crônicas. Estas diferenças podem ser particularmente percebidas no primeiro isolamento, uma vez que a patogenicidade pode ser aumentada por passagens repetidas no mesmo hospedeiro (DUBEY; BEATTIE, 1988). Além disso, certas linhagens de camundongos são mais suscetíveis que outras, levando a variações de resultados dentro da mesma cepa (ARAUJO et al., 1976).

Para detecção de cistos teciduais de *T. gondii* nos órgãos dos hospedeiros, o bioensaio em camundongos pode ser utilizado a fim de aumentar a taxa de recuperação do parasita (DUBEY, 1998b). No caso da detecção do agente em fezes de gatos ou no ambiente, os oocistos do *T. gondii* devem ser esporulados e realizado o bioensaio em camundongos para que sejam diferenciados de outros coccideos (DUBEY; BEATTIE, 1988). É importante ressaltar que pelo bioensaio também é possível a observação das características biológicas do isolamento.

2.1.4.1 Identificação molecular - PCR direcionada ao gene B1

Mesmo diferindo em algumas propriedades biológicas, as cepas conhecidas de *T. gondii* são similares antigênica e morfologicamente e na sua capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros. Nas últimas três décadas *T. gondii* tem sido considerado como a única espécie válida do gênero *Toxoplasma* (DUBEY; BEATTIE, 1988; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; TENTER; JOHNSON, 1997).

Aproximadamente 30 genes do agente foram clonados e caracterizados, incluindo genes *housekeeping*, genes que codificam antígenos de superfície e proteínas secretórias e genes ribossomais (SIBLEY et al., 1995).

Burg et al. (1989) utilizaram a PCR direcionada ao gene B1 do *T. gondii* para detectar o agente em lisado de células humanas. Segundo esses autores, o grau de sensibilidade dessa técnica permite detectar o gene B1 de amostras de DNA purificado contendo apenas 10 parasitas em 100.000 leucócitos humanos.

Joss et al. (1993) realizaram PCR com *primers* dirigidos também ao gene B1 a fim de identificar parasitemia em ratos inoculados experimentalmente com duas cepas, a virulenta RH e a cistogênica Beverley. Constataram que a técnica de PCR foi mais sensível para a detecção de *T. gondii* do que o bioensaio em camundongos.

Wastling, Nicoll e Buxton (1993) inocularam experimentalmente ovinos com a cepa S48 e analisaram amostras de linfa, sangue e linfonodos através da *nested* PCR, utilizando *primers* dirigidos aos genes B1 e SAG1. Na linfa, houve concordância dos resultados encontrados com a inoculação em camundongos e a PCR, sendo que para o gene B1 houve uma sensibilidade significativamente maior do que para o SAG1. Utilizando amostras de sangue para verificar a parasitemia, a PCR-SAG1 mostrou duas vezes mais resultados falsos negativos do que a PCR-B1, que foi capaz de detectar os parasitas logo no terceiro dia pós infecção enquanto que a PCR-SAG1 somente os detectou no sétimo dia.

Em relação a especificidade da PCR-B1 Owen, Clarkson e Tress (1998) não encontraram nenhum resultado positivo ao testarem amostras de *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis gigantea* e *Neospora caninum.*

2.1.4.2 Caracterização molecular

A caracterização molecular de diferentes cepas e isolados de *T. gondii* tem sido realizada com amostras de humanos (AJZENBERG et al., 2002), aves, cães, gatos (PENA, 2004; PENA et al., 2008), capivaras (YAI, 2007), ovinos e caprinos (RAGOZO, 2007), trazendo informações sobre a epidemiologia do agente em diferentes ecossistemas.

Entre as técnicas de biologia molecular utilizadas para a caracterização de cepas de parasitos, está a análise de *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), já 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).

RFLPs são encontrados como o resultado da clivagem do DNA com enzimas de restrição. Cada enzima de restrição reconhece uma seqüência específica de quatro, seis ou oito bases. Se houver a mudança de uma única base dentro dessa seqüência, 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 seqüência de DNA é similar, mas não exatamente a mesma. A quantificação dessa diferença depende de quão relacionados são os organismos. Assim, sítios de restrição que estão presentes na seqüência 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 tamanhos (CLARK; RUSSEL, 1997).

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 cepas sem a necessidade de cultivo prolongado dos isolados, e uma possível alteração da cepa fora do seu hospedeiro original (SIBLEY et al., 1995).

Sibley e Boothroyd (1992) analisaram 28 cepas de diferentes hospedeiros, de vários países ao redor do mundo, utilizando PCR-RFLP. Três *loci* gênicos foram escolhidos aleatoriamente para a caracterização de genótipos (*SAG1*, *850* e *BS*). Verificaram que as 10 amostras reconhecidas como virulentas tinham essencialmente o mesmo genótipo quando analisadas no *locus SAG1*, enquanto que as demais, não-virulentas, eram relativamente heterogêneas. O alto grau de semelhança genética entre as amostras virulentas sugeria que as

mesmas faziam parte de uma única linhagem clonal, a despeito do hospedeiro e origem geográfica.

A fim de avaliar melhor a estrutura populacional de *T. gondii* e a correlação entre o genótipo do parasito e a toxoplasmose humana, Howe e Sibley (1995) examinaram 106 isolados humanos e animais, provenientes da Europa e América do Norte. Foram utilizados seis *loci* como marcadores genéticos (*SAG1*, *SAG2*, *ROP1*, *850*, *L328*, e *62*), e as diferenças genéticas foram detectadas através de PCR-RFLP. Mais de 95% dos isolados puderam claramente ser definidos em um entre três genótipos altamente similares, que foram designados como Tipos I, II e III. Uma ligação clara entre a virulência e esses três tipos clonais inicialmente descritos foi estabelecida em modelos biológicos: tipo I sendo considerado como altamente virulento e os tipos II e III como não patogênicos.

Entretanto, estudos posteriores de isolados de animais e humanos revelaram maior variabilidade genética do que previamente publicado (AJZENBERG et al, 2004; LEHMANN et al.; 2004), além de que genótipos não pertencentes as três linhagens principais começaram a ser encontrados em outros continentes (PENA et al., 2008). Foi demonstrado que isolados de *T. gondii* do Brasil são geneticamente diferentes daqueles identificados na América do Norte e Europa (LEHMANN et al., 2004, 2006; FERREIRA; VITOR; MELO, 2006; KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008).

Pena et al. (2008) pesquisaram isolados de *T. gondii* provenientes de 44 gatos do estado de São Paulo (Brasil) por multilocus PCR-RFLP e encontraram 20 genótipos diferentes sugerindo, portanto, uma população de *T. gondii* em gatos altamente diversificada. Essa diversidade de *T. gondii* no Brasil é ainda maior se forem considerados dados de genotipagem de 125 isolados de gatos, galinhas e cães de quatro estados do país. Desses 125 isolados foram identificados 48 genótipos diferentes. Quatro desses genótipos foram detectados em regiões com até 3000 km de distância e foram identificados como linhagens clonais BrI, BrII, BrIII e BrIV. Essas linhagens foram consideradas como resultantes de trocas genéticas entre os parasitas, com ampla disseminação no Brasil. Diferentes graus de virulência em camundongos foram observados nos grupos clonais descritos: o tipo BrI foi descrito como sendo altamente virulento, o BrIII como não-virulento e os tipos BrII e BrIV de virulência intermediária (PENA et al., 2008).

É de grande interesse o estudo de diferenças biológicas dentre os diferentes genótipos de *T. gondii,* pois pode haver relação entre os genótipos e as manifestações da doença em seres humanos e animais (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005). Entretanto ainda não é possível predizer a virulência de genótipos individuais, que vão do altamente virulento ao

intermediário ou ao não virulento, de acordo com a combinação de genes herdados (GRIGG et al., 2001).

2.2 *NEOSPORA CANINUM*

2.2.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *N. caninum* é caracterizado por três estágios infecciosos: taquizoítos, cistos teciduais e oocistos. Taquizoítos e cistos teciduais são os estágios encontrados nos hospedeiros intermediários sendo esses últimos observados primariamente no sistema nervoso central. Os taquizoítos são detectados em diversas células como hepatócitos, células epiteliais renais, macrófagos, fibroblastos, células do endotélio vascular, miócitos e células nervosas (DUBEY et al., 1988).

Oocistos de *N. caninum* esporulam fora do hospedeiro e assemelham-se aos oocistos de *Hammondia heydorni* em fezes de cães (DUBEY et al., 2002). Ainda pouco se sabe sobre a freqüência da eliminação de oocistos pelos cães e sobrevivência dos oocistos no meio ambiente, visto que são poucos os relatos de eliminação de oocistos por cães naturalmente infectados (BASSO et al., 2001; MCGARRY et al., 2003). Também não se têm informações se além dos cães e coiotes (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007) outros canídeos ou mesmo outras espécies animais podem ser hospedeiros definitivos do *N. caninum.* Recentemente oocistos similares a *N. caninum* foram encontrados em fezes de raposa vermelha, sugerindo que este animal pode também ser hospedeiro definitivo de *N. caninum* (WAPENAAR et al., 2006).

A neosporose em cães pode ser localizada ou generalizada e muitos órgãos podem estar envolvidos, incluindo a pele. Casos severos podem ocorrer em filhotes jovens e congenitamente infectados, que desenvolvem paresia de membros posteriores resultando numa paralisia progressiva. Sinais neurológicos são dependentes do local parasitado. Os membros anteriores são mais severamente afetados do que os posteriores e geralmente estão em hiperextensão rígida. Outras disfunções podem estar presentes, como dificuldade para engolir, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e até mesmo falência

cardíaca. Cães com paralisia de membro anterior podem estar alertas e sobreviverem por meses (DUBEY, 2003).

Cães com acesso às ruas ou contato com outras espécies de animais poderiam ser mais frequentemente infectados com *N. caninum* (GENNARI et al., 2002). Além disso, já foram verificadas diferenças na soropositividade de cães que se alimentam de carne crua (29,5% de 71) quando comparados aos que não recebem esta dieta (7% de 65), podendo o consumo de carne crua, ser um fator potencializador de infecção pelo *N. caninum* (PATITUCCI et al., 2001). Cañon-Franco et al. (2003) verificaram que, em Rondônia, a proporção de cães soropositivos ao *N. caninum* que se alimentavam de dieta caseira foi de 8,6% (n = 151), enquanto que a soropositividade em cães alimentados com ração comercial foi zero (n = 151).

2.2.2 Aspectos epidemiológicos

2.2.2.1 Perdas causadas pelo *N. caninum* em animais de produção

A infecção por *N. caninum* é reconhecida como uma importante causa de abortamentos em rebanhos bovinos em todo o mundo (DUBEY; LINDSAY, 1996).

Ainda que seja difícil obter valores precisos sobre as perdas econômicas da indústria pecuária devido a neosporose, estima-se que seja de milhões de dólares por ano. Na Austrália, estima-se que a neosporose custe à indústria do leite e da carne ao redor de 85 e 25 milhões de dólares por ano, respectivamente (DUBEY, 1999). Na Califórnia (EUA) aproximadamente 40.000 abortamentos são associados a neosporose, com perda econômica estimada em U$ 35 milhões por ano (BARR et al., 1998). A perda total anual foi estimada em $2,304 para um rebanho leiteiro de 50 vacas no Canadá (CHI et al., 2002). Na Austrália e Nova Zelândia, acredita-se que as perdas possam passar de U$ 100 milhões por ano (REICHEL, 2000). Na Suíça, perdas econômicas por causa da neosporose em gado leiteiro foram estimadas em 9.7 milhões de Euros por ano (HASLER et al., 2006a, b). É interessante notar que, na Suíça, a neosporose tem sido considerada como uma doença de notificação obrigatória desde 2001 (HASLER et al., 2006b).

2.2.2.2 *N. caninum* em roedores

Existe muita especulação sobre qual papel os animais silvestres podem ter como reservatórios da infecção pelo *N. caninum* (GONDIM, 2006). Descobertas recentes indicam que pequenos mamíferos como camundongos (*Mus domesticus* e *Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) podem atuar como hospedeiros intermediários naturais (HUANG et al., 2004; HUGHES et al., 2006; JENKINS et al., 2007; FERROGLIO et al., 2007; BARRATT et al., 2008).

Jenkins et al. (2007) estudaram a neosporose em 347 roedores (242 *Rattus norvegicus* e 105 *Mus musculus*) capturados nos EUA e no Caribe. Os cérebros dos roedores foram retirados: parte utilizada para PCR e parte inoculada em gerbis (cérebro dos camundongos) ou camundongos *knock out* (cérebro das ratazanas) para bioensaio. Após a realização dos bioensaios, nenhum sinal clínico de neosporose foi identificado, não houve a visualização de cisto tecidual para *N. caninum* e todos os gerbis e camundongos *knock out* permaneceram soronegativos. Entretanto, a *nested* PCR indicou a presença de DNA de *N. caninum* em pelo menos 10% dos camundongos e em 40% das ratazanas, para os dois genes utilizados: *Internal Transcribed Spacer*- ITS 1 (BUXTON et al., 1998) e Nc5 (KAUFMAN et al., 1996). Se for considerada a detecção de *N. caninum* para qualquer um dos genes alvo utilizados a positividade em camundongos sobe para 23% e nas ratazanas para cerca de 70%. Uma possível explicação para a ausência de sinais clínicos, de soroconversão e de cistos teciduais de *N. caninum* pode ser devido aos parasitas não estarem viáveis no tecido cerebral dos roedores mas possuírem DNA intacto, possibilitando sua detecção (JENKINS et al., 2007).

Ferroglio et al. (2007) pesquisaram *N. caninum* em 75 camundongos domésticos (*Mus musculus*), 103 ratos (*Rattus norvegicus*) e 55 camundongos silvestres (*A. sylvaticus*), capturados como parte de um programa de controle de pragas em fazendas de bovinos com histórico de abortamento por *N. caninum* em Piemonte (Itália). Foram positivos para *N. caninum* pela PCR Nc5: nove (13,8%) *M. musculus*, 14 (13,6%) *R. norvegicus* e dois (3,6%) *A. sylvaticus*.

As diferenças nas prevalências para *N. caninum* encontradas em camundongos silvestres, quando comparados aos ratos e camundongos domésticos, pode ser explicada pelas variações nas dietas dos roedores, como apontado anteriormente por Canova e Fasola (1993). Na região de Piemonte estudada, a dieta dos roedores silvestres é baseada principalmente em sementes, com uma pequena proporção de alimentos de origem animal, e isso pode explicar a

menor positividade para *N. caninum*. Já os ratos e camundongos domésticos coabitam com animais domésticos e podem mais facilmente ingerir oocistos eliminados por cães ou tecidos de bovinos infectados, como fetos, fluidos fetais e placenta e, talvez por isso, a prevalência nos roedores domésticos nesse estudo tenha sido mais alta que nos silvestres (FERROGLIO et al., 2007).

A presença de DNA de *N. caninum* em ratos e camundongos naturalmente infectados sugere que esses animais podem ser uma fonte de infecção importante de *N. caninum* para hospedeiros carnívoros (HUANG et al., 2007; HUGHES et al., 2006; JENKINS et al., 2007).

A ocorrência de roedores infectados por *N. caninum* tem implicações na disseminação da neosporose em diferentes áreas geográficas, devido a propagação da infecção através da dispersão dos roedores e formação de novas colônias (HUGHES et al., 2006). Por conta disso, alguns autores sugerem o controle de roedores como forma de reduzir o risco potencial de infecção, pelo fato desses animais poderem atuar como reservatórios para *N. caninum* (JENKINS et al., 2007; DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007; FERROGLIO et al., 2007).

2.2.3 Diagnóstico molecular

Desde que *N. caninum* foi identificado como uma nova espécie vários métodos de identificação têm sido desenvolvidos, incluindo métodos sorológicos, imuno-histoquímicos e moleculares, como a PCR (WASTLING et al., 1993).

Dentre os muitos fatores que podem influenciar o resultado da PCR, são considerados como essenciais as escolhas do DNA alvo e dos *primers* (CHABBERT et al., 2004). Poucos *loci* alvo têm sido descritos para detecção de *N. caninum* pela PCR, entretanto, diversos pares de *primers* têm sido utilizados em diferentes estudos, muitos deles objetivando a seqüência genômica Nc5 do *N. caninum*. A região Nc5 tem se mostrado ser altamente específica a esse agente e é claramente distinguível do *T. gondii* (KAUFMANN et al., 1996; YAMAGE; FLECHNER; GOTTSTEIN, 1996). Este método tem se mostrado extremamente sensível quando utilizado para detecção de DNA de *N. caninum* na presença de DNA de hospedeiros naturalmente infectados (HUGHES et al., 2006).

A análise da diversidade genética do *N. caninum* é limitada. O número de isolados disponíveis ao redor do mundo é pequeno em comparação com outros agentes do filo

Apicomplexa (DUBEY; SCHARES; ORTEGA-MORA, 2007). Investigações moleculares do *N. caninum* são importantes para ajudar a entender a genética, epidemiologia e patogenicidade desse parasita.

Diversas técnicas, freqüentemente baseadas naquelas descritas para o *T. gondii*, têm sido usadas para se entender a diversidade genética do *N. caninum*, embora com sucesso limitado. Seqüências de DNA ribossomal da subunidade 18S e da região ITS1 têm sido extensivamente utilizadas em estudos filogenéticos dentre agentes relacionados (BECK et al., 2009).

A região do RNA ribossomal ITS1 tem sido seqüenciada nas últimas décadas e está disponível no GenBank para os coccídeos relacionados: *T. gondii*, *N. caninum*, *Neospora hughesi*, *Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni* (SLAPETA et al., 2002). O gene ITS1 representa um alvo promissor para a diferenciação das espécies de coccídeos (HOMAN et al., 1997; MARSH et al., 1998; ELLIS et al., 1999a; JENKINS et al., 1999).

Em relação ao *N. caninum* e *T. gondii* essa região difere em aproximadamente 20% nos nucleotídeos ao longo do comprimento da seqüência (HOLMDAHL; MATTSSON, 1996; PAYNE; ELLIS, 1996) e pode ser usado como um excelente marcador para diferenciação de DNA desses agentes (ELLIS et al., 1999b).

2.3 CO-INFECÇÃO *TOXOPLASMA GONDII* E *NEOSPORA CANINUM*

A co-infecção de *T. gondii* e *N. caninum* pode ocorrer em diversos hospedeiros, diferindo em relação ao grau de cada infecção e na forma de interação: antagônica ou sinérgica. Alguns autores sugerem que a infecção por um desses parasitas pode prevenir a infecção pelo outro ou que o curso da infecção pode ser influenciado pela co-infecção (HUGHES et al., 2006).

Estudos *in vitro* (SUNDERMAN e ESTRIDGE, 1999) têm demonstrado que *T. gondii* e *N. caninum* podem co-existir em cultivo celular e ambos os agentes podem invadir a mesma célula hospedeira e cumprir a endodiogenia (HUGHES et al., 2006).

Em estudo conduzido no Reino Unido, 100 camundongos (*Mus domesticus*) e 43 ratazanas (*Rattus norvegicus*) foram capturados e DNA extraído de seus cérebros para PCR em busca da presença de DNA de *T. gondii* e/ou *N. caninum*. Desses, 3% dos camundongos foram positivos para *N. caninum* e 53% para *T. gondii*. Dentre as ratazanas, 4,4% foram

positivas para *N. caninum* e 42,2% para *T. gondii*. Dois camundongos foram positivos para ambos os agentes, o que não ocorreu com nenhuma das ratazanas (HUGHES et al., 2006).

Huang et al. (2004) estudaram 55 *Rattus norvegicus* capturados em seis fazendas de gado de leite e corte (cinco de leite e uma de corte). Todas as fazendas de gado de leite tinham histórico de abortamentos associados a neosporose bovina. Dos 55 ratos pesquisados, nove (16,4%) demonstraram anticorpos anti-*N. caninum* e cinco, anti-*T. gondii*. Apenas um desses ratos foi positivo a ambos os agentes. Dois ratos foram positivos para *N. caninum* pela PCR Nc5 e em apenas um destes foi possível a confirmação da presença do agente pelo isolamento de cisto tecidual através do bioensaio em camundongo *nude* e pelo isolamento de *N. caninum* utilizando gradiente de Percoll 35%. Os autores concluem que ratos de áreas rurais podem ser naturalmente infectados por *N. caninum,* indicando que um hospedeiro roedor pode ajudar a manter o ciclo de vida do protozoário na criação. Além disso, os cães também podem ser infectados pela ingestão desses ratos. Entretanto, ainda não se sabe como os roedores realmente se infectam por *N. caninum*, mas acredita-se que seja pela ingestão de oocistos eliminados por cães ou pela ingestão de fetos bovinos abortados ou placenta contendo taquizoítos ou cistos de *N. caninum*.

Romano et al (2009) testaram 135 pequenos roedores (50 *Mus musculus*, 50 *Rattus norvegicus* e 35 *Apodemus sylvaticus*) da região de Piemonte (Itália) por PCR Nc5 e encontraram positividade para *N. caninum* em sete (14%) *Rattus norvegicus,* seis (12%) *Mus musculus* e um (2,9%) *Apodemus sylvaticus.*

2.4 ROEDORES

A cidade de São Paulo, nos últimos anos, tem registrado um número crescente de reclamações dos munícipes sobre a presença de roedores, realizado através do Serviço de Atendimento ao Cidadão (SAC), que aumentou cerca de 600%, passando de 3.297 em 2000, para 20.129 em 2004. Nesse mesmo período, apresentou centenas de casos e dezenas de óbitos por leptospirose, de 2000 a 2005, ocorreram 1.411 casos e 199 óbitos.[1]

Esse aumento significativo das reclamações pode ser justificado pela dispersão dos ratos de telhado (*Rattus rattus*) das áreas centrais para demais regiões da cidade, até recentemente livres da espécie. O rato de telhado, por ser intradomiciliar e estar mais próximo

[1]http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0068

das pessoas, vem chamando a atenção, gerando surpresa na população e necessidade de informações e orientações do serviço público[1].

A população de ratos na cidade de São Paulo, assim como no país, não tem estimativa. O Programa de Controle de Roedores do município utiliza como metodologia para aferir a infestação por ratos na cidade o Índice de Infestação Predial por Roedores, representado pela razão entre a porcentagem de imóveis infestados e o total de imóveis inspecionados (método preconizado pelo Ministério da Saúde e pelo Center of Diseases Control - CDC – Atlanta, EUA).[1] Santos et al. (2006) avaliaram esse índice na cidade de São Paulo, resultando em 11,39% no intradomicílio e 20,82% no peridomicílio, valor considerado alto pelos pesquisadores. Essa situação na cidade é considerada grave e os pesquisadores afirmam que o programa de controle de roedores na cidade de São Paulo deve ser uma das maiores prioridades do governo paulista.

Os ratos urbanos têm papel importante na transmissão de várias doenças como a leptospirose, a peste bubônica, o tifo murino e salmoneloses, entre outras. São freqüentes ainda os acidentes causados pela mordedura desses animais. No Brasil, até o momento, as Hantaviroses estão associadas aos roedores silvestres. [2]

Os roedores pertencem à ordem Rodentia, cujo nome deriva da palavra latina *rodere* que significa roer. A principal característica que os une é a presença de dentes incisivos proeminentes que crescem continuamente. Existem cerca de 2.000 espécies de roedores no mundo, representando ao redor de 40% de todas as espécies de mamíferos existentes (BRASIL, 2002).

Os roedores vivem em qualquer ambiente terrestre que lhes dê condições de sobrevivência. Apresentam extraordinária variedade de adaptação ecológica, suportando os climas mais frios e os mais tórridos, nas regiões de maior revestimento florístico e nas mais estéreis; suportam grandes altitudes e em cada região podem mostrar um grande número de adaptações fisiológicas (BRASIL, 2002) .

Os ratos e os camundongos, pertencem à subordem Sciurognathi, família Muridae, subfamília Murinae; são considerados sinantrópicos por associarem-se ao homem em virtude de terem seus ambientes prejudicados pela ação do próprio homem (BRASIL, 2002).

Das espécies sinantrópicas comensais, a ratazana (*Rattus norvegicus*), o rato de telhado (*Rattus rattus*) e o camundongo (*Mus musculus*) são particularmente importantes por terem distribuição cosmopolita e por serem responsáveis pela maior parte dos prejuízos econômicos e sanitários causados ao homem (BRASIL, 2002).

[1]http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0068
[2] http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0034

2.4.1 Ratazana - *Rattus norvegicus*

A ratazana, também conhecida como rato de esgoto, rato marrom, rato da Noruega, gabiru etc, é a espécie mais comum na faixa litorânea brasileira. Vive em colônias cujo tamanho depende da disponibilidade de abrigo e alimento no território habitado, podendo atingir um grande número de indivíduos em situações de abundância alimentar. É uma espécie de hábito fossorial, seu abrigo preferencial fica abaixo do nível do solo. Com o auxílio de suas patas e dentes, as ratazanas cavam ativamente tocas e/ou ninheiras no chão, formando galerias que causam danos às estruturas locais. Encontram-se facilmente em galerias de esgotos e águas pluviais, caixas subterrâneas de telefone, eletricidade etc. Podem, também, construir ninhos no interior de estruturas, em locais pouco movimentados, próximos às fontes de água e alimentos (BRASIL, 2002).

Embora possam percorrer grandes distâncias em caso de necessidade, os indivíduos desta espécie têm raio de ação (território) relativamente curto, raramente ultrapassando os 50 metros. Na área delimitada por feromônios constroem seus ninhos, onde se alimentam, procuram e defendem seus parceiros sexuais. Este território é ativamente defendido de intrusos que são expulsos pelos indivíduos dominantes da colônia (BRASIL, 2002) .

O processo de urbanização desenfreada e sem planejamento da maioria das cidades de médio e grande porte do Brasil têm favorecido o crescimento da população e a dispersão das ratazanas. Fatores como a expansão de favelas e loteamentos clandestinos sem redes de esgoto e principalmente com coleta de lixo inadequada ou insuficiente, certamente têm propiciado o crescimento populacional desta espécie (BRASIL, 2002).

2.4.2 Rato de telhado – *Rattus rattus*

Além das diferenças morfológicas, os ratos de telhado apresentam hábitos, comportamentos e hábitat bastante distintos da ratazana. Por ser uma espécie arvícola os ratos de telhado ainda cultivam o hábito de viver usualmente nas superfícies altas das construções, em forros, telhados e sótãos, onde constroem seus ninhos, descendo ao solo apenas em busca de alimento e água. Vivem em colônias de indivíduos com laços parentais, cujo tamanho depende dos recursos existentes no ambiente. Seu raio de ação tende a ser maior que o da

ratazana, devido à sua habilidade em escalar superfícies verticais e à facilidade com que anda sobre fios, cabos e galhos de árvores (BRASIL, 2002).

Sua dispersão em zonas urbanas tem sido facilitada pelas características de verticalização das grandes cidades aliadas aos modelos de construção e decoração dos modernos prédios de escritórios: forros falsos e galerias técnicas para passagem de fios e cabos permitem o abrigo e a movimentação vertical e horizontal desta espécie. Em algumas cidades brasileiras, como o Rio de Janeiro e São Paulo, a presença do *Rattus rattus* é cada vez mais comum e predominante em bairros onde anteriormente a ratazana dominava, possivelmente pelo fato dos programas de controle serem direcionados a última espécie (BRASIL, 2002).

O papel do *Rattus rattus* na transmissão de doenças como a leptospirose ainda é pouco conhecido, mas seu hábito intradomiciliar permite um contato mais estreito com o homem. Sendo assim, é necessário que o potencial desta espécie como transmissora de doenças seja melhor estudado, para que a necessidade de controle da espécie seja fundamentada também sob o ponto de vista sanitário (BRASIL, 2002).

2.4.3 Camundongo - *Mus musculus*

O camundongo, também conhecido por mondongo, catita, rato caseiro, rato de gaveta, rato de botica, muricha e ainda por outras denominações regionais, é a espécie que atinge maior nível de dispersão, sendo encontrado praticamente em todas as regiões geográficas e climáticas do planeta. É originária das estepes da Ásia Central, região onde se acredita, tenha se desenvolvido inicialmente a agricultura. Neste período, os camundongos tornaram-se comensais do homem ao invadirem os locais onde os cereais colhidos eram estocados. Sua associação com o homem é, portanto, bastante antiga, sendo a habitação humana compartilhada com esses roedores há alguns milhares de anos (BRASIL, 2002).

São animais de pequeno porte que raramente ultrapassam 25 g de peso e 18 cm de comprimento (incluindo a cauda); dessa forma, são transportados passivamente para o interior das residências, tornando-se importantes pragas intradomiciliares. Uma vez em seu interior, podem permanecer longos períodos sem serem notados, sendo sua existência detectada quando a infestação já estiver estabelecida. Seu raio de ação é pequeno, raramente ultrapassando os 3 m (BRASIL, 2002) .

Camundongos costumam fazer seus ninhos no fundo de gavetas e armários pouco utilizados, no interior de estufas de fogões e em quintais onde são criados animais domésticos. Neste último caso, podem cavar pequenas ninheiras no solo, semelhantes às das ratazanas, podendo formar numerosos complexos de galerias onde houver grande oferta de alimentos (BRASIL, 2002).

São onívoros como a ratazana e o rato de telhado, ou seja, alimentam-se de todo tipo de alimento, embora demonstrem preferência pelo consumo de grãos e cereais. São animais curiosos e possuem o hábito de explorar ativa e minuciosamente o ambiente em que vivem (neófilos), não apresentando o comportamento de neofobia, característico dos ratos de telhado e ratazanas. Podem penetrar em 20 a 30 locais por noite em busca de alimento, trazendo sérios problemas de contaminação de alimentos em despensas e depósitos em geral, além de dificultar o seu controle por raticidas (BRASIL, 2002).

Apesar dos riscos que a sua presença pode trazer nas habitações humanas, os camundongos nem sempre são tidos como nocivos sendo até tolerados por grande parte da população. Além disso, há poucas informações sobre a real ocorrência desta espécie no Brasil, não havendo dados confiáveis a respeito de sua distribuição, dispersão e seu papel na transmissão de doenças (BRASIL, 2002).

3 OBJETIVOS

1. Determinar a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em roedores urbanos da Grande São Paulo (SP) pelo isolamento do agente em camundongos

2. Realizar a caracterização biológica e molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* de roedores urbanos da Grande São Paulo (SP)

3. Detectar a presença de *Neospora caninum* nos mesmos roedores através de técnicas de biologia molecular

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CAPTURA E EUTANÁSIA DOS ROEDORES

Roedores foram capturados em diversas regiões da Grande São Paulo com a utilização de armadilhas do tipo gaiola. Uma parte das capturas foi realizada com o auxílio das SUVIS (Supervisão de Vigilância em Saúde) Santana-Tucuruvi, Lapa-Pinheiros e Butantã, subordinadas à Secretaria Municipal de Saúde (SMS) da Prefeitura Municipal de São Paulo (PMSP); as demais foram realizadas por conta própria. As armadilhas foram colocadas em locais com sinais de infestação por roedores e deixadas no local por até três semanas, quando eram retiradas, na ausência de captura. Os alimentos utilizados como iscas variavam de acordo a suposição dos hábitos alimentares dos roedores presentes em cada região, indo desde pães e frutas até pedaços de embutidos e ração para animais.

Como muitos dos roedores já chegavam mortos em nosso laboratório não foi possível a colheita de sangue para sorodiagnóstico. Aqueles que chegaram vivos foram eutanasiados utilizando-se câmara com éter ou clorofórmio.

4.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

Foram usados camundongos albinos Swiss (25-30g) provenientes do Biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Cada amostra a ser testada foi inoculada em um grupo constituído de dois ou cinco animais, identificados individualmente com ácido pícrico e brinco numerado. Ao final de cada experimento, os animais foram sacrificados através de injeção intraperitoneal de tiopental sódico diluído em solução fisiológica na dose de 200 mg/kg de peso segundo protocolo descrito por Close et al. (1996) e 2000 Report of The AVMA Panel on Euthanasia (2001).

Cada camundongo do grupo foi inoculado por via subcutânea com 1,0-1,2 mL da amostra preparada e observados diariamente até o final do ensaio, oito semanas após a inoculação, ou até que ocorresse o óbito.

4.2.1 Digestão péptica de tecidos

Todos os roedores capturados foram eutanasiados e necropsiados para a remoção de cérebro, coração e parte dos músculos da coxa para o bioensaio em camundongos, segundo Dubey (1998b), na tentativa de isolamento de *T. gondii*.

Inicialmente, todo o tecido removido de cada roedor foi utilizado para o bioensaio; após o roedor nº 91 uma pequena parte do cérebro e do coração foi retirada e esses fragmentos foram congelados para posterior realização de PCR, em busca de DNA de *T. gondii* e *N. caninum.* O restante foi utilizado no bioensaio, juntamente com a musculatura da coxa, para completar 4 g 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 1,3g; NaCl, 2,2g; HCl, 3,5mL; água destilada suficiente para 250mL de solução), recém preparada e aquecida em banho-maria a 37ºC.

A mistura foi incubada em estufa a 37 ºC por uma hora sobre agitador magnético. Após a incubação, a suspensão foi filtrada através de duas camadas de gaze, o filtrado transferido para um tubo cônico de 50mL e centrifugado a 1200 *g* por 10 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de cada tubo 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 de cor do sedimento.

Após homogeneização, o volume foi completado para 5mL com salina, e centrifugado a 1200 *g* por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com salina (v/v) contendo 2000 U de penicilina e 200µg de estreptomicina por mililitro.

O número de camundongos inoculados em cada grupo variou entre dois e cinco, na dependência do tamanho do roedor capturado (*pool* de tecidos com peso < 2 g), para que a proporção tecido: antibiótico se mantivesse estável.

Após algum tempo percebeu-se que a quantidade de tecido restante após o processo de digestão era muito pouca, fato que poderia estar interferindo na baixa recuperação de parasitas pelo bioensaio. Dessa forma, após a captura do 85º roedor foi optado por não mais realizar a digestão, sendo os tecidos homogeneizados, diluídos com a solução de antibiótico e diretamente inoculado nos camundongos.

4.2.2 Pesquisa de *T. gondii* nos tecidos dos camundongos

Todos os camundongos usados para o bioensaio foram examinados microscopicamente para a pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito previamente (DUBEY; BEATTIE, 1988). Impressões de pulmão e fragmentos de cérebro do animal que veio a óbito foram examinadas diretamente entre lâmina e lamínula para pesquisa de estágios de *T. gondii*. Foi colhido sangue dos sobreviventes seis semanas PI, através do plexo retro-orbital, após sedação prévia com uma solução de 300 µL de cloridrato de quetamina e 150 µL de xilazina, administrando-se 0,03 mL dessa solução em cada camundongo, e o soro de cada camundongo foi testado para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987), como descrito no item 4.2.3, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997a). Os animais sobreviventes foram sacrificados dois meses PI, e fragmentos de cérebro de 2-3 mm^2 foram examinados, a fresco, entre lâmina e lamínula para pesquisa de cistos teciduais. Foi considerado infectado com *T. gondii* o camundongo em que foram encontrados estágios do parasito em seus tecidos.

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

Os soros dos camundongos do bioensaio foram examinados, inicialmente, através do MAT (DUBEY; DESMONTS, 1987).

A diluição dos soros foi feita em microplaca (96 poços), usando solução salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH_2PO_4 0,0026M; Na_2HPO_4 0,008M), filtrada em membrana de 45µm de porosidade.

Em seguida, 150µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5mL de solução alcalina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; H_3BO_3 0,05M; NaN_3 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de Mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evan 0,2%. 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 foi 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 foi anotada como resultado negativo; um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido foi considerado como positivo.

Os animais com títulos maiores ou iguais a 25 foram considerados positivos (DUBEY, 1997). Em todas as reações foram usados controles positivo e negativo previamente conhecidos e controle do antígeno. O antígeno foi fornecido gentilmente pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviado por via aérea. Os soros foram mantidos em freezer a −20 °C até o momento do uso.

Para confirmação dos resultados, os soros considerados positivos foram testados também pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) segundo Camargo (1964). As amostras de soro, na diluição de 1:16, foram incubadas em câmara úmida a 37ºC durante 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com solução tampão PBS (pH 7,2) por 3 vezes (10 min cada lavagem). Após a secagem das lâminas a 37ºC foi adicionado o conjugado na proporção 1:400. O conjugado foi previamente diluído em solução de PBS contendo Azul de Evan 0,01%. Novamente as lâminas foram incubadas a 37ºC por 30 min e lavadas três vezes por 10 min cada. Em todas as lâminas havia um soro controle positivo e outro negativo, para orientar a interpretação da correspondente reação. Foi considerada como reação positiva a fluorescência total na superfície dos taquizoítos. As amostras de soro de camundongos foram testadas na diluição 1:16, sendo considerados positivos todos os soros reagentes nessa diluição.

Para evitar contaminações cruzadas, todo o material não-descartável utilizado no bioensaio (vidraria, material cirúrgico) foi submetido à fervura com água, lavagem com detergente neutro, enxágüe em água corrente, imersão em HCl 0,1N por dois minutos, enxágüe em água destilada e esterilização em forno a 180 °C por 2 horas.

4.3 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Cada amostra de tecido cerebral dos roedores capturados foi diluída com TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Ph 8,0) na proporção de 80% de TE para 20% de tecido, sendo realizada homogenização com o vórtex.

Como há possibilidade de variações na presença e quantidade de parasitas dependendo do fragmento do tecido analisado, sempre que a quantidade de material permitiu, o tecido foi dividido em mais de uma alíquota e as amostras de DNA extraído foram analisadas separadamente.

A extração de DNA do tecido cerebral dos roedores capturados foi realizada segundo descrito por Paula (2003), da seguinte maneira:

- Separar 50µL do tecido diluído em microtubo de 1500 µL
- Adicionar 112 µL de GT (isotiocianato de guanidina) → homogeneizar no vórtex
- Incubar por 5 min a temperatura ambiente
- Adicionar 25 µL de clorofórmio → homogeneizar no vórtex
- Centrifugar a 12.000 *g* por 5 min a 4°C
- Separar cuidadosamente o sobrenadante em outro microtubo
- Adicionar a mesma quantidade do sobrenadante obtido de propanol
- Incubar a – 20°C por 30 min
- Centrifugar a 12.000 *g* por 30 min a 4°C
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 200 µL de etanol a 70%
- Centrifugar a 12.000 *g* por 5 min a 4°C
- Desprezar o sobrenadante
- Secar no banho maria a 56°C com a tampa aberta (10 min)
- Adicionar 30 µL de TE → homogeneizar no vórtex + *spin* (centrífuga comum)
- Incubar 5 min no banho maria a 56°C com a tampa fechada
- Armazenar no freezer a – 20 °C

As amostras de tecido cardíaco tiveram DNA extraído pelo protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) da seguinte maneira:

- Suspender o tecido em 500 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS).
- Adicionar 20 µL de proteinase K (20mg/ml).
- Incubar em banho-seco a 56ºC por 2 horas ou à 37ºC *overnight*
- Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) e homogeneizar.
- Centrifugar a 12.000 *g* por 10 minutos.
- Transferir a fase aquosa para outro tubo (aproximadamente 400 µL).
- Adicionar o mesmo volume de isopropanol absoluto.
- Precipitar por 2 horas ou *overnight*.
- Centrifugar a 12.000 *g* por 30 minutos.
- Desprezar o sobrenadante por inversão de tubos.
- Ressuspender o sedimento em 1 mL de etanol 70% gelado.
- Centrifugar a 12.000 *g* por 10 minutos.
- Desprezar o sobrenadante por inversão de tubos.
- Deixar secar em temperatura ambiente.
- Ressuspender o sedimento em 30 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e homogeneizar.
- Incubar a 56ºC por 10 minutos.
- Centrifugar e armazenar a -20ºC.

4.4 ESPECTROFOTOMETRIA

Para avaliar o grau de pureza do DNA obtido com o protocolo adotado para extração, foi realizada leitura espectrofotométrica das amostras nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, em espectrofotômetro BECKMAN DU® 640 (Beckman, Fullerton, CA, USA). Para a determinação de concentração de DNA foram consideradas apenas as leituras das amostras cujas razões entre as absorbâncias obtidas a 260nm e 280nm estivessem compreendidas entre os valores 1,8 e 2,0. Para esta leitura foi realizada diluição na concentração de 5 µL de DNA para 495 µL de TE.

4.5 *NESTED* PCR B1 - *TOXOPLASMA GONDII*

A determinação da presença de DNA de *T. gondii* nas amostras analisadas foi feita como descrito por Burg et al. (1989) com modificações, utilizando como alvo o gene B1.

O par de *primers* T1-T2 foi utilizado na PCR e o par de *primers* T3-T4, na *nested* PCR, sendo o tamanho do fragmento amplificado de 300 pb e 155 pb respectivamente. As seqüências dos *primers* utilizados estão descritas no quadro 1 e foram adaptadas de YAI (2000).

Primers	Seqüência (5'-3')
T1	AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA
T2	TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT
T3	TGGGAATGAAAGAGACGCTAATGTG
T4	TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG

Quadro 1 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR B1 para identificação de *T. gondii*.

Para a realização da PCR, com uma reação de 25 µL, foi utilizada a seguinte mistura:

- 15,6 µL de água ultrapura autoclavada
- 2,5 µL de tampão de reação (KCl SOmM: Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, Invitrogen®)
- 0,5 µL da mistura de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen®)
- 1,5 µL do *primer* I (10 pmol/ µL) T1
- 1,5 µL do *primer* II (10 pmol/ µL) T2
- 0,75 µL de $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen®)
- 0,15 µL de Taq DNA polimerase (*Thermus aquaticus*, Invitrogen®, 5 U/ µL)

As amostras foram diluídas na proporção de 22,5 µL da mistura acima e 2,5 µL do DNA extraído, sendo utilizados tubos tipo eppendorf de 200 µL.

Os produtos da PCR foram utilizados como amostras numa segunda etapa (*nested* PCR) utilizando a mesma mistura de reação descrita, exceto pelo uso dos *primers* (nesse caso, T3 e T4). Nesse caso, as amostras foram diluídas na proporção de 24,5 µL da mistura e 1 µL do produto da PCR, sendo utilizados os mesmos tipos de tubos e termociclador.

O ciclo da PCR e da *nested* PCR consistiu de:

Desnaturação inicial: 94 °C por 3 min
Desnaturação: 94 °C por 45 seg
Hibridização: 55°C por 60 seg
Extensão: 72°C por 90 seg

Esse ciclo se repetiu mais 25 vezes a partir da desnaturação na PCR e 35 vezes na *nested* PCR.

Extensão final: 72°C por 10 min

A cada corrida foi incluído um controle positivo (DNA extraído de cepa RH de *T. gondii* mantida em nosso laboratório - para PCR - e produto obtido na reação de PCR do DNA extraído de cepa RH - na *nested*) e pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada).

Os produtos originados pela *nested* PCR foram dispostos em um gel de agarose a 2% em cuba horizontal com solução tampão TBE pH 8,0 (Tris-borato 0,045 M : EDTA 0,001 M) juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases e em seguida foram submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µL de cada amostra. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/ml) por 30 min e documentado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas.

4.6 *NESTED* PCR Nc5 - *NEOSPORA CANINUM*

A determinação da presença de DNA de *N. caninum* nas amostras analisadas foi feita como descrito por Baszler et al. (1999) com modificações, utilizando como alvo o gene Nc5. Os *primers* utilizados (BAZLER et al., 1999) estão descritos no quadro 2. O par de *primers* externos Np4-Np7 foram utilizados na PCR e o par de *primers* internos Np6-Np7 foram utilizados na *nested* PCR, sendo o tamanho do fragmento amplificado de 275 pb e 227 pb respectivamente.

Primers	Seqüência (5'-3')	Região de pNc-5 (nucleotídeos)
Np4	CCTCCCAATGCGAACGAAA	806-824
Np6	CAGTCAACCTACGTCTTCT	758-776
Np7	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	550-568

Quadro 2 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR Nc5 para identificação de *N. caninum*.

Para a realização da PCR com uma reação de 25 µL foi utilizada a seguinte mistura:

- 15,6 µL de água ultrapura autoclavada
- 2,5 µL de tampão de reação (KCl SOmM: Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, Invitrogen®)
- 0,5 µL da mistura de dNTPs (10 mM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Invitrogen®)
- 1,5 µL do *primer* I (10 pmol/ µL) Np7
- 1,5 µL do *primer* II (10 pmol/ µL) Np4
- 0,75 µL de $MgCl_2$ (50 mM, Invitrogen®)
- 0,15 µL de Taq DNA polimerase (*Thermus aquaticus*, Invitrogen®, 5 U/ µL)

As amostras foram diluídas na proporção de 22,5 µL da mistura acima e 2,5 µL do DNA extraído, sendo utilizados tubos tipo eppendorf de 200 µL, amplificados em termociclador. Os produtos da PCR foram utilizados como amostras numa segunda etapa (*nested* PCR) utilizando a mesma mistura de reação descrita, exceto pelo uso dos *primers* (nesse caso, Np6 e Np7). Nesse caso, as amostras foram diluídas na proporção de 24,5 µL da

mistura e 1 µL do produto da PCR, sendo utilizados os mesmos tipos de tubos e termociclador.

O ciclo da PCR e da *nested* PCR consistiu de:

Desnaturação inicial: 95 °C por 2 min
Desnaturação: 95 °C por 30 seg
Hibridização: 56°C por 30 seg
Extensão: 72°C por 30 seg

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

Extensão final: 72°C por 10 min

A cada corrida de PCR foi incluído um controle positivo (DNA extraído de taquizoítos de *N. caninum* mantidos em nosso laboratório - para PCR - e produto obtido na reação de PCR do DNA extraído de taquizoítos de *N. caninum* - na *nested*) e pelo menos dois controles negativos (água pura autoclavada).

Os produtos originados pela *nested* PCR foram dispostos em um gel de agarose a 2% em cuba horizontal com solução tampão TBE pH 8,0 (Tris-borato 0,045 M : EDTA 0,001 M) juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases e em seguida submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µL de cada amostra. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/ml) por 30 min e documentado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas.

4.7 GENOTIPAGEM DO ISOLADO DE *T. GONDII*

O isolado de *T. gondii* obtido foi submetido a genotipagem utilizando os marcadores genéticos SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, SAG3, SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3 como previamente descrito (KHAN et al., 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; DUBEY; SCHARES-ORTEGA, 2007). Informações sobre os marcadores utilizados

(cromossomo de localização, *primers* externos e internos e enzimas de restrição utilizadas) encontram-se no quadro 3.

Marcador	Cr.*	Primers externos	Primers internos	Tamanho (pb)	Enzima de restrição
SAG1	VIII	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	503	*Sau96I* *HaeII*
5´SAG2	VIII	F: GCTACCTCGAACAGGAACAC R: GCATCAACAGTCTCTTCGTTGC	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	241	*MboI*
3´SAG2	VIII	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	221	*HhaI*
SAG3	XII	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	311	*Nci*I
SAG2	VIII	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTCGACCAGCGGGAGCAC	546	*Hinf*I *Taq*I
BTUB	IX	F: TCCAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAATGACGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	*BsiE*I *Taq*1
GRA6	X	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	*Mse*I
c22-8	Ib	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R:CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	*BsmA*I *Mbo*II
c29-2	III	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	*HpyCH4*IV *RsaI*
L358	V	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCCTCGAAGACAGC	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	*Hae*III *Nla*III
PK1	VI	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	*Ava*I *Rsa*I
Apico	Plastídeo	F: TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCGAACCCTTGATA	640	*Afl*II *Dde*I
CS3	VIIa	F: GTGTATCTCCGAGGGGGTCT R: TGTGACTTCTTCGCATCGAC	F: AGCGGATTTCCAACACTGTC R: CTGCTGCATTCACAAACTCC	557	*N1aIII* *MboI*

* cromossomo

Quadro 3 - Informações referentes aos marcadores genéticos e endonucleases utilizados para genotipagem da amostra de *T. gondii* detectado em roedor da Grande São Paulo (SP).

As sequências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas por PCR usando os *primers* externos seguido de *nested* PCR com os *primers* internos de cada marcador, individualmente.

A seguinte mistura de reagentes foi utilizada na PCR para uma reação de 25µL (controles e amostras):

⇒ 17,6µL de água ultrapura autoclavada

⇒ 2,5µL de tampão de reação 10×(KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)

⇒ 2,0µL da mistura de dNTPs (2,5mM)

⇒ 0,15µL da mistura de *primers* externos senso (16,7µM)

⇒ 0,15µL da mistura de *primers* externos anti-senso (16,7µM)

⇒ 1,0µL de $MgCl_2$ (50mM)

⇒ 0,1µL de *Taq* DNA polimerase[5] (5U/µl)

⇒ 1,5µL da amostra de DNA

Para a *nested* PCR, o produto amplificado da PCR foi diluído 1:2 em água ultrapura autoclavada. O protocolo utilizado foi o mesmo, utilizando-se os *primers* internos de cada marcador, individualmente, a 50µM.

Os ciclos empregados foram:

	PCR	*nested* PCR
1.Desnaturação Inicial	95ºC por 4’	95ºC por 4’
2.Desnaturação	94ºC por 30’’	94ºC por 30’’
3.Hibridização	55ºC por 30”	60ºC por 1’
4.Extensão	72ºC por 1’ e 30’’	72ºC por 2’ ’
Ciclos (etapas 2 a 4)	25 ciclos	35 ciclos

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3µL do produto da *nested* PCR foram misturados a 17µL de reação de digestão contendo tampão NEB (1x), 0,1mg/ml de BSA, e uma unidade de cada enzima de restrição. As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para dada enzima. As enzimas usadas para cada marcador foram descritas por Su; Zhang; Dubey (2006), exceto as enzimas do marcador CS3, descritas por Pena et al. (2008). Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,0-3,0%, contendo 0,3µg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA,USA).

O quadro 4 mostra as amostras utilizadas como referência para genotipagem do isolado desse estudo.

Identidade	Marcadores PCR-RFLP												Genótipo
	SAG1	5´3´ SAG2	SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3	
RH	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	Tipo I
PTG	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Tipo II
CTG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Tipo III
TgCgCa1 (Cougar)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II	Atípico
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	Atípico
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II	Atípico

Quadro 4 - Padrão das amostras clonais Tipos I, II e III e amostras atípicas para *T. gondii* utilizadas como controles positivos na PCR-RFLP para genotipagem do isolado de *T.gondii* do roedor da Grande São Paulo (SP).

4.8 *NESTED* PCR-ITS1 E RFLP PARA *T. GONDII* / *N. CANINUM*

As amostras positivas para *T. gondii* pela *nested* PCR B1 mas negativas ao bioensaio em camundongos, assim como todas as amostras positivas ao *N. caninum* pela *nested* PCR Nc5 foram submetidas primeiramente a *nested* PCR ITS1 seguida de RFLP, para confirmação dos resultados.

4.8.1 Amplificação pela *nested* PCR ITS1

As sequências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas por PCR utilizando *primers* externos JS4 (SLAPETA et al., 2002) e CT2c (presente estudo) seguido de *nested* PCR com *primers* internos CT2b (MONTEIRO et al., 2007) e JS4b (presente estudo). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se no quadro 5.

Primers	Seqüência (5'-3')
JS4b	AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG
JS4	CGA AAT GGG AAG TTT TGT GAA C
CT2b	TTG CGC GAG CCA AGA CAT C
CT2c	CTG CAA TTC ACA TTG CGT TTC GC

Quadro 5 - Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR ITS1 para identificação de *T. gondii* e *N. caninum*.

A seguinte mistura de reagentes foi utilizada na PCR para uma reação de 50µL (controles e amostras):

⇒ 31,2µL de água ultrapura autoclavada

⇒ 5,0µL de tampão de reação 10×(KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)

⇒ 1,0µL da mistura de dNTPs (10mM)

⇒ 3µL da mistura de *primers* externos senso (10µM)

⇒ 3µL da mistura de *primers* externos anti-senso (10µM)

⇒ 1,5µL de $MgCl_2$ (50mM)

⇒ 0,3µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µl)

⇒ 5,0µL da amostra de DNA

Na *nested* PCR foram utilizadas as mesmas quantidades e reagentes substituindo-se apenas os *primers* externos pelos *primers* internos e a amostra de DNA pelo produto amplificado na primeira reação de PCR.

O ciclo empregado na PCR e na *nested* PCR foi:

	PCR
1.Desnaturação Inicial	94ºC por 3’
2.Desnaturação	94ºC por 45’’
3.Hibridização	56ºC por 30”
4.Extensão	72ºC por 30’’
Ciclos (etapas 2 a 4)	35 ciclos

Os produtos originados pela *nested* PCR ITS1 foram dispostos em um gel de agarose a 2% em cuba horizontal com solução tampão TBE pH 8,0 (Tris-borato 0,045 M : EDTA 0,001 M) juntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases e em seguida submetidos à eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µL de cada amostra. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/ml) por 30 min e documentado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas.

As amostras que geraram bandas únicas foram diretamente submetidas à restrição enzimática. Nas amostras que geraram bandas múltiplas, a banda de interesse foi cortada diretamente do gel e purificada com o kit comercial illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK.), seguindo as instruções do fabricante, porém, aumentando os tempos de centrifugações para um minuto. Os produtos purificados foram então submetidos à restrição enzimática.

4.8.2 Restrição enzimática - RFLP

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 5 ou 10 μL do produto da *nested* PCR ITS1 (a quantidade foi definida de acordo com a intensidade da imagem da banda no gel) foram misturados a 22,4μL de reação de digestão contendo 2,0 μL tampão NEB (1 ou 3), 0,2 μL de BSA 100x, 0,2 μL da enzima de restrição e 20 μL de água DEPC.

As enzimas de restrição utilizadas foram RsaI e TaqI. Essas enzimas foram escolhidas com o auxílio do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 Copyright 1997-2007 Tom Hall (HALL, 1999) de acordo com os sítios de clivagem das mesmas nas sequências de *T. gondii, N. caninum, Hammondia hammondi* e *Hammondia heydorni* (todas obtidas com os *primers* JS4b e CT2b). A enzima RsaI cliva a sequência de *N. caninum* em dois sítios de restrição, sendo produzidas três bandas de 129, 132 e 239 pares de bases (pb), mas não cliva seqüência de *T. gondii, H. hammondi* ou *H. heydorni*. Já a enzima TaqI não cliva seqüência de *N. caninum,* mas cliva a seqüência de *T. gondii* em dois sítios de restrição produzindo três fragmentos de 75, 152 e 245 pb. A TaqI também cliva seqüências de *H. hammondi* e *H. heydorni*, mas produzindo diferentes fragmentos em quantidade e tamanho: dois fragmentos de 225 e 248 pb para *H. hammondi* e quatro fragmentos de 56, 96, 156 e 174 pb para *H. heydorni.*

As amostras foram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima.

Após a incubação, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose a 2,0%, contendo 0,3μg de brometo de etídeo, em cuba horizontal com solução tampão TBE, pH 8,0, e visualizadas sob luz ultravioleta, utilizando-se um analisador de imagem ULTRA LUM (Ultra Lum Inc., Claremont, CA, USA).

Foram consideradas como positivas as amostras clivadas que produziram bandas com tamanhos compatíveis ao esperado para determinado agente.

5 RESULTADOS

Foram examinados no total 217 roedores, sendo quatro camundongos (*Mus musculus)*, 20 ratazanas (*Rattus norvegicus*) e 193 ratos de telhado (*Rattus rattus*). A tabela 1 mostra a quantidade e espécie dos roedores capturados segundo a região de origem e o anexo A apresenta informações sobre a identificação, espécie e origem de cada um dos roedores capturados.

Tabela 1 - Quantidade, espécie e região de origem dos roedores capturados nos municípios de São Paulo, Osasco, Guarulhos, Jandira e Carapicuíba. São Paulo - 2009

Espécie de roedor	São Paulo				Guarulhos	Osasco	Jandira	Carapicuíba	**Total**
	Zona Norte	Zona Oeste	Zona Central	Zona Leste					
Mus musculus	3	1	0	0	0	0	0	0	**4**
Rattus rattus	77	93	3	6	6	5	2	1	**193**
Rattus norvegicus	10	1	5	0	0	0	4	0	**20**
Total	**90**	**95**	**8**	**6**	**6**	**5**	**6**	**1**	**217**

Foram armazenadas 203 amostras de tecidos, de um total de 121 roedores (121 amostras de tecido cerebral e 82 amostras de tecido cardíaco). Dependendo da quantidade de tecido armazenada, DNA foi extraído de mais de uma alíquota, sendo realizada extração entre uma e quatro alíquotas de cada tecido cerebral e apenas uma alíquota de cada tecido cardíaco. No total, DNA foi extraído de 391 amostras de tecido. Os detalhes em relação à espécie do roedor, município de origem e quantidade de alíquotas de tecido cerebral de cada roedor com DNA extraído, assim como a quantidade de alíquotas positivas por qualquer técnica utilizada, encontram-se no anexo B.

A tabela 2 mostra a origem dos tecidos armazenados de acordo com a espécie dos roedores e o município no qual foram capturados

Tabela 2 - Quantidade, espécie e região de origem dos roedores capturados na Grande São Paulo cujos tecidos foram armazenados para diagnóstico por técnicas de biologia molecular. São Paulo - 2009

Espécie de roedor	São Paulo		Guarulhos		Osasco		Jandira		Carapicuíba	
	Cor.	Cér.	Cor.	Cér.	Cor.	Cér.	Cor.	Cér.	Cor.	Cér.
Mus musculus	2 (4)*	2 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rattus rattus	61 (179)	99 (179)	6 (6)	6 (6)	4 (5)	4 (5)	2 (2)	2 (2)	1 (1)	1 (1)
Rattus norvegicus	2 (16)	3 (16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4)	4 (4)	0 (0)	0 (0)
Total	**65 (199)**	**104 (199)**	**6 (6)**	**6 (6)**	**4 (5)**	**4 (5)**	**6 (6)**	**6 (6)**	**1 (1)**	**1 (1)**

*(n) = roedores com tecido armazenado / roedores capturados
Cor. = coração
Cér. = cérebro

Apenas um roedor (*Rattus norvegicus* n.218) teve resultado positivo para *T. gondii* pelo bioensaio com a morte de um dos camundongos aos 17 dias pós inoculação, o que

representa 5% (1/20) de positividade entre as ratazanas e 0,46% (1/217) de positividade entre todos os roedores pesquisados. Foram encontrados nesse camundongo taquizoítos em pulmão e cistos em tecido cerebral. As figuras 1A e 1B mostram os cistos encontrados no tecido cerebral do camundongo do bioensaio 218.

A **B**

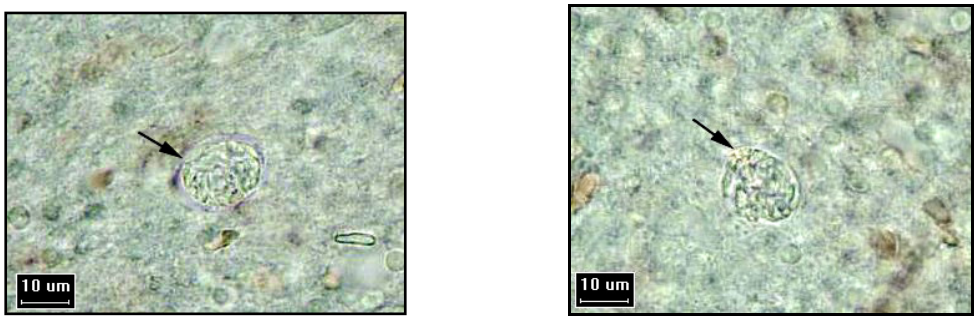

Figura 1A e B – Cisto de *T. gondii* em lâmina de tecido cerebral do camundongo inoculado com tecidos do rato 218

A tabela 3 mostra os resultados de bioensaio e *nested* PCR B1 para *T. gondii* e *nested* PCR Nc5 para *N. caninum* dos tecidos armazenados dos roedores capturados.

Tabela 3 - Quantidade e espécie dos roedores com resultado positivo para *T. gondii* ou *N. caninum* pelo bioensaio, *nested* PCR B1 e/ou *nested* PCR Nc5. São Paulo – 2009

Espécie de roedor	*T. gondii*				*N. caninum*		
	Bioensaio*	*nested* PCR B1		**Total**	*nested* PCR Nc5		**Total**
		Cor.	Cér.		Cor.	Cér.	
Mus musculus	0 (4)	1 (2)	0 (2)	**1**	0 (2)	1 (2)	**1**
Rattus rattus	0 (193)	1 (74)	1 (112)	**2**	0 (74)	7 (112)	**7**
Rattus norvegicus	1 (20)	1 (6)	2 (7)	**2****	0 (6)	2 (7)	**2**
Total	**1 (217)**	**3 (82)**	**3 (121)**	**5**	**0 (82)**	**10 (121)**	**10**

* positivo (examinado)
** mesmo roedor: positivo no bioensaio e *nested* PCR B1 em amostra de coração e cérebro

Amostras de tecido cerebral e pulmonar do camundongo positivo para *T. gondii* (bioensaio 218) assim como uma amostra de tecido cerebral do roedor 218 (cujos tecidos foram inoculados nesse camundongo) foram genotipadas por RFLP-PCR. As amostras procedentes do roedor 218 e do camundongo do bioensaio foram caracterizadas como recombinantes I, III e u-1 (Tabela 4).

Tabela 4 Genótipo do isolado de *T. gondii* de *Rattus norvegicus* da Grande São Paulo e das demais amostras similares encontradas anteriormente . São Paulo - 2009

	Marcadores utilizados											
Identidade do isolado	SAG 1	5'3' SAG 2	SAG 2	SAG 3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK 1	Apico	CS3
TgRatBr1[1]	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	III
TgCatBr64[2]	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	III
TgShBr6 [3]	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	III
TgShBr7[3]	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	III

[1] presente estudo
[2]PENA et al.(2008)
[3]RAGOZO et al. (comunicação pessoal)

Amostras de tecido cerebral e cardíaco do rato 218, assim como do camundongo positivo do bioensaio 218, foram testadas por *nested* PCR B1, *nested* PCR ITS1 e RFLP com as enzimas RsaI e TaqI, confirmando presença de DNA de *T. gondii* em todas as amostras e em todas as técnicas utilizadas. A figura 2 mostra o padrão das bandas produzidas após a clivagem com as enzimas.

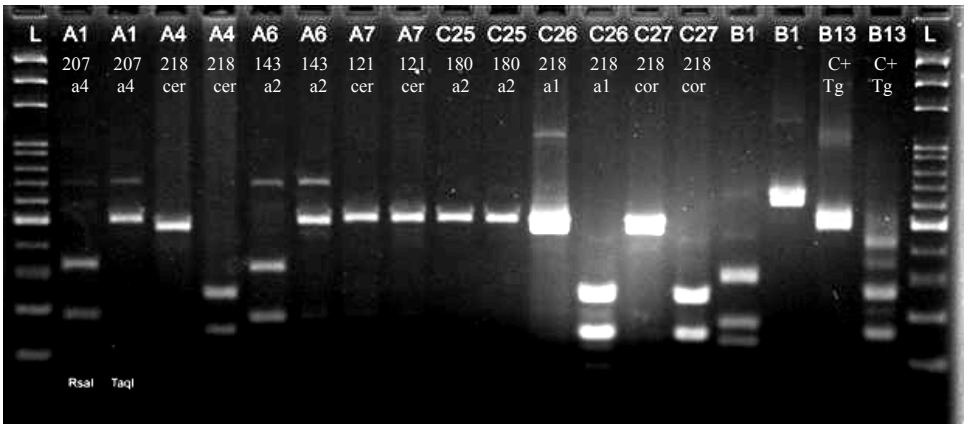

Figura 2 – Produtos de RFLP com as enzimas RsaI e TaqI. Note que as amostras estão duplicadas: a primeira coluna (à esquerda) representa a digestão com a enzima RsaI e a segunda coluna (à direita) representa a digestão com a enzima TaqI. A coluna B13 representa o padrão de bandas do controle positivo de *T. gondii*

As amostras do rato 218 estão representadas nas colunas A4 (cérebro do camundongo do bioensaio 218), C26 (cérebro do rato 218) e C27 (coração do rato 218).

Pela *nested* PCR B1 foram encontrados DNA de *T. gondii* em quatro roedores com bioensaio negativo, sendo dois em tecidos cerebrais (um *Rattus norvegicus* do município de Jandira – n°211a3- e um *Rattus rattus* do município de Osasco - n°207a4) e dois em tecidos cardíacos (um *Mus musculus* da zona norte de São Paulo - n°121cor - e um *Rattus rattus* da zona oeste de São Paulo - n°129cor). Amostras de DNA extraído desses quatro roedores foram testadas pela RFLP com os mesmos marcadores da genotipagem para *T. gondii*, na tentativa de confirmar o resultado, mas não houve amplificação em nenhuma dessas amostras.

Foram testadas então com a *nested* PCR ITS1 e posteriormente pela RFLP, com as enzimas de restrição TaqI e RsaI.

Pela *nested* PCR ITS1 houve amplificação nas quatro amostras (colunas 1-207, 2-129, 3-121 e 5-211), como mostra a figura 3. Entretanto, as amostras 1-207, 2-129 e 5-211 produziram bandas ao redor de 500 pb, não compatíveis com o tamanho esperado para *T. gondii* (472 pb), ao contrário da amostra 3-121cor, que produziu banda com tamanho menor que 500 pb (Fig.3, coluna 3), compatível com o esperado para *T. gondii*.

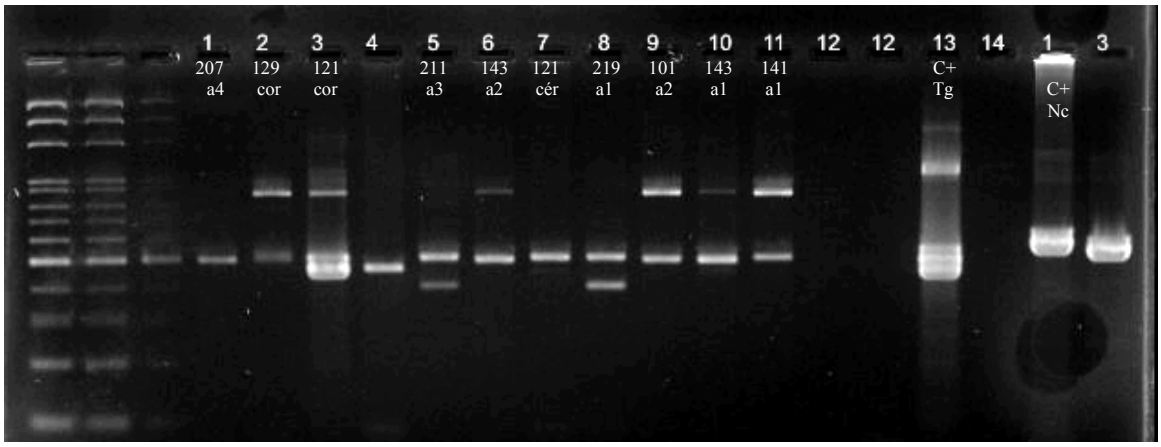

Figura 3 – Produtos da *nested* PCR ITS1. A coluna 13 representa o padrão de bandas do controle positivo de *T. gondii*. A coluna 1 (à direita da foto) representa o padrão de bandas do controle positivo de *N. caninum*.

As amostras (1-207, 2-129, 3-121 e 5-211) foram então submetidas à RFLP. Somente a amostra 3-121 (extraída do tecido cardíaco de um camundongo) foi clivada pela enzima TaqI, produzindo perfil compatível com *T. gondii* sendo, portanto, a única considerada positiva. O padrão de clivagem obtido pela amostra 3-121 foi o mesmo das amostras das colunas A4, C26 e C27 da figura 2. As demais amostras foram consideradas negativas para *T. gondii*, *N. caninum*, *H. hammondi* e *H. heydorni*.

Sendo assim, além do rato 218, positivo ao *T. gondii* pelo isolamento em bioensaio, também foi considerado positivo ao mesmo agente o camundongo 121 nas três técnicas utilizadas: *nested* PCR B1, *nested* PCR ITS1 e RFLP, apesar deste camundongo ser negativo ao bioensaio.

Em relação ao *N. caninum,* DNA desse agente foi encontrado, pela *nested* PCR Nc5, em 12 amostras de tecidos cerebrais de 10 roedores sendo: quatro *Rattus rattus* (184, 158, 101 e 160) e um *Rattus norvegicus* da Zona Oeste de São Paulo (180a2 e a4), dois *Rattus rattus* (141; 143a1 e a2) e um *Mus musculus* (121) da Zona Norte de São Paulo, um *Rattus rattus* de Carapicuíba (127) e um *Rattus norvegicus* de Jandira (219).

Essas amostras também foram testadas por *nested* PCR ITS1 e posteriormente com as enzimas de restrição RsaI e TaqI, não havendo confirmação do agente em nenhuma amostra. Na figura 2 pode-se ver ausência de clivagem nas colunas A7 (121 cér.) e C25 (180a2). Na coluna A1 (207a4) também da figura 2 pode-se ver que houve clivagem, mas as bandas produzidas não apresentam o padrão esperado para *N. caninum*, que seriam três bandas de 129, 132 e 239 pb (uma banda não esperada com mais de 300 pb pode ser visualizada).

A Tabela 5 apresenta os resultados referentes às diferentes técnicas moleculares utilizadas para cada uma das amostras testadas.

Tabela 5 - Resultados obtidos com as técnicas de biologia molecular utilizadas para detecção de *T. gondii* e *N. caninum* nos roedores capturados na Grande São Paulo (SP), de acordo com o n° da amostra, quantidade de alíquotas pesquisadas e espécie do roedor. São Paulo, 2009

nº roedor		Alíq. pos.*/ alíq. pesq. (por roedor)	Espécie do roedor	Técnica molecular utilizada			
				nested PCR B1	*nested* PCR Nc5	PCR ITS1 / RFLP	
						T. gondii	*N. caninum*
1	207 a4	1/4	*Rattus rattus*	+	-	-	-
2	129 cor	1/1	*Rattus rattus*	+	-	-	-
3	121 cor	1/1	*Mus musculus*	+	-	+	-
4	218 cér	1/1	cam.bioensaio +	+	-	+	-
5	211 a3	1/4	*Rattus norvegicus*	+	-	-	-
6	143 a2	2/2	*Rattus rattus*	-	+	-	-
7	121 cér	1/1	*Mus musculus*	-	+	-	-
8	219 a1	1/4	*Rattus norvegicus*	-	+	-	-
9	101 a2	1/3	*Rattus rattus*	-	+	-	-
10	143 a1	2/2	*Rattus rattus*	-	+	-	-
11	141 a1	1/2	*Rattus rattus*	-	+	-	-
19	160 a2	1/3	*Rattus rattus*	-	+	-	-
20	180 a4	2/4	*Rattus norvegicus*	-	+	-	-
21	184 a1	1/4	*Rattus rattus*	-	+	-	-
22	158 a1	1/4	*Rattus rattus*	-	+	-	-
24	127a1	1/3	*Rattus rattus*	-	+	-	-
25	180 a2	2/4	*Rattus norvegicus*	-	+	-	-
26	218 a1	1/4	*Rattus norvegicus*	+	-	+	-
27	218 cor	1/1	*Rattus norvegicus*	+	-	+	-

* alíquotas positivas por qualquer técnica molecular

6 DISCUSSÃO

6.1 *TOXOPLASMA GONDII*

T. gondii é um parasita de distribuição global com capacidade de infectar animais de sangue quente em diversos sistemas ecológicos. Esse sucesso é devido a sua disseminação em diferentes ambientes através de oocistos resistentes eliminados por felídeos (DABRITZ et al., 2008) e pela transmissão entre hospedeiros intermediários através do carnivorismo e onivorismo. A habilidade das formas assexuais penetrarem e crescerem em virtualmente todos os tipos de células animais e sua longa sobrevivência como cistos teciduais também contribui para sua disseminação (BECK et al., 2009).

Neste estudo foi realizado bioensaio de todos os roedores capturados, não sendo considerado se possuíam anticorpos anti-*T. gondii* ou não, já que em estudos anteriores foi possível isolar *T. gondii* de roedores soronegativos (DUBEY; HOOVER; WALLS, 1977; RUIZ; FRENKEL, 1980; DUBEY et al., 1995). Foi encontrada 0,46% de ocorrência de *T. gondii,* nos roedores pesquisados, por isolamento em bioensaio. Outros autores também encontraram ocorrência semelhante para *T. gondii* em roedores: 0,93% de positividade por isolamento em bioensaio de ratos provenientes de fazendas de porcos (DUBEY et al., 1995) e 0,42% de isolamento por bioensaio de ratos provenientes da região do Caribe (DUBEY et al., 2006). Entretanto, os roedores pesquisados nesses estudos não eram provenientes de áreas estritamente urbanas como a Grande São Paulo, além de serem espécies diferentes das pesquisadas no presente estudo.

Recentemente Ruffolo et al. (2008) estudaram 181 *Rattus rattus* capturados próximos a postos de reciclagem na área urbana de Londrina (PR) e encontraram 5% de positividade por isolamento em bioensaio. Provavelmente o habitat dos roedores (postos de reciclagem) pode ter favorecido a maior quantidade de animais infectados por *T. gondii* encontrados em Londrina.

Uma possível explicação para a baixa freqüência de positividade ao *T. gondii* dos roedores urbanos do presente estudo pode estar relacionada a variações de susceptibilidade dos roedores pesquisados e/ou com o grau de exposição ao agente (GUSTAFFSON et al., 1997; SEDLAK et al., 2001; AFONSO et al., 2007). Não foram encontrados estudos que tenham avaliado a contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* na área urbana da cidade de São Paulo ou dos demais municípios de origem dos roedores pesquisados, dessa forma, não se sabe exatamente se esses roedores foram ou não expostos ao agente e em que grau essa exposição possa ter ocorrido.

No presente estudo o isolado obtido de *T. gondii* foi caracterizado como recombinante I, III e u-1, semelhante ao isolados obtidos previamente de duas ovelhas[3] e um gato (PENA et al., 2008), todos do estado de São Paulo. Esse dado está de acordo com estudos anteriores que relatam grande diversidade genética de isolados de *T. gondii* no Brasil (PENA et al., 2008), e confirma a presença de isolados semelhantes entre si em animais do estado de São Paulo.

Dos quatro roedores com bioensaio negativo mas positivos para *T. gondii* pela *nested* PCR B1, apenas um (*Mus musculus* da Zona Norte de São Paulo) foi considerado positivo para *T. gondii* também pela *nested* PCR ITS1 e RFLP; nos outros três não foi possível confirmar essa positividade. Esse resultado pode ter explicação pela especificidade da técnica utilizada com o gene alvo B1.

Recentemente, Montoya et al. (2009) compararam a detecção de *T. gondii* em tecidos de gatos soropositivos através do bioensaio em camundongos e *nested* PCR B1, técnicas utilizadas no presente estudo. Dos 64 gatos pesquisados, 34 (53,1%) foram positivos ao *T. gondii* pelo isolamento do agente em camundongos e *nested* PCR B1. Sete gatos foram positivos somente pelo bioensaio e três gatos, somente pela *nested* PCR B1. Os autores concluem que apesar dos resultados terem variado de acordo com a técnica utilizada, não houve diferença significativa entre os métodos ($p>0,05$) e consideraram como positivos os resultados obtidos por uma ou outra técnica. No presente estudo, das quatro amostras positivas para *T. gondii* pela *nested* PCR B1 três não confirmaram conter DNA do agente pelas demais técnicas utilizadas, indicando ser importante a realização de estudos mais detalhados sobre o emprego desse gene alvo (B1) e/ou do protocolo utilizado para detecção de DNA de *T. gondii* em amostras de tecidos. No estudo de Montoya et al. (2009) nenhuma técnica foi utilizada para confirmar se as três amostras de gatos positivas somente pela *nested* PCR B1 realmente continham DNA de *T. gondii.*

Se no presente estudo tivessem sido consideradas as amostras positivas para *T. gondii* pela *nested* PCR B1 sem confirmação por outras técnicas, teríamos um total de cinco roedores positivos, ao invés de dois. Até que um protocolo mais confiável seja desenvolvido para detecção de DNA de *T. gondii* em pequenos roedores é importante que técnicas moleculares mais específicas, como o seqüenciamento ou a RFLP, sejam empregadas, para confirmação de um resultado positivo obtido por PCR em uma amostra negativa pelo bioensaio em camundongos.

A detecção de DNA de *T. gondii* por *nested* PCR B1 não pôde ser realizada em todos os 217 roedores capturados na Grande São Paulo pois, no início da pesquisa, amostras de

[3] RAGOZO et al., comunicação pessoal

tecido não eram armazenadas. Dessa forma, não podemos comentar sobre porcentagem de positividade baseada nos resultados obtidos com essa técnica.

Apesar dos custos para realização e do longo tempo para obtenção dos resultados, o bioensaio em camundongo ainda é considerado como o teste padrão para isolamento de *T. gondii* em tecidos, pois produz informações não somente sobre a presença mas também sobre a viabilidade do agente, como já haviam concluído Dubey e Frenkel (1998). De fato, o camundongo 121 desse estudo poderia estar infectado por uma pequena quantidade de parasitas ou os mesmos já poderiam estar inviáveis, incapazes portanto de produzir uma nova infecção, o que explicaria seu resultado negativo pelo bioensaio, apesar da detecção de DNA de *T. gondii* em seu tecido cardíaco.

6.2 NEOSPORA CANINUM

A análise da diversidade genética do *N. caninum* é limitada. O número de isolados disponíveis ao redor do mundo é pequeno em comparação com outros agentes do filo Apicomplexa (DUBEY et al., 2007). Investigações moleculares do *N. caninum* são importantes para ajudar a entender a genética, epidemiologia e patogenicidade desse parasita.

Dentre os muitos fatores que podem influenciar o resultado da PCR, são considerados como essenciais as escolhas do DNA alvo e dos *primers* (CHABBERT et al., 2004). Alguns autores reportaram a sequencia genômica Nc5 como sendo altamente específica ao *N. caninum* e claramente distinguível do *T. gondii* (KAUFMANN et al., 1996; YAMAGE et al., 1996). Entretanto, outros pesquisadores têm detectado sequências de *N. caninum* utilizando-se de *nested* PCR Nc5 que, após sequenciamento, mostraram ser, na verdade, seqüências de DNA do próprio hospedeiro. Esse fato compromete a confiabilidade do teste dependendo da espécie animal utilizada necessitando assim, de outras técnicas diagnósticas para confirmação do resultado encontrado (ROMANO et al., 2009).

No presente estudo, nenhuma das 12 amostras dos 10 roedores com resultado positivo ao *N. caninum* pela *nested* PCR Nc5 foram consideradas positivas pela *nested* PCR ITS1 e RFLP. Outros autores também encontraram, recentemente, amostras positivas ao *N. caninum* pela PCR Nc5 que, na verdade não eram seqüências desse agente (ROMANO et al., 2009).

Romano et al (2009) testaram 135 pequenos roedores (50 *Mus musculus*, 50 *Rattus norvegicus* e 35 *Apodemus sylvaticus*) da região de Piemonte (Itália) com dois protocolos de

PCR direcionada ao gene Nc5: pares de *primers* Np4-Np7 e Np6plus-Np21plus. Das 50 amostras testadas de *Mus musculus*, 49 tiveram resultado positivo para *N. caninum* pelo par de *primers* Np4-Np7. Entretanto, após clonagem e sequenciamento dos produtos da PCR apenas seis confirmaram ser de *N. caninum*, enquanto as demais 43 alinharam com seqüência gênica do DNA do camundongo. Os autores relatam que o par de *primers* Np4-Np7 (os mesmos utilizados na PCR Nc5 do presente estudo) não pareia com seqüências do DNA de *Bos taurus* (espécie de maior interesse para o diagnóstico de infecção por *N. caninum*) mas pode parear com DNA do camundongo doméstico e, possivelmente, de outros pequenos roedores também. Sugerem ainda que o sequenciamento é necessário para confirmar infecção por *N. caninum*, em especial se o protocolo de PCR utilizado tiver sido desenvolvido para testar amostras de uma espécie diferente da então testada. Acrescentam ainda que sequenciamento de amostras de pequenos mamíferos deve ser incluído, no futuro, no desenho de novos protocolos de PCR para detecção de *N. caninum*.

Por outro lado, outros pesquisadores mostraram que o gene Nc5 de *N. caninum* pode ser utilizado com sucesso como gene alvo para detecção de DNA desse agente por PCR. Huang et al. (2004) encontraram dois ratos (*Rattus norvegicus*) positivos para *N. caninum* pela PCR Nc5 dentre 55 ratos capturados em fazendas de gado em Taiwan. A sequência de DNA amplificado obtido de um destes dois ratos foi checada no GenBank resultando ser 94% homóloga a sequência de *N. caninum* da cepa Áustria 1.

Ferroglio et al. (2007) pesquisaram *N. caninum* em roedores de Piemonte (Itália), pela PCR Nc5, tendo encontrado nove camundongos domésticos (*Mus musculus*), 14 ratos (*Rattus norvegicus*) e dois camundongos silvestres (*A. sylvaticus*) positivos. Desses, DNA amplificado de dois ratos, um camundongo doméstico e um camundongo silvestre foram clonados e sequenciados, tendo sido obtidas sequências 96-97% homólogas à publicada para *N. caninum.*

Hughes et al. (2008) pesquisaram *N. caninum* em tecido cerebral de 57 coelhos do Reino Unido, também pela PCR Nc5, encontrando seis amostras positivas que, após clonagem e sequenciamento, também confirmaram ser *N. caninum*.

A *nested* PCR direcionada ao gene alvo Nc5 é capaz de detectar *N. caninum* como descrito (FERROGLIO et al., 2004; HUANG et al., 2007; HUGHES et al., 2008) mas, pelos resultados do presente estudo e pelo recentemente publicado por Romano et al. (2009), conclusões baseadas somente nos protocolos de PCR direcionados a esse gene podem ser erroneamente interpretadas. Diversos pesquisadores têm sequenciado e disponibilizado, nas últimas décadas, a região do DNA ribossomal ITS1 para detecção dos coccídeos relacionados:

T. gondii, *N. caninum*, *N. hughesi*, *H. hammondi* e *H. heydorni* (SLAPETA et al., 2002), sendo considerado, inclusive, um gene alvo promissor para diferenciação dentre essas espécies de coccídeos (HOMAN et al, 1997; MARSH et al., 1998; ELLIS et al., 1999a; JENKINS et al., 1999). No presente estudo, as 12 amostras positivas ao *N. caninum* pela *nested* PCR Nc5 foram testadas por *nested* PCR direcionada ao gene alvo ITS1 e houve amplificação em todas as amostras. Entretanto, em somente uma amostra (121 cor) houve confirmação do agente (*T. gondii*) pela restrição enzimática. Supomos, portanto, que as demais amostras amplificadas pela *nested* PCR ITS1 mas que não foram clivadas por nenhuma das duas enzimas de restrição utilizadas (RsaI e TaqI) e que, portanto, foram consideradas negativas para os coccídeos citados por Slapeta et al. (2002) podem, na verdade, conter DNA de algum outro coccídeo relacionado, merecendo estudo cuidadoso.

Além de considerarmos a real infecção ou não de um hospedeiro por *N. caninum*, as diferenças nos resultados obtidos por diversos pesquisadores pode ser explicada por outros fatores além do gene alvo e da sensibilidade e especificidade da técnica de biologia molecular escolhida, sendo eles: os *primers* escolhidos e o órgão de eleição utilizado para detecção do agente.

Huang et al. (2004) realizaram bioensaio em camundongos para diagnóstico de *N. caninum* em ratos e relataram a dificuldade no diagnóstico por técnicas moleculares, pela pequena quantidade do agente encontrada no tecido cerebral dos camundongos utilizados no bioensaio. Um único cisto de *N. caninum* foi encontrado no cérebro de um desses camundongos, o que dificulta a chance de se conseguir extrair DNA justamente da porção do tecido onde esse cisto se encontrava. Isso pode explicar a ausência de detecção de DNA de *N. caninum* em hospedeiros que de fato possam estar infectados, que também pode ter acontecido com os roedores pesquisados da Grande São Paulo.

O órgão de eleição para detecção de *N. caninum* por técnicas moleculares pode interferir amplamente no resultado encontrado (BARRAT et al., 2008). No presente estudo *N. caninum* foi pesquisado em amostras de tecido cerebral e cardíaco dos roedores capturados. Segundo Collantes-Fernandez et al. (2006) *N. caninum* pode estar presente em outros tecidos além do cérebro, mas apenas durante as primeiras fases da infecção, após a qual a resposta imune do hospedeiro eliminaria o parasita dos tecidos, com exceção do tecido cerebral. Isso poderia sugerir que animais infectados naturalmente com resultados positivos em outros tecidos que não o cérebro teriam se infectado não muito antes da captura e eutanásia. Entretanto, Barrat et al. (2008) não explicam a presença de *N. caninum* em fígado e/ou coração de roedores com tecido cerebral negativo, e sugerem que estudos envolvendo

roedores de vida livre devem pesquisar diversos órgãos além do cérebro. Relatam ainda que estudos como o de Jenkins et al. (2007) e Hughes et al. (2006) podem ter tido resultados subestimados por terem analisado somente o tecido cerebral.

No presente estudo foram analisados cérebro e coração dos roedores capturados e todas as 12 amostras de 10 roedores com resultado positivo ao *N. caninum* pela *nested* PCR Nc5 provinham de tecido cerebral.

A ampla diferença na escolha dos *primers* pelos diversos grupos de pesquisa também interfere no resultado produzido. Hughes et al. (2006) testaram camundongos e ratos capturados na área urbana de Manchester (Reino Unido) por *nested* PCR Nc5, combinando diferentes *primers* aos previamente publicado por Bazler et al. (1999). Concluíram que a técnica descrita por Bazler et al. (1999) mostrou ser quatro vezes menos sensível para detecção de DNA de *N. caninum* quando utilizada na presença de certa quantidade de DNA do hospedeiro. Concluíram ainda que diferentes espécies de hospedeiros podem possuir diferentes densidades do parasita, o que pode requerer modificações nos protocolos das técnicas diagnósticas utilizadas na dependência da espécie hospedeira em questão. Isso pode explicar os resultados falso positivos para *N. caninum* obtidos no presente estudo, que também utilizou os *primers* do protocolo de Bazler et al. (1999).

Jenkins et al. (2007) estudaram a presença de *N. caninum* em 347 roedores (242 *Rattus norvegicus* e 105 *Mus musculus*) capturados nos EUA e no Caribe comparando resultados obtidos por *nested* PCR direcionadas aos genes Nc5 e ITS1. Nos camundongos, DNA de *N. caninum* foi detectado em 10 animais pelo gene Nc5 e em 23 pela *nested* PCR ITS1, sendo nove para ambos os genes. Nos ratos houve detecção em 166 animais pela *nested* PCR Nc5, 70 pela *nested* PCR ITS1 e 96 para ambos os testes. Entretanto, foi realizado bioensaio em gerbis e não houve soroconversão nem foi encontrado cisto de *N. caninum* em nenhum deles. Os autores confirmam não terem uma explicação para a grande diferença de resultados encontrada entre os dois testes e entre estes e o resultado do bioensaio. Também não foi realizado sequenciamento ou qualquer outra técnica que confirmasse se as seqüências encontradas eram realmente de *N. caninum,* fato que parece ser imprescindível quando da utilização de *nested* PCR Nc5 como técnica diagnóstica em pequenos roedores.

7 CONCLUSÕES

Pelos resultados encontrados no presente estudo pôde-se concluir que:

- ✓ Roedores urbanos da Grande São Paulo (SP) parecem ter papel limitado na cadeia epidemiológica da toxoplasmose na área estudada

- ✓ O isolado obtido de *Rattus norvegicus* da Grande São Paulo apresentou genótipo anteriormente descrito em animais domésticos do estado de São Paulo

- ✓ A *nested* PCR B1 não deve ser utilizada como única técnica para detecção de DNA de *T. gondii* em roedores

- ✓ A *nested* PCR Nc5 não deve ser utilizada como única técnica para detecção de DNA de *N. caninum* em roedores

8 REFERÊNCIAS

AFONSO, E.; THULLIEZ, P.; PONTIER, D.; GILOT-FROMONT, E. Toxoplasmosis in prey species and consequences for prevalence in feral cats: not all prey species are equal. **Parasitology**, v.134, p.1963-1971, 2007.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M.L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.684-689, 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 of Parasitology**, v.34, p.1185-1196, 2004.

ANTSAKLIS, A.; DASKALAKIS, G.; PAPANTONIOU, N.; MENTIS, A.; MICHALAS, S. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Prenatal Diagnosis**, v.22, p.1107–1111, 2002.

ARAUJO, F. G.; WILLIAMS, D. M.; GRUMET, F. C.; REMINGTON, J. S. Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. **Infection and Immunity**, v. 13, p. 1528, 1976.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; WILKEN de ABREU, A.M.; AZEVEDO-SILVA, J.; ORE´FICE, F. Toxoplasmosis in southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.133–136, 2001.

BARR, B.C.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; REYNOLDS, J.P.; WELLS, S.J. Neosporosis: its prevalence and economic impact. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.20, p.1-16, 1998.

BARRATT, J.; AL QASSAB, S.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. The development and evaluation of a *nested* PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni*in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p.228–233, 2008.

BARUZZI, R.G. Contribution to the study of the toxoplasmosis epidemiology. Serologic survey among the Indians of the Upper Xingu River, Central Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.12, p.93-104, 1970.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E., KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of. *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v.87, n.3. p.612-618, 2001.

BASZLER, T.V.; GAY, L.J.C.; LONG, M.T.; MATHISON, B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.4059-4064, 1999.

BECK, H.P.; BLAKE, D.; DARDÉ, M.L.; FELGER, I.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M.; PUTIGNANI, L.; SHIELS, B.; TAIT, A.; WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites**. International Journal of Parasitology**, v.39, n.2, p.175-189, 2009.

BERDOY, M.; WEBSTER, J.P.; MACDONALD, D.W. Parasite altered behaviour: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific? **Parasitology**, v.111, p.403-409, 1995.

BEVERLEY, J.K.A. Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. **Nature**, v.183, p.1348-1349, 1959.

BJERKAS, I.; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Zeitschrift für Parasitenkunde** (Berlin, Germany), v.70, p.271-274, 1984.

BRADSHAW, J.W.S. The evolutionary basis for the feeding behaviour of domestic dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*). The Waltham International Nutritional Sciences Symposia. **The Journal of Nutrition**, supl. p. 1927-1931, 2006.

BRADSHAW, J.W.S.; THORNE, C.J. Feeding behaviour. *In*: THORNE, C. editor **The Waltham book of dog and cat behaviour**. Oxford, Pergamon, p.115-129, 1992

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle de roedores.** Brasília, 2002. 132p.

BRILLHART, D.B.; FOX, L.B.; DUBEY, J.P.; UPTON, S.J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild mammals in Kansas. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v.61, p.117–121, 1994.

BRISIGHELLI NETO, A. **Prevalência da toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista, São Paulo**. São Paulo 1998. 98 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1998.

BURG, J.L.; GROVER, C.M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J.C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polimerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.8, p.1787-1792, 1989.

BURRIDGE, M.J.; BIGLER, W.J.; FORRESTER, D.J., HENNEMANN, J.M. Serologic survey for Toxoplasma gondii in wild animals in Florida. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v.175, n.9, p.964-967, 1979.

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; THOMSON, K.M.RAE, A.G.; INNES, E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.118, p.267-279, 1998.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.6, n.3, p.117-118, 1964.

CAÑÓN-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.115, p.71-74, 2003.

CANOVA, L.; FASOLA, M. Food habits and trophic relationship of small mammals in six habitats of the northern Po plain (Italy). **Mammalia**, v.57, p.188-189, 1993.

CHABBERT E, LACHAUD L, CROBU L, BASTIEN P. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of toxoplasma in amniotic fluid, blood, and tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p.1719-1722, 2004.

CHAMPS, D.C.; PELLOUX, H.; DECHELOTTE, P.; GIRAUD, J.C.; BALLY, N.; AMBROISE-THOMAS, P. *Toxoplasma gondii* infection in rats by the RH strain: inoculum and age effects. **Parasite**, v.5, n.3, p.215-218, 1998.

CHESSUM, B. S. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. **British Veterinary Journal**, v. 128, p. 33-36, 1972.

CHI, J.; VANLEEUWEN, J.A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G.P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medicine**, v.55, p.137-153, 2002.

CHILDS, J. E. Size-dependent predation on rats (*Rattus norvegicus*) by house cats (*Felis catus*) in an urban setting. **Journal of Mammals**, v. 67, p. 196, 1986.

CHILDS, J.E.; SEEGAR, W.S. Epidemiologic observations on infection with *Toxoplasma gondii* in three species of urban mammals from Baltimore, Maryland, USA. **International Journal of Zoonoses**, v.13, n.4, p.249-261, 1986.

CHINCHILLA, M. Epidemiology of toxoplasmosis in Costa Rica: the importance of domestic rodents. **Revista de Biologia Tropical**, Suppl.1, p.113-124, 1978.

CLARK, D. P.; RUSSEL, L. D. **Molecular Biology – made simple and fun**, Cache River Press, Illinois, USA, p. 235-268, 1997.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARNICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals. **Laboratory Animals**, v.30, n.4, p.293-316, 1996.

CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F.. Restriciton-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v. 77, p. 266-268, 1991

COLLANTES-FERNANDEZ, E.; LOPEZ-PEREZ, I.; ALVAREZ-GARCIA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Temporal distribution and parasite load kinetics in blood and tissues during *Neospora caninum* infection in mice. **Infection and Immunity**, v.74, p.2491-2494, 2006.

CONTINI, C.; CULTRERA, R.; SERACENI, S.; SEGALA, D.; ROMANI, R.; FAINARDI, E.; CINQUE, P.; LAZZARIN, A.; DELIA, S. The role of stage specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS. **Journal of Medical Microbiology**, v.51, p.879–890, 2002.

COOK, A.J.C.; GILBERT, R.E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P.A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A.E.; DUNN, D.T. Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case control study. **British Medical Journal**, v.321, p.142–147, 2000.

COX, J.C.; EDMONDS, J.W.; SHEPHERD, R.C. Toxoplasmosis in the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in Victoria, Australia with suggested mechanisms for dissemination of oocysts. **Journal of Hygiene**, v.87, p. 331–337, 1981.

DABRITZ, H.A.; MILLER, A.M.; GARDNER, I.A.; PACKHAM, A.E.; ATWILL, E.R.; CONRAD, P.A. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in wild rodents from central coastal California and a review of *T. gondii* prevalence in rodents. **Journal of Parasitology**, v.94, n.3, p.675-683, 2008.

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

DeROEVER-BONNET, H. Congenital Toxoplasma infections in mice and hamsters infected with avirulent and virulent strains. **Trop Geograph Med**., v.21, p.443-450, 1969.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. **New England Journal of Medicine**, v.290, p.1110–1116, 1974.

DUBEY, J.P. Feline toxoplasmosis and coccidiosis: a survey of domiciled and stray cats. **Journal of the American Veterinary Medical Asociation**, v.162, p.873-877, 1973.

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

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

DUBEY, J.P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. **Journal of Parasitology**, v.82, n.6, p.951-956, 1996.

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

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

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

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

DUBEY, J. P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.69–75, 2006.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal of Parasitology**, v.32, p.929-946, 2002.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man.** CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-40, 1988.

DUBEY, J.P.; BHAIYAT, M.I.; MACPHERSON, C.N.; DE ALLIE, C.; CHIKWETO, A.; KWOK, O.C.; SHARMA, R.N. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, v.92, n.5, p.1107-1108, 2006.

DUBEY, J.P.; BROWN, C.A.; CARPENTER, J.L.; MOORE, J.J. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.305–309, 1992.

DUBEY J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American veterinary Medical Association**, v.192, p.1269-1285, 1988.

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

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

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

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

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v.77, n.1, p.1-32, 1998.

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

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

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

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H; FARIAS, N.A.d.R.; RUAS, J.L.; dos SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Biological and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens 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, p.182-188. 2007.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in cats fed *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Journal of The American Veterinarian Medical Association**, v. 194, p. 1297-1299, 1989.

DUBEY, J.P.; WEIGEL, R.M.; SIEGEL, A.M.; THULLIEZ, P.; KITRON, U.D.; MITCHELL, M.A.; MANNELLI, A.; MATEUS-PINILLA, N.E.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.; TODD, K.S. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. **Journal of Parasitology,** v.81, n.5, p.723-729, 1995.

EBERHARD, T. Food habits of Pennsylvania house cats. **Journal of Wildlife Management,** v.8, p.284-286, 1954.

ELLIS, J.T.; MCMILLAN, D.; RYCE, C.; PAYNE, S.; ATKINSON, R.; HARPER, P.A. Development of a single tube nested Polymerase Chain Reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA**. International Journal for Parasitology**, v.29, p.1589-1596, 1999a.

ELLIS, J.T.; MORRISON, D.A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; MOHAMMED, O.B.; RYCE, C.; DUBEY, J.P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v.118, p.357-362, 1999b.

FERRARONI, J..J.; LACAZ, C.S. Prevalência de anticorpos contra os agentes causadores da hepatite, malária, sífilis e toxoplasmose em cinco populações. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.24, p.155-161, 1982.

FERREIRA, A.D.M.; VITOR, R.T.G.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.6, p.22-31, 2006.

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGLIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.346–349, 2007

FREYRE, A.; FALCÓN, J.; MENDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; VENZAL, J.M.; MORGADES D. Fetal Toxoplasma infection after oocyst inoculation of pregnant rats. **Parasitology Research**, v.89, n.5, p.352-353, 2003.

GENNARI, S.M.; YAI, L.E.O.; D'ÁURIA, N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.177-179, 2002.

GLASNER, P.D.; SILVEIRA, C.; KRUSZON-MORAN, D.; MARTINS, M.C.; BURNIER, J.R. M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M.E.; NUSSENBLATT, R.B.; KASLOW, R.A.; BELFORT, J.R.R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v.114, p.136–144, 1992.

GONDIM, L.F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v.22, p.247–252, 2006.

GRIGG, M.E.; GANATRA, J.; BOOTHROOYD, J.C.; MARGOLIS, T.P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v.184, p.633-639, 2001.

GUIMARÃES, A.C.; KAWARABAYASHI, M.; BORGES, M.M.; TOLEZANO, J.E.; ANDRADE JR, H.F.; Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, p.479-483, 1993.

GUSTAFSSON, K.; UGGLA, A.; JARPLID, B. *Toxoplasma gondii* infection in the mountain hare (Lepus timidus) and domestic rabbit (Oryctolagus cuniculus). **Journal of Comparative Pathology**, v.117, p351–360, 1997.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser**., v.41, p.95-98, 1999.

HASLER, B.; REGULA, G.; STARK, K.D.C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.230-253, 2006a.

HASLER, B.; STARK, K.D.C.; SAGER, H.; GOTTSTEIN, B.; REIST, M. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Suiss dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, p.254-283, 2006b.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1, p.41-61, 2005.

HOLMDAHL, O.J.M.; MATTSSON, J.G. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer 1. **Parasitology**, v.112, p.177-182, 1996.

HOMAN, W.L.; LIMPER, L.; VERLAAN, M.; BORST, A.; VERCAMMEN, M.; VAN KNAPEN, F. Comparison of the Internal Transcribed Spacer, ITS1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitology Research**, v.83, p.285-289, 1997.

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

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v.35, p.283-290, 2004.

HUBBS, E.L. Food habits of feral house cats in the Sacramento valley. **California Fish and Game**, v.37, p.177-189, 1951.

HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.N.; TERRY, R.S.; MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, G. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v.132, p.29-36, 2006

HUTCHISON, W.M.; BRADLEY, M.S.; CHEYNE, B.; WELLS, B.W.P.; HAY, J. Behavioural abnormalities in Toxoplasma infected mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.74, p.337-345, 1980.

INNES, E.A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology and Microbiology Infection Diseases**, v.20, n.2, p.131-138, 1997.

ISSAC-RENTON, J.; BOWIE, W.R.; KING, A.; IRWIN, G.S.; ONG, C.S.; FUNG, C.P.; SHOKEIR, M.O.; DUBEY, J.P. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, n.64, p. 2278-2280, 1998.

JENKINS, M.C.; ELLIS, J.T.; LIDDELL, S.; RYCE, C.; MUNDAY, B.L.; MORRISON, D.A.; DUBEY, J.P. The relantionship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidian as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. **Parasitology**, v.119, p.135-142, 1999.

JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.2, p.161-165, 2007.

JOSEPH, P.; CALDERON, M.M.; GILMAN, R.H.; QUISPE, M.L.; COK, J.; TICONA, E.; CHAVEZ, V.; JIMENEZ, J.A.; CHANG, M.C.; LOPEZ, M.J.; EVANS, C.A. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4499–4503, 2002.

JOSS, A.W.L.; CHATTERTON, J.M.W.; EVANS, R.; HO-YEN, D.O. Toxoplasma polymerase chain reaction on experimental blood samples. **Journal of Medical Microbiology**, v.18, p.38-41, 1993.

KAUFMANN, H.; YAMAGE, M.; RODITI, I.; DOBBELAERE, D.; DUBEY, J.P.; HOLMDAHL, O.J.; TREES, A.; GOTTSTEIN, B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, p.289-297, 1996.

KAWAZOE, U. Toxoplasma gondii. *In:* NEVES, D.P.; MELO, A.L., GENARO, O.; LINARDI, P.M. (eds). **Parasitologia humana**, 9 edição, Atheneu, São Paulo, p.174-187, 1995.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A.L.; RIZZO, L.V.; BELFORT Jr, R.; VITOR, R.W.A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L.D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.942-949, 2006.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C.; MACKEY, A.J.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; PAULSEN, I.T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J.C.; PFEFFERKORN, E.R.; DUBEY, J.P.; AJIOKA, J.W.; ROOS, D.S.; WOOTTON, J.C.; SIBLEY, L.D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.2980-2992, 2005.

LAPPIN, M. R.; BUSH, D. J.; REDUKER D. W. Feline serum antibody responses to *Toxoplasma gondii* and characterization of target antigens. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 1, p. 73-80, 1994.

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. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.4, p.107-114. 2004.

LEHMANN, T.; MARCET, P.L.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.L.; DUBEY, J.P. Globalization and the population structure of Toxoplasma gondii. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.103, p.11423-11428, 2006.

LESER, P.G.; CAMARGO, M.E.; BARUZZI, R. Toxoplasmosis serologic tests in Brazilian Indians (kren-akore) of recent contact with civilized man. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.19, p.232-236, 1977.

LEWIS, J.S.; KHOURY, H.; STORCH, G.A.; DIPERSIO, J. PCR for the diagnosis of toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. **Expert Reviews in Molecular Diagnostics**, v.2, p.616–624, 2002.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L; DUBEY, J. P. Feline toxoplasmosis and the importance of the *Toxoplasma gondii* oocyst. **The Compendium for the Continuing Education**, v. 19, n. 4, p. 448-461, 1997

LOVELACE, J.K.; MORAES, M.A.P.; HAGERBY, E. Toxoplasmosis among the Ticuna Indians in the state of Amazonas, Brazil. **Tropical and Geographical Medicine**, v.30, p.295-300, 1977.

LUCAS, S. R. R., HAGIWARA, M. K.; LOUREIRO, V. S.; IKESAKI, J. Y. H.; BIRGEL, E. H. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatients cats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 41, p. 221-224, 1999.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v.84, p.983-991, 1998.

MARSHALL, P. A.; HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; SMITH, J.E.; MURPHY, R.G.; HIDE, G. Detection of high levels of congenital transmition of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. **Parasitology**, v.128, p.39-42, 2004.

McGARRY, J.W.; STOCKTON, C.M.; WILLIAMS, D.J.L.; TREES, A.J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. **Journal of Parasitology**, v.89, p.628-630, 2003.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food related illnessand death in the United States. **Emergent Infectious Diseases,** v.5, p.607-625, 1999.

MEIRELES, L.R.; GALISTEO, A.J.; POMPEU, E.; ANDRADE JR, H.F. *Toxoplasma gondii* spreading in na urban area evaluated by seroprevalence in free-living cats and dogs. **Tropical Medicine and International Health**, v.9, n.8, p.876-881, 2004.

MOLSHER, R.; NEWSOME, A.; DICKMAN, C. Feeding ecology and population dynamics of the feral cat (*Felis catus*) in relation to the availability of prey in central-eastern New South Wales. **Wildlife Research**, v.26, p.593-607, 1999.

MONTEIRO, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; PENA, H.F.J.; SOUZA, P.; FUNADA, M.R.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SREEKUMAR, C.; KEID, L.B.; SOARES, R.M. Molecular phylogenetic analysis in *Hammondia*-like organisms based on partial Hsp-70 coding sequences. **Parasitology**, v.134, p.1195-1203, 2007.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMIREZ, C.; FUENTES, I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v.160, p.159-162, 2009.

MOREIRA, L.M.O. **Sorologia para toxoplasmose em uma população de gestantes da cidade de Salvador.** Salvador, 1988. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Salvador. 1988.

MORSY, T.A.; SABRY, A.H.; HABIB, K.S., ARAFA, M.A.; BAHRAWY, A.F.; DAKHIL, M.M. Antibodies against toxoplasma in commensal rodents trapped in Riyadh Region, Saudi Arabia**. Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.24, n.2, p.279-284, 1994.

MURPHY, R.G.; WILLIAMS, R.H.; HUGHES, J.M.; HIDE, G.; FORD, N.J.; OLDBURY, D.J. The urban house mouse (*Mus domesticus*) as a reservoir of infection for the human parasite *Toxoplasma gondii*: an unrecognised public health issue? **International Journal of Environment and Health Research**, v.18, n.3, p.177-185, 2008.

NETO, E.C.; ANELE, E.; RUBIM, R.; BRITES, A.; SCHULTE, J.; BECKER, D.; TUUMINEN, T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. **International Journal of Epidemiology**, v.29, p.941–947, 2000.

OLIVEIRA, B.C. **Toxoplasmose: perfil sorológico durante a gravidez e repercussões neonatais em maternidade pública de referência na cidade de Belém do Pará.** São Paulo 2002. Dissertação (mestrado). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo. 2002.

OWEN, M.R.; CLARKSON, M.J.; TRESS, A.J. Diagnosis of Toxoplasma abortion in ewes by polymerase chain reaction. **The Veterinary Record**, v.142, n.17, p.445-448, 1998.

OWEN, M.R.; TREES, A.J. Vertical transmission of Toxoplasma gondii from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. **Parasitology**, v.116, p.299-304, 1998.

PATITUCCI, A.N.; PHIL, M.; PÉREZ, M.J.; ROZAS, M.A.; ISRAEL, K.F. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos em poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. **Arch. Med. Vet**., v.33, p.227-232, 2001.

PAULA, V.S.O. **Avaliação de uma reação em cadeia pela polimerase para detecção de *Neospora caninum* em fetos bovinos**. 2003. 72 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, v.26, p.347-351, 1996.

PEDREIRA, D.A.L. **Contribuição ao estudo da toxoplasmose congênita.** São Paulo 1995. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.

PENA, H.F.J. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de Toxoplasma gondii (Nicolle e 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.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of Toxoplasma gondii in Brazil. **International Journal of Parasitology**, v.38, p.561-569, 2008.

PORTO, A.M.F.; AMORIM, M.M.R.; COELHO, I.C.N.; SANTOS, L.C. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes atendidas em maternidade. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v.54, n.3, p. 242-248, 2008.

RAGOZO, A.M.A. **Isolamento e caracterização biológica e genotípica de *Toxoplasma gondii* de ovinos e caprinos.** 2007. 114 p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

REICHEL, M.P. *Neospora caninum* infectious in Australia and New Zealand. **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.258-261, 2000.

REMINGTON, J.S.; JACOBS, L.; MELTON, M.L. Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. **Journal of Infectious Diseases**, v.108, p.163-173, 1961.

REMINGTON, J.S.; KRAHENBUHL Immunology of *Toxoplasma gondii*. In: NAHMIAS, A.J.; O'REILLY, J.; editors. **Immunology of human infection**, Part II. New York: Plenum Publishing Corporation. P.327-371, 1982.

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. e Klein, J.O. (eds) **Infectious Disease of the Fetus and Newborn**, 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., p.205–346, 2001.

RENOLD, C.; SUGAR, A.; CHAVE, J.P.; PERRIN, L.; DELAVELLE, J.; PIZZOLATO, G.; BURKHARD, P.; GABRIEL, V.; HIRSCHEL, B. Toxoplasma encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Medicine**, v.71, p.224–239, 1992.

REY, L.C., RAMALHO, I.L.C. Soroprevalência da toxoplasmose em Fortaleza, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p.171-174, 1999.

ROBERTS, T.; FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, p.249–256, 1990.

ROBERTS, T.; MURRELL, K.D.; MARKS, S. Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. **Parasitology Today**, v.10, p.419–423, 1994.

ROMANO, A.; TRISCIUOGLIO, A.; GRANDE, D.; FERROGLIO, E. Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.159-161, 2009.

RUFFOLO, B.B.; NAVARRO, I.T.; GARCIA, J.L.; BUGNI, F.M.; SANTOS, R.T.; HAYDU, V.B.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii* in urban rats and seroprevalence in contacting dogs, Londrina city, Brazil. **Proceedings of Toxoplasma Centennial Congress**, p.109, 2008.

RUIZ, A.; FRENKEL, J.K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.29, n.6, p.1161-1166, 1980.

SAEIJ, J.P.J.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends Parasitology**, v.21, p.476-481, 2005.

SANTOS, M.G.S.; ALVES, J.C.M.; ALBUQUERQUE, J.O.M.; RIBEIRO, A.E.F.; DICEZARE, B.J.; PREGUN, M.A.; RIBEIRO, G.C.; MAIS, E.; GARCIA, N. Índice de infestação predial por roedores no município de São Paulo. **Anais do 11º Congresso Mundial de Saúde Pública e 8º Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva**, 2006 (Cd-rom)

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2nd Edition. Cold Spring Habour, Laboratory Press, New York, 1989.

SEDLAK, K.; LITERAK, I.; PAVLASEK, I.; BENAK, J. Susceptibility of common voles to experimental toxoplasmosis. **Journal of Wildlife Diseases,** v.37, p.640–642, 2001.

SERPELL, J.A. The domestication and history of the cat. *In*: TURNER, D.C.; BATESON, P. editors. **The domestic cat: the biology of its behaviour**. Cambridge, Cambridge University Press, p.151-158, 1988

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature (London)**, v. 359, 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:* **Molecular Biology of Parasitic Protozoa**. SMITH, D. F.; PARSONS, M. (eds.). Oxford University Press, Oxford, U. K., p. 55-74, 1995.

SILVA, A.V.; LANGONI, H. Kinetics of serum antibody in *Rattus norvegicus* experimentally infected with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. **Vet. e Zootec**., v.12, n.1/2, p.69-76, 2005.

SLAPETA, J.R.; KOUDELA, B.; VOTYPKA, J.; MODRY, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. **The Veterinary Journal**, v.163, p. 147-154, 2002.

SMITH, J.L. Long term consequences of foodborne toxoplasmosis: effects on the unborn, the immunocompromised, the elderly and the immunocompetent. **Journal of Food Protection**, v.60, n.4, p.1595-1611, 1997.

SMITH, D.D.; FRENKEL, J.K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmition. **Journal of Wildlife Diseases**, v.31, n.1, p.15-21, 1995.

SOBRAL, C.A.; AMENDOEIRA, M.R.R.; TEVA, A.; PATEL, B.N. & KLEIN, C.H. Seroprevalence of infection with *Toxoplasma gondii* in indigenous Brazilian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p.37-41, 2005.

STELLA, J.H. **Rastreamento pré-natal para toxoplasmose na rede básica de saúde em Campinas: prevalência dos diferentes perfis sorológicos e comparação da rotina vigente uma nova proposta.** Campinas 2004. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal of Parasitology**, v.36, p.841-848, 2006.

SUNDERMAN, C.A.; ESTRIDGE, B.H. Growth and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1725-1732, 1999.

TENTER, A..M. Current knowlwdge on the epidemiology of infectious with Toxoplasma **Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine**, v.23, p. 391, 1999.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1217–1258, 2000.

TENTER, A. M.; JOHNSON, A. M. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. **Advances in Parasitology**, v. 39, p. 69-139, 1997.

THEIRMANN, E. Transmission congenital del *Toxoplasma gondii* en ratas con infección leve. **Biológica (Santiago)**, v.23, p.59-67, 1957.

TURNER, D. C.; BATESON, P. B. **The Domestic Cat. The Biology of its Behaviour**. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2000

TURNER, D.C.; MEISTER, O. Hunting behaviour of the domestic cat. *In*: TURNER, D.C.; BATESON, P. editors **The domestic cat: the biology of its behaviour**. Cambridge, Cambridge University Press, p.111-121, 1988

2000 REPORT OF THE AVMA PANEL ON EUTHANASIA, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n.5, p.670-695, 2001.

VAN VALKENBURGH, B. Carnivore dental adaptations and diet: a study os trophic diversity within guilds. *In*: GUITTLEMAN, J.L. editor **Carnivore behaviour, ecology and evolution**. London: Chapman e Hall, p.410-436, 1989.

VARELLA, I.S.; WAGNER, M.B.; DARELA, A.C.; NUNES, L.M.; MÜLLER, R.W. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. **Jornal de Pediatria**, v.79, p.69-74, 2003.

VAZ, A.J.; GUERRA, E.M.; FERRATO, L.C.C.; TOLEDO, L.A.S.; AZEVEDO NETO, R.S. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e Doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em centros de Saúde de área metropolitana, Brasil. **Revista de Saúde Pública,** v.24, p.373-379, 1990.

VYAS, A.; KIM, S.K.; GIACOMINI, N.; BOOTHROYD, J.C.; SAPOLSKY, R.M. Behavioural changes induced by Toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.104, p.6442-6447, 2007.

WAPENAAR, W.; JENKINS, M.C.; O'HANDLEY, R.M.; BARKEMA, H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). **Journal of Parasitology** 92, 1270–1274, 2006.

WASTLING, J.M.; NICOLL, S.; BUXTON, D. Comparison of 2 gene amplification methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected sheep**. Journal of Medical Microbiology**, v.38, p.360-365, 1993.

WEBSTER, J.P. Prevalence and transmition of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, p.407-411, 1994.

WILLIAMS, R.H.; MURPHY, R.G.; HUGHES, J.M.; HIDE, G. The urban house mouse, *Mus domesticus*, and its role in the transmission of *Toxoplasma gondii* infection. *In*: LEE, C.Y.; ROBINSON, W.H.; editors. **Proceedings of the 5th International Conference on Urban Pests**. Singapore. P.357-367, 2005a.

WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; HUGHES, J.M.; DUNCANSON, P.; TERRY, R.S.; SMITH, J.E.; HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. **Parasitology**, v.130, p.301-307, 2005b.

YAI, L.E.O. **Avaliação da infecção experimental por *Toxoplasma gondii* (Nicole e Manceaux, 1909) em suínos pelas provas de bioensaio em camundongos e reação em cadeia pela polimerase.** São Paulo 2000. 71 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2000.

YAI, L.E.O. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *T. gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do estado de São Paulo**. São Paulo 2007. 137p. Dissertação (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.

YAI, L.; RAGOZO, A.; AGUIAR, D.; DAMACENO, J.; OLIVEIRA, L.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Isolation of *Toxoplasma gondii* from capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo state, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.94, n.5, p.1060-1063, 2008.

YAMAGE, M.; FLECHNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally- infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v.82, p.272–279, 1996.

ZENNER, L.; DARCY, F.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M.F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. **Experimental Parasitology,** v. 90, p.86-94, 1998.

ANEXOS

Anexo A- Roedores capturados na Grande São Paulo (SP) de acordo com a identificação, espécie e origem dos mesmos. São Paulo - 2009

nº roedor	espécie	origem
01	*Rattus rattus*	Zona norte SP
02	*Rattus rattus*	Zona norte SP
03	*Rattus rattus*	Zona norte SP
04	*Rattus rattus*	Zona norte SP
05	*Rattus rattus*	Zona norte SP
06	*Rattus rattus*	Zona norte SP
07	*Rattus rattus*	Zona norte SP
08	*Rattus rattus*	Zona norte SP
09	*Rattus rattus*	Zona norte SP
10	*Mus musculus*	Zona norte SP
11	*Rattus rattus*	Zona norte SP
12	*Rattus rattus*	Zona norte SP
13	*Rattus rattus*	Zona norte SP
14	*Rattus rattus*	Zona norte SP
15	*Rattus rattus*	Zona norte SP
16	*Rattus rattus*	Zona norte SP
17	*Rattus rattus*	Zona norte SP
18	*Rattus rattus*	Zona norte SP
19	*Rattus rattus*	Zona norte SP
20	*Rattus norvegicus*	Zona oeste SP
21	*Rattus rattus*	Zona norte SP
22	*Rattus rattus*	Zona norte SP
23	*Rattus rattus*	Zona norte SP
24	*Rattus rattus*	Zona norte SP
25	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
28	*Rattus rattus*	Zona norte SP
29	*Rattus rattus*	Zona norte SP
30	*Rattus rattus*	Zona norte SP
31	*Rattus rattus*	Zona norte SP
32	*Rattus rattus*	Zona norte SP
33	*Rattus rattus*	Zona norte SP
34	*Rattus rattus*	Zona norte SP
35	*Rattus rattus*	Zona norte SP
36	*Rattus rattus*	Zona norte SP
37	*Rattus rattus*	Zona norte SP
38	*Rattus rattus*	Zona norte SP
39	*Rattus rattus*	Zona norte SP
40	*Rattus rattus*	Zona norte SP
41	*Rattus rattus*	Zona norte SP
42	*Rattus rattus*	Zona norte SP
43	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
44	*Rattus rattus*	Zona norte SP
45	*Rattus rattus*	Zona norte SP
46	*Rattus rattus*	Zona norte SP
47	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
48	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
49	*Rattus rattus*	Zona norte SP
50	*Rattus rattus*	Zona norte SP
51	*Rattus rattus*	Zona norte SP
52	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
53	*Rattus rattus*	Zona norte SP
54	*Rattus rattus*	Zona norte SP

Anexo A – continuação

nº roedor	espécie	origem
55	*Rattus rattus*	Zona norte SP
56	*Rattus rattus*	Zona norte SP
57	*Rattus rattus*	Osasco
58	*Rattus rattus*	Zona norte SP
59	*Rattus rattus*	Zona norte SP
60	*Rattus rattus*	Zona norte SP
61	*Rattus rattus*	Zona norte SP
62	*Rattus rattus*	Zona norte SP
63	*Rattus rattus*	Zona norte SP
64	*Rattus rattus*	Zona norte SP
65	*Rattus rattus*	Zona oeste SP
66	*Rattus rattus*	Zona oeste SP
67	*Mus musculus*	Zona oeste SP
68	*Rattus rattus*	Zona norte SP
69	*Rattus rattus*	Zona norte SP
70	*Rattus norvegicus*	Zona central SP
71	*Rattus rattus*	Zona norte SP
72	*Rattus rattus*	Zona norte SP
73	*Rattus norvegicus*	Zona central SP
74	*Rattus rattus*	Zona central SP
75	*Rattus norvegicus*	Zona central SP
76	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
77	*Rattus norvegicus*	Zona central SP
78	*Rattus rattus*	Zona norte SP
79	*Rattus norvegicus*	Zona central SP
80	*Rattus rattus*	Zona central SP
81	*Rattus rattus*	Zona central SP
82	*Rattus rattus*	Zona norte SP
83	*Rattus rattus*	Zona norte SP
84	*Rattus rattus*	Zona norte SP
85	*Rattus rattus*	Zona norte SP
86	*Rattus rattus*	Zona norte SP
87	*Rattus rattus*	Zona norte SP
88	*Rattus norvegicus*	Zona norte SP
89	*Rattus rattus*	Zona oeste SP
90	*Rattus rattus*	Zona oeste SP
91	*Rattus rattus*	Zona norte SP
92	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
93	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
94	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
95	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
96	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
97	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
98	*Rattus rattus*	Zona Central SP
99	*Rattus rattus*	Zona Leste SP
100	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
101	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
102	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
103	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
104	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
105	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
106	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
107	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
108	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
109	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP

Anexo A – continuação

nº roedor	espécie	origem
110	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
111	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
112	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
113	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
114	*Rattus rattus*	Zona Leste SP
115	*Mus musculus*	Zona Norte SP
116	*Rattus rattus*	Zona Leste SP
117	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
118	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
119	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
120	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
121	*Mus musculus*	Zona Norte SP
122	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
123	*Rattus rattus*	Zona Leste SP
124	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
125	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
126	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
127	*Rattus rattus*	Carapicuíba
128	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
129	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
130	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
131	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
132	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
133	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
134	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
135	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
136	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
137	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
138	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
139	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
140	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
141	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
142	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
143	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
144	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
145	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
146	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
147	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
148	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
149	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
150	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
151	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
152	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
153	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
154	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
155	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
156	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
157	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
158	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
159	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
160	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
161	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
162	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
163	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
164	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP

Anexo A – continuação

nº roedor	espécie	origem
165	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
166	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
167	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
168	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
169	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
170	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
171	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
172	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
173	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
174	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
175	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
176	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
177	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
178	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
179	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
180	*Rattus norvegicus*	Zona Oeste SP
181	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
182	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
183	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
184	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
185	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
186	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
187	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
188	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
189	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
190	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
191	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
192	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
193	*Rattus rattus*	Zona Norte SP
194	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
195	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
196	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
197	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
198	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
199	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP
200	*Rattus rattus*	Zona Leste SP
201	*Rattus rattus*	Guarulhos
202	*Rattus norvegicus*	Zona Norte SP
203	*Rattus norvegicus*	Zona Norte SP
204	*Rattus rattus*	Guarulhos
205	*Rattus rattus*	Zona Leste SP
206	*Rattus rattus*	Osasco
207	*Rattus rattus*	Osasco
208	*Rattus rattus*	Osasco
209	*Rattus rattus*	Osasco
210	*Rattus rattus*	Jandira
211	*Rattus norvegicus*	Jandira
212	*Rattus norvegicus*	Jandira
213	*Rattus rattus*	Guarulhos
214	*Rattus rattus*	Guarulhos
215	*Rattus rattus*	Guarulhos
216	*Rattus rattus*	Guarulhos
217	*Rattus rattus*	Jandira
218	*Rattus norvegicus*	Jandira
219	*Rattus norvegicus*	Jandira

Anexo B – Quantidade de alíquotas de tecido cerebral dos roedores capturados na Grande São Paulo (SP), utilizadas para extração de DNA, segundo a espécie e origem dos mesmos. São Paulo - 2009

nº roedor	espécie	origem	nº alíq. de tec. cér. DNA extr.
92	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
93	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
94	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
95	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	4
96	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
97	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
98	*Rattus rattus*	Zona Central SP	3
99	*Rattus rattus*	Zona Leste SP	4
100	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	2
101	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
102	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	2
103	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
104	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
112	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
113	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
114	*Rattus rattus*	Zona Leste SP	4
115	*Mus musculus*	Zona Norte SP	1
116	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
117	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
118	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
119	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
120	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
121	*Mus musculus*	Zona Norte SP	1
122	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
123	*Rattus rattus*	Zona Leste SP	3
124	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
125	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
126	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
127	*Rattus rattus*	Carapicuíba	3
128	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
129	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
130	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
131	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
132	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
133	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
134	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
135	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
136	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
137	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
138	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
139	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
140	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
141	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	2
142	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	3
143	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	2
144	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
145	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
146	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
147	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4

Anexo B – continuação

nº roedor	espécie	origem	nº alíq. de tec. cér. DNA extr.
148	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
149	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
150	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
151	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
152	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
153	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
154	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
155	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
156	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
157	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
158	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
159	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
160	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
161	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
162	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
163	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
164	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
165	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
166	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
167	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
168	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
169	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
170	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
171	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
172	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
173	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
174	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
175	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
176	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
177	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
178	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
179	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
180	*Rattus norvegicus*	Zona Oeste SP	4
181	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
182	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
183	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
184	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
185	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
186	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
187	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
188	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
189	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
190	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
191	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
192	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	1
193	*Rattus rattus*	Zona Norte SP	2
194	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	4
195	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
196	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	3
197	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2

Anexo B – continuação

nº roedor	espécie	origem	nº alíq. de tec. cér. DNA extr.
198	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
199	*Rattus rattus*	Zona Oeste SP	2
200	*Rattus rattus*	Zona Leste SP	4
201	*Rattus rattus*	Guarulhos	4
202	*Rattus norvegicus*	Zona Norte SP	4
203	*Rattus norvegicus*	Zona Norte SP	4
204	*Rattus rattus*	Guarulhos	4
205	*Rattus rattus*	Zona Leste SP	4
206	*Rattus rattus*	Osasco	4
207	*Rattus rattus*	Osasco	4
208	*Rattus rattus*	Osasco	4
209	*Rattus rattus*	Osasco	4
210	*Rattus rattus*	Jandira	4
211	*Rattus norvegicus*	Jandira	4
212	*Rattus norvegicus*	Jandira	4
213	*Rattus rattus*	Guarulhos	4
214	*Rattus rattus*	Guarulhos	4
215	*Rattus rattus*	Guarulhos	4
216	*Rattus rattus*	Guarulhos	4
217	*Rattus rattus*	Jandira	4
218	*Rattus norvegicus*	Jandira	4
219	*Rattus norvegicus*	Jandira	4