Patrícia de Oliveira Esmerini

**Isolamento e detecção molecular de *Toxoplasma gondii*
(Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos
comercializados no mercado de peixes do município de
Santos no estado de São Paulo**

São Paulo
2009

Patrícia de Oliveira Esmerini

**Isolamento e detecção molecular de *Toxoplasma gondii*
(Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos
comercializados no mercado de peixes do município de
Santos no estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena

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.2097
FMVZ

Esmerini, Patrícia de Oliveira

Isolamento e detecção molecular de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos comercializados no mercado de peixes do município de Santos no estado de São Paulo / Patrícia de Oliveira Esmerini. – São Paulo : P. O. Esmerini, 2009.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) - 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: Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Oocistos. 3. Ostras. 4. Mariscos. 5. Brasil.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii* em moluscos bivalves da Baixada Santista do Estado de São Paulo", protocolado sob o nº1006/2006, utilizando 200 (duzentos) camundongos, sob a responsabilidade da Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, 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 em reunião de 12/12/06".

(We certify that the Research "Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in shellfish from Baixada Santista from São Paulo State, Brazil", protocol number 1006/2006, utilizing 200 (two hundred) mice, under the responsibility of Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 12/12/2006).

São Paulo, 13 de dezembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome do autor: Esmerini, Patrícia de Oliveira

Título: Isolamento e detecção molecular de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos comercializados no mercado de peixes do município de Santos no estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

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

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

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

DEDICATÓRIA

*“O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que têm medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno.”*

Willian Shakespeare

Aos meus pais (Marcos e Lori) pelo incentivo, apoio, amor e oportunidade de realizar esse mestrado.

Ao meu irmão, Marcos pelo carinho, ajuda e paciência.

Ao meu namorado, Baiardo pela ajuda nos momentos difíceis, me incentivando a não desistir quando tudo parecia tão difícil, pelo amor, carinho, compreensão, ficando ao meu lado quando eu mais precisei.

Aos meus animais, que sempre ficaram ao meu lado, me dando todo o carinho, amor e atenção, nessa fase difícil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram na conclusão deste trabalho, tanto de forma direta quanto indireta.

À Deus por ter me proporcionado tudo isso.

“Rir é correr risco de parecer tolo, chorar é correr o risco de parecer sentimental, estender a mão é correr o risco de se envolver, expor seus sentimentos é correr o risco de mostrar seu verdadeiro eu.

Defender seus sonhos e idéias diante da multidão é correr o risco de perder as pessoas, amar é correr o risco de não ser correspondido, viver é correr o risco de morrer, confiar é correr o risco de se decepcionar, tentar é correr o risco de fracassar. Mas os riscos devem ser corridos, porque o maior perigo é não arriscar nada. Há pessoas que não correm nenhum risco, não fazem nada, não têm nada e não são nada,

Elas podem até evitar sofrimentos e decepções, mas elas não conseguem nada, não sentem nada, não mudam, não crescem, não amam, não vivem. Acorrentadas por suas atitudes, elas viram escravas, privam-se de sua liberdade, Somente a pessoa que corre riscos é livre!”

Sêneca

A Dra. Hilda de Fátima Jesus Pena pelo apoio, paciência em solidariedade nesse período de realização deste trabalho.

À minha amiga Luciana pelos momentos de risadas e descontração quando tudo parecia tão difícil.

À Minha amiga Guacy pela amizade, pelas palavras de conforto, paciência e pelas corridas em volta da USP, ajudando um pouco a aliviar a tensão.

À Profa. Dra. Solange Maria Gennari pela oportunidade de realizar esse mestrado, pelas lições de vida, pela bondade e amizade.

À todos os professores do Departamento de Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, especialmente ao prof. Rodrigo Martins Soares pela paciência em me ensinar os conceitos sobre biologia molecular

“É mais fácil obter o que se deseja com um sorriso do que à ponta da espada”

William Shakespeare

A todo o pessoal da Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À secretária Tânia Delonero, da Secretaria de Pós Graduação do departamento de Epidemiologia experimental e Aplicada às Zoonoses pela paciência.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com freqüência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar”

William Shakespeare

Ao amigo Renato Caravieri por toda a ajuda ao abrir minhas ostras e mariscos, pela amizade, pelas piadas e conversas.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pelo apoio financeiro para execução deste trabalho (processo

“Se vives de acordo com as leis da natureza, nunca serás pobre; se vives de acordo com as opiniões alheias, nunca serás rico.”

Sêneca

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”
(Fernando Pessoa)

RESUMO

ESMERINI, P. O. **Isolamento e detecção molecular de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos comercializados no Mercado de Peixes do município de Santos no estado de São Paulo.** [Isolation and molecular detection of *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) from marine bivalves shellfish from the Fish Market in Santos city, São Paulo state, Brazil]. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial. O *Toxoplasma gondii* infecta o Homem e a maioria dos animais homeotérmicos. A ingestão de oocistos esporulados é uma das formas de transmissão desse protozoário. Oocistos de *T. gondii* podem esporular na água do mar e manter a infectividade por até seis meses. Moluscos bivalves podem filtrar e reter oocistos de *T. gondii* da água do mar em condições experimentais. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *T. gondii* em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e mariscos (*Mytella guayanensis*) em condições naturais. Um total de 300 ostras e 300 mariscos foram adquiridos no Mercado de Peixes do município de Santos no estado de São Paulo no período de 05/03/2008 a 29/08/08 e divididos em 60 grupos de cinco ostras e 20 grupos de 15 mariscos. Para o isolamento do parasita, cinco camundongos foram inoculados oralmente com homogenados dos tecidos de cada grupo de ostras ou mariscos. Para a detecção molecular, o DNA dos tecidos dos mariscos foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e o das ostras, pelo método de isotiocianato de guanidina. Em seguida, foi realizada a nested-PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) baseada na amplificação de um fragmento de 155pb do gene B1 de *T. gondii*. A genotipagem das amostras de *T. gondii* detectadas foi feita usando a PCR-RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição) usando os marcadores SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, CS3 e Apico. Não houve isolamento do parasita pelo bioensaio em camundongos. Nos grupos de mariscos, o *T. gondii* não foi detectado pela n-PCR e, nos grupos de ostras, houve detecção do *T. gondii* em dois grupos (3,3%). Não foi possível a genotipagem das amostras de *T. gondii* detectadas. O presente estudo permitiu concluir que ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* podem filtrar e reter oocistos de *T. gondii* e que o ambiente marinho do litoral do estado de São Paulo encontra-se contaminado com oocistos desse parasita. Assim, o consumo de ostras cruas pode representar uma potencial via de transmissão de *T. gondii* para o Homem e para os animais marinhos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Oocistos. Ostras. Mariscos. Brasil

ABSTRACT

ESMERINI, P. O. **Isolation and molecular detection of *Toxoplasma gondii* (Nicole and Manceaux, 1909) from marine bivalves shellfish from the Fish Market in Santos city, São Paulo state, Brazil.** [Isolamento e detecção molecular de *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) de moluscos bivalves marinhos comercializados no Mercado de Peixes do município de Santos no estado de São Paulo]. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis. *Toxoplasma gondii* is widely prevalent in humans and other mammals. This protozoan parasite can be transmitted by ingestion of sporulated oocysts. *T. gondii* oocysts can sporulate in seawater and retain their infectivity for at least six months. Experimentally, bivalve mollusks can filter and retain *T. gondii* oocysts from the seawater. The aim of this study was to investigate the presence of *T. gondii* in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and mussels (*Mytella guayanensis*) in natural conditions. A total of 300 oysters and 300 mussels were acquired from the Fish Market in Santos city, São Paulo state, from March 2008 to August 2008, and divided in 60 groups of five oysters and 20 groups of 15 mussels. To isolate the parasite, five mice were orally inoculated with tissue homogenates from each group of oysters or mussels. For molecular detection of *T. gondii*, DNA from mussels was extracted using a standard phenol-chloroform method and DNA from oysters was extracted using the guanidine isothiocyanate method. A nested-PCR (Polymerase Chain Reaction) based on the amplification of a 155bp fragment from B1 gene of *T. gondii* was then performed. Eleven PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markers including SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, CS3 e Apico were used to genotype positive samples. There was no isolation of the parasite by bioassay in mice. *T. gondii* was not detected in the groups of mussels by n-PCR. There was detection of *T. gondii* by n-PCR in two groups of oysters (3.3%). Genotyping of these two positive samples was not successful. The results indicate that oysters of the species *Crassostrea rhizophorae*, the commonest species from the coast of São Paulo, can filter and retain *T. gondii* oocysts and that the marine environment of the coast of São Paulo state is contaminated with oocysts of this parasite. The ingestion of raw oysters can represent a potential transmission source of *T. gondii* to humans and marine mammals.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Oocysts. Oysters. Mussels. Brazil

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando fragmentos de 155 pb obtidos na nested-PCR baseada no gene B1 de *Toxoplasma gondii*. Linhas 1, 3, 5 e 7: controles negativos; linhas 2 e 8: controles positivos; linha 4: grupo de ostras G19 e linha 6: grupo de ostras G59. M: marcador de peso molecular de 50pb.....55
- Figura 2 – Análise de similaridade de sequência de nucleotídeos de 155 pb usando o programa netBLAST.....56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos grupos de moluscos durante a fase de padronização.....	36
Quadro 2 – Sequência de bases dos primers utilizados nas reações de PCR e nested-PCR para amplificação de fragmentos do gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	40
Quadro 3 – Ciclos empregados para amplificação de fragmentos de DNA do gene B1 de <i>Toxoplasma gondii</i>	41
Quadro 4 – Distribuição dos grupos de mariscos na fase experimental para isolamento e detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em condições naturais, segundo o peso (g) dos tecidos.....	44
Quadro 5 – Distribuição dos grupos de ostras na fase experimental para isolamento e detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em condições naturais, segundo o peso (g) dos tecidos.....	44
Quadro 6 – Informações referentes aos marcadores genéticos e endonucleases utilizados na PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de amostras de <i>Toxoplasma gondii</i> detectadas em ostras adquiridas no Mercado de Peixes do município de Santos, estado de São Paulo.....	48
Quadro 7 – Amostras clonais Tipos I, II e III e outras amostras de referência de <i>Toxoplasma gondii</i> que foram utilizadas como controles positivos na PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de amostras de <i>T. gondii</i> detectadas em ostras adquiridas no Mercado de Peixes do município de Santos, estado de São Paulo.....	49
Quadro 8 – Ciclos empregados na realização da PCR-RFLP Multilocal.....	50

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Número de camundongos infectados pelo *Toxoplasma gondii* após inoculação oral com tecidos de mariscos e ostras contaminados experimentalmente com oocistos, segundo a diluição de oocistos e o grupo de moluscos. São Paulo, 2008.....52
- Tabela 2 – Detecção de *T. gondii* na nested-PCR em amostras de tecidos de moluscos contaminados experimentalmente com oocistos do parasita, segundo a diluição dos oocistos, o grupo de moluscos e o método de extração de DNA empregado. São Paulo, 2008.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma
μl	microlitros
BLAST	basic local alignment search tool
dATP	desoxiadenosina trifosfatada
dCTP	desoxicitidina trifosfatada
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
dGTP	desoxiguanosina trifosfatada
DNA	ácido desoxirribonucléico
DSP	diarrhoeic shellfish poison
dTTP	desoxitimidina trifosfatada
EDTA	ácido dietilenodiaminotetracético
et al	e colaboradores
FC	fenol-clorofórmio
FITC	fluorescein isothiocyanate
g	aceleração da gravidade terrestre
g	grama
GT	guanidine isothiocianate
HCl	ácido clorídrico
IgG	imunoglobulina G
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	bicromato de potássio
KCl	cloreto de potássio
KH_2PO_4	dihidrogenofosfato de potássio
M	molar
MgCl_2	cloreto de magnésio

mL	mililitros
mM	milimolar
mm ²	milímetros quadrados
N	normal
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
n-PCR	nested-PCR
NSP	neurotic shellfish poison
P.I.	pós-inoculação
pb	pares de base
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PPS	paralytic shellfish poison
ppt	parts per thousand
q.s.p	quantidade suficiente para
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
SDS	sulfato dodecil de sódio
TBE	tris-borato + EDTA
TE	tris-HCl + EDTA
U	unidade internacional
v	volume

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
x	vezes
—	menos
`	minuto
``	segundo
=	igual
{ }	colchetes
+	mais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	MOLUSCOS BIVALVES MARINHOS.....	32
4.2	PROCESSAMENTO DOS MOLUSCOS.....	32
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.3.1	Fase de Padronização.....	33
4.3.1.1	OBTENÇÃO DE OOCISTOS INFECTANTES DE <i>T. gondii</i>	34
4.3.1.2	PROCESSAMENTO DOS OOCISTOS DE <i>T. gondii</i>	34
4.3.1.3	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS.....	35
4.3.1.4	ANÁLISE MOLECULAR.....	37
4.3.1.4.1	<i>Protocolos de Extração</i>	37
4.3.1.4.2	<i>PCR e nested-PCR</i>	40
4.3.1.4.3	<i>Análise do Produto Amplificado</i>	42
4.3.2	Fase Experimental.....	42
4.3.2.1	MOLUSCOS BIVALVES – AMOSTRAGEM.....	42
4.3.2.2	BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS.....	43
4.3.2.3	ANÁLISE MOLECULAR.....	45
4.3.2.3.1	<i>Análise por sequenciamento</i>	46
4.3.2.3.2	<i>PCR-RFLP Multilocal</i>	47

5	RESULTADOS	52
5.1	FASE DE PADRONIZAÇÃO.....	52
5.2	FASE EXPERIMENTAL.....	53
5.2.1	Bioensaio em camundongos.....	54
5.2.2	Análise molecular.....	54
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma das infecções parasitárias mais comuns acometendo o Homem e, virtualmente, todas as espécies de mamíferos e aves na maior parte do mundo (DUBEY; BEATTIE, 1988; REMINGTON; MCLEOD; DESMONTS, 1995). Estima-se que até um terço da população humana no mundo tenha sido exposta ao *Toxoplasma gondii*.

O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, e os três meios primários para sua difusão são a transmissão transplacentária, a ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes e a ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos esporulados. Atualmente, não há métodos que determinem se um hospedeiro se infectou pela ingestão de cistos teciduais ou de oocistos esporulados (DUBEY, 1994; DUBEY, 2001; BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Os gatos, incluindo os Felidae selvagens, além de serem hospedeiros intermediários, são os únicos animais reconhecidos como hospedeiros definitivos do *T. gondii*, desempenhando um papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose, pois excretam os oocistos de *T. gondii* nas fezes (DUBEY; BEATTIE, 1988; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Normalmente, o *T. gondii* parasita o hospedeiro sem causar sinais clínicos, mas leva à formação de cistos latentes que podem persistir durante a vida do indivíduo. Os maiores problemas clínicos da toxoplasmose referem-se à infecção primária durante a gestação, que pode resultar em infecção congênita do feto, levando a quadros neurológicos e oculares em crianças, assim como abortamento e mortalidade neonatal em ovinos, caprinos e suínos, causando perdas econômicas; destaca-se também a reativação de infecções latentes em indivíduos imunossuprimidos, acarretando quadros clínicos severos e às vezes fatais (DUBEY; BEATTIE, 1988; LÜDER; GROSS, 1998; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Recentemente, estudos têm demonstrado que os isolados de *T. gondii* do Brasil são biologicamente e geneticamente diferentes dos isolados da América do Norte e Europa (DUBEY et al., 2007a,b; PENA et al., 2008). A genotipagem desses isolados tem revelado uma alta diversidade genética. Quatro genótipos foram considerados como linhagens clonais comuns no Brasil. Essas linhagens foram designadas como Tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV (PENA et al., 2008).

A presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi relatada em várias espécies de animais marinhos. Lambourn, Jeffries e Dubey (2001) encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em focas nos Estados Unidos. Golfinhos soropositivos foram encontrados na Espanha (CABEZÓN et al., 2004), na Califórnia (DUBEY et al., 2003) e no Japão (MURATA et al., 2004). A toxoplasmose congênita foi diagnosticada em golfinhos do Pacífico (JARDINE; DUBEY, 2002). O *T. gondii* também foi diagnosticado por meio de exame histopatológico em elefante-marinho da Califórnia por Dubey, Lipscomb e Mense (2004) e em foca-monge do Havaí por Honnold et al. (2005).

Segundo Lindsay et al. (2003), animais invertebrados, como os moluscos bivalves, podem atuar como agentes foréticos de oocistos de *T. gondii*, os quais podem entrar no ambiente marinho através da água das chuvas e esgotos. Os moluscos bivalves podem filtrar grandes volumes de água e concentrar partículas (GRACZYK et al., 1999). Partículas orgânicas e micro-organismos como diatomáceas e protozoários, respectivamente, podem ser filtrados quando em suspensão na água, sendo este alimento aprisionado em muco sobre as brânquias dos moluscos bivalves (STORER; USINGER, 1976).

Estudos experimentais mostraram que as ostras são capazes de remover oocistos de *T. gondii* da água do mar e reter sua infectividade em camundongos (LINDSAY et al., 2001). Lindsay et al. (2003) observaram que os oocistos de *T. gondii* podem esporular na água do mar e infectar hospedeiros intermediários, permanecendo viáveis por até seis meses neste ambiente.

Protozoários como *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma* podem contaminar as praias e, alcançando o ambiente marinho, seriam filtrados e concentrados pelos moluscos bivalves, infectando hospedeiros marinhos, e possivelmente o Homem, ao serem ingeridos, resultando em morbidade e mortalidade nessas populações (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- O isolamento de *T. gondii* de moluscos bivalves marinhos (ostras e mariscos) comercializados no Mercado de Peixes do município de Santos no estado de São Paulo.
- A detecção molecular de *T. gondii* nos moluscos bivalves adquiridos.
- A caracterização genotípica das amostras de *T. gondii* isoladas e/ou detectadas nesses animais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Toxoplasma gondii

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

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

Nos hospedeiros intermediários, após a infecção com qualquer dos estágios infectantes, há a multiplicação rápida dos taquizoítas por endodiogenia em diferentes tipos de células, culminando na formação dos cistos teciduais. Os cistos contêm bradizoítas, que são estágios que se dividem lentamente, também por endodiogenia, e se localizam predominantemente no cérebro e musculatura cardíaca e esquelética, persistindo por um longo período, provavelmente por toda a vida do hospedeiro (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY; FRENKEL, 1976; DUBEY; BEATTIE, 1988).

Os felinos são considerados as espécies-chave na transmissão do *T. gondii* para o Homem e outras espécies animais por serem os únicos hospedeiros a excretarem os oocistos nas fezes (DUBEY; BEATTIE, 1988). Um único gato pode eliminar até 10 milhões de oocistos, que se tornam infectantes após esporulação no ambiente (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a; FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970). Há relatos de surtos de toxoplasmose no Homem, derivados da ingestão de oocistos (BOWIE et al., 1997; BAHIA-OLIVEIRA, 2003).

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

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

O processo de esporulação dos oocistos no ambiente leva de dois a cinco dias e depende de temperatura, umidade e aeração adequadas (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a; JACKSON; HUTCHISON, 1989). Os oocistos esporulados são muito resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis por até 18 meses (FRENKEL; RUIZ; CHINCHILLA, 1975; DUBEY; BEATTIE, 1988), além de serem também muito resistentes aos desinfetantes (DUBEY; BEATTIE, 1988). Oocistos de *T. gondii* podem ser inativados quando submetidos a 70°C por pelo menos 10 minutos (ITO et al., 1975; SHIMURA; ITO; TSUNODA, 1984).

No estado de São Paulo, a presença de anticorpos anti-*T. gondii* foi relatada em 26,3% (SILVA et al., 2002) e 35,4% (PENA et al., 2006) dos gatos domésticos examinados.

Recentemente, o *T. gondii* foi reconhecido como causa de encefalite em animais marinhos, particularmente em lontras. Na Califórnia, anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 42% de 116 lontras vivas e em 62% de 107 lontras encontradas mortas (MILLER et al., 2002). O primeiro relato de toxoplasmose em

golfinho foi no Rio de Janeiro, Brasil (BANDOLI; OLIVEIRA, 1977). Posteriormente, foram reportados casos de toxoplasmose em golfinhos na Flórida, tendo sido examinados 47 animais, todos positivos pelo MAT (CRUICKSHANK et al., 1990; INSKEEP et al., 1990); na Espanha, a toxoplasmose foi confirmada em quatro de 110 golfinhos soropositivos (DOMINGO et al., 1992), sendo este relato baseado na análise histológica de glândula adrenal de animais mortos. Cole et al. (2000) isolaram 18 amostras de *T. gondii* a partir dos cérebros de leões-marinhos da Califórnia, sendo 11 soropositivos, e Miller et al. (2001) isolaram *T. gondii* de 51 focas do Pacífico. Dubey et al. (2003) encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em todas as espécies de animais marinhos examinadas (lontras, morsas, leões-marinhos, golfinhos e várias espécies de focas) com soropositividade de 5,6 a 100%, com exceção da *Phoca fasciata* e das baleias belugas.

No Japão, foi encontrada uma soroprevalência de 4% (3/372) em *Phoca* spp (FUJII et al., 2007).

Os dados sobre a toxoplasmose em animais marinhos brasileiros são ainda muito incipientes. Silva et al. (2000) examinaram 12 peixes-bois marinhos (*Trichechus manatus manatus*) e encontraram um animal soropositivo (8,3%), sendo este o primeiro relato de ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em animais dessa espécie no Brasil.

Cole et al. (2000) sugeriram que os animais marinhos adquirem a infecção por *T. gondii* através da ingestão de invertebrados, que atuariam como agentes foréticos para os oocistos de *T. gondii*. Segundo os autores acima, fezes de gato contendo oocistos de *T. gondii* poderiam entrar no ambiente marinho por meio da água das chuvas. Já foi observada uma correlação positiva entre a presença de enchentes na costa marinha americana e a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em lontras, com o parasita sendo encontrado em 15 de 67 lontras marinhas sorologicamente testadas. Nesse caso, o consumo de oocistos pelas lontras pode ter ocorrido devido à contaminação direta da água ou pelo consumo de invertebrados atuando como agentes foréticos (MILLER et al., 2001).

Lindsay et al. (2003) estudaram a esporulação e a resistência dos oocistos esporulados na água do mar. A esporulação dos oocistos foi testada em ácido sulfúrico 2%, 15 ppt e 32 ppt de água do mar. Os camundongos inoculados oralmente com oocistos que esporularam em ácido sulfúrico, 15 ppt e 32 ppt desenvolveram toxoplasmose aguda e morreram seis a oito dias pós-inoculação.

Desta maneira, os autores acima concluíram que esses oocistos esporulam na água do mar e mantêm a infectividade para os hospedeiros intermediários. Essa infectividade seria mantida por até seis meses nas condições de salinidade da água do mar.

Por sua importância médica e veterinária, o *T. gondii* tem sido o parasita mais intensamente estudado entre as coccídias. No entanto, muitos aspectos de sua biologia, ciclo biológico e epidemiologia continuam sendo investigados, destacando-se a utilização de métodos moleculares.

A variabilidade genética entre os isolados de *T. gondii* de indivíduos aparentemente saudáveis e doentes tem sido recentemente pesquisada. Na população humana da Guiana Francesa e Suriname, casos severos de toxoplasmose em pacientes imunocompetentes têm sido relacionados a amostras de *T. gondii* com características genéticas pouco usuais (AJZENBERG et al., 2004; DEMAR et al., 2007). No Brasil, suspeita-se que a ocorrência elevada de toxoplasmose clínica ocular no município de Erechim, Rio Grande do Sul, esteja também relacionada a características dos isolados predominantes (GLASNER et al., 1992; KHAN et al., 2006, 2007).

Diversas investigações com isolados brasileiros de *T. gondii*, de diferentes regiões e hospedeiros, demonstraram que esse parasita apresenta uma população altamente diversa e geneticamente diferente daquela da América do Norte e Europa, onde apenas três linhagens predominam sobre vastas áreas geográficas (LEHMANN et al., 2004; DUBEY et al., 2006; FERREIRA et al., 2006; KHAN et al., 2006; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007a, b; PENA et al., 2008). A tipagem genética clássica (Tipos I, II e III) de isolados de *T. gondii* usando um único marcador, particularmente o SAG2, foi baseada em uma estrutura populacional clonal incomum dessas amostras da América do Norte e Europa (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995).

Su, Zhang e Dubey (2006) desenvolveram uma PCR-RFLP multilocal com marcadores capazes de distinguir os tipos clonais dos não-clonais, mostrando a diversidade genética do parasita com resolução similar ao sequenciamento genético.

Até o presente momento, pela utilização da técnica de PCR-RFLP multilocal, são reconhecidos quatro genótipos clonais mais prevalentes entre os 308 isolados brasileiros, incluindo 151 isolados de galinhas (DUBEY et al., 2008), 19 isolados de cães (DUBEY et al., 2007a), 74 isolados de gatos (PENA et al., 2008), 16 isolados

de ovinos (comunicação pessoal¹), 10 isolados de caprinos (comunicação pessoal¹) e 36 isolados de capivaras (comunicação pessoal²). Estes quatro genótipos clonais foram denominados como Tipos BrI (36 isolados), BrII (18 isolados), BrIII (21 isolados), BrIV (oito isolados). Foi identificado ainda um novo grupo formado por 10 isolados de galinhas de diferentes estados do Nordeste (DUBEY et al., 2008). Os tipos clonais clássicos I (um isolado) e III (11 isolados) ocorrem com baixa frequência no Brasil e nenhum tipo clonal II foi identificado nesses 308 isolados brasileiros de diferentes hospedeiros e regiões estudados até agora. Além disso, mais de 50 outros genótipos foram identificados.

Moluscos bivalves – morfologia e fisiologia

As informações sobre a morfologia e fisiologia básica dos moluscos bivalves foram extraídas de Rupert e Barnes (1996).

A classe Bivalvia (sinonímia Pelecypoda ou Lamellibranchia) abrange animais como mariscos e ostras. Os bivalves são comprimidos nas laterais e possuem uma concha composta de duas valvas, encaixadas em dobradiça dorsalmente, envolvendo todo o corpo. O pé é lateralmente comprimido, dando origem ao nome pelecypoda, que significa “pé-machadinha”. A cabeça é mal desenvolvida e a cavidade do manto é mais espaçosa do que qualquer classe de moluscos. As brânquias são geralmente muito grandes, tendo assumido na maioria das espécies uma função de coleta de alimento além da realização de troca gasosa. Essas alterações permitiram aos bivalves tornarem-se escavadores de fundos macios, para o qual a compressão lateral do corpo é bem adequada.

Alguns malacologistas acreditavam que os bivalves evoluíram de uma classe extinta de moluscos chamada de rostrocônquios. O corpo dos rostrocônquios encerrava-se dentro de duas valvas de concha, mas não havia nenhuma dobradiça dorsal, ou seja, as duas metades da concha eram contínuas entre si através da superfície dorsal.

A classe Bivalvia contém três grupos principais, distintos pela natureza de suas brânquias: protobrânquios, lamelibrânquios e septibrânquios. Esses grupos eram antigamente considerados subclasses, acreditando-se que os protobrânquios

¹ informação fornecida por Ragozo et al. em São Paulo no ano de 2007. Dados não publicados.

² informação fornecida por Yai et al em São Paulo no ano de 2007. Dados não publicados.

sejam os mais primitivos bivalves existentes; os septibrânquios são muito especializados e os lamelibrânquios abrangem a maioria das espécies de bivalves.

Cada valva de bivalve possui uma protuberância chamada umbo, que surge acima da linha de articulação, sendo a parte mais antiga da concha. As duas valvas prendem-se por meio de uma faixa proteica elástica e não-calcificada, chamada de ligamento da dobradiça, que é recoberta na parte de cima pelo perióstio. O ligamento da dobradiça une as duas valvas, formando a concha.

Para evitar o deslizamento lateral, as duas valvas fecham-se juntas, por meio de dentes ou cristas localizados na linha da dobradiça das conchas, embaixo do ligamento. As valvas da concha são puxadas juntas por meio de dois grandes músculos dorsais (adutores).

A concha dos bivalves é composta de um perióstraco externo, que cobre de duas a quatro camadas calcárias. O perióstraco pode ser muito espesso, como em muitos mariscos de água doce, ou muito fino, como na ameijoia marinha comestível (*Mercenaria* spp). O perióstraco tem a função de secreção da concha, protege o carbonato de cálcio da dissolução e pode contribuir para o selamento firme quando as bordas são trazidas juntas no fechamento. As camadas calcárias podem ser completamente de aragonita (primitiva) ou uma mistura de aragonita e calcita, depositadas como tábuas diminutas, arranjadas em camadas (nácar); o nácar dá a superfície lustrosa a muitas conchas.

O manto projeta-se bastante do corpo e forma uma camada de tecido que se acomoda debaixo das valvas. A borda do manto possui três pregas: uma interna, que contém músculos radiais e circulares, uma média, que é sensorial em função, e a externa, que secreta a concha.

Antigamente, os bivalves eram escavadores rasos de substratos macios. Eles pertenciam ao grupo dos protobrânquios, que são representados por alguma das formas fósseis mais antigas e algumas espécies vivas, sendo consumidores de depósitos seletivos.

A alimentação por filtração evoluiu em alguns grupos de protobrânquios iniciais. Após esse desenvolvimento, seguiu-se uma evolução explosiva e os filtradores (lamelibrânquios) dominaram a fauna dos bivalves.

As brânquias e a corrente ventilatória dos bivalves se adaptaram à alimentação por filtração. Os bivalves podem processar grandes volumes de água por meio da atividade de filtração, chegando a 2,5 litros por bivalve por hora

(ROPER; HICKEY, 1995). À medida que os lamelibrânquios evoluíram, as partículas dos detritos e os micro-organismos na corrente ventilatória vieram a ser utilizados como fonte de alimentos; as brânquias tornaram-se filtros e os cílios branquiais, que serviram originalmente para manter as brânquias limpas, adaptaram-se para o transporte de partículas preás no muco do filtro para os palpos labiais e a boca.

A principal modificação dos lamelibrânquios para a filtração foi o alongamento e dobramento dos filamentos branquiais, que reduziram muito sua área superficial. Muitos filamentos foram acrescentados às brânquias de forma que estas se estenderam anteriormente, alcançando os palpos. Cada filamento branquial em cada lado do eixo dobrou-se ou assumiu a forma de “U”. Os filamentos dobrados e aumentados e a junção mútua dão à brânquia uma forma laminar, resultando no nome desses bivalves (lamelibrânquios ou brânquia laminar). Os cílios frontais transportam as partículas alimentares presas na superfície branquial verticalmente aos sulcos alimentares; os cílios abfrontais, agora do lado de dentro, se confundem na maioria dos filamentos e os cílios laterais ainda produzem a corrente de água através das brânquias. A brânquia mais especializada dos lamelibrânquios é conhecida como brânquia eulamelibrânquia.

A maioria dos lamelibrânquios alimenta-se de plâncton fino e de detritos suspensos. As partículas passam sobre os cílios dorsais, onde se prendem ao muco e se movem para cima ou para baixo na margem do filamento até um sulco alimentar. Quando existe muito sedimento na água, as brânquias se contraem colocando o filamento principal dentro das dobras. As lamelas palparem têm função de triagem e transporte, como nos protobrânquios. A triagem é feita por tamanho e peso. As partículas pequenas e leves são retidas para a ingestão e transportadas até a superfície palpar por meio das cristas ciliadas e as partículas grandes, destinadas à rejeição, são transportadas até a borda das lamelas nos sulcos entre as crostas e caem para o manto ou pé. Os materiais rejeitados são chamados de pseudofeces, provenientes tanto dos palpos como das brânquias, e deixam a cavidade do manto mais comumente através da abertura inalante.

Moluscos bivalves – Consumo alimentar

No Brasil, são encontradas por volta de 410 espécies de moluscos bivalves e existem 20.000 espécies no mundo (AMARAL; JABLONSKI, 2005). O consumo humano abrange principalmente mariscos e ostras. Os lamelibrânquios são consumidos vivos, cozidos, congelados e também crus, como no caso das ostras. Todo o conteúdo da concha, que é constituída de uma parte muscular (músculo adutor) é consumível, inclusive fígado, rins, coração, trato digestivo e aparelho genital, assim como a língua, pele, manto e brânquias. Quando ocorre a morte, o músculo adutor relaxa e as válvulas se abrem.

Os lamelibrânquios somente são comercializados vivos e morrem por cozimento. Os lamelibrânquios desprovidos de válvulas e cozidos congelam mais facilmente. Como resultado de seu modo de vida natural em regiões costeiras com abundantes águas residuais, os lamelibrânquios contêm elevadas taxas de agentes microbianos e se decompõem com rapidez quando mortos. Quando os lamelibrânquios são consumidos crus, devem-se tomar precauções higiênico-sanitárias. Por esse motivo, permanecem por 14 dias em água de mar filtrada e com baixa taxa de germes antes da sua utilização.

A flora microbiana dos lamelibrânquios é muito variada, sendo constituída por organismos como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Cytophaga*, além de micrococos, bacilos e enterobactérias. Ocorrem, regularmente, *Coli*, *Proteus* e *Serratia* e, ocasionalmente, salmonelas, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* e *Clostridium botulinum*, assim como alguns vírus (FEHLHABER; JANETSCHKE, 1992). Foi realizado um estudo com ostras e mariscos comercializados em restaurantes do Rio de Janeiro, nos quais foram isoladas diversas espécies de *Vibrio* (PEREIRA; VIANA; RODRIGUES, 2007).

Os lamelibrânquios podem acumular substâncias tóxicas a partir de algas ingeridas como alimento (dinoflagelados peridínios). Por essa razão, a comercialização de moluscos é proibida nos meses de maio a outubro nos países do norte da Europa (FEHLHABER; JANETSCHKE, 1992).

Algumas toxinas como PSP (Paralytic Shellfish Poison), NSP (Neurotic Shellfish Poison), DSP (Diarrhoeic Shellfish Poison) são produzidas ao serem

ingeridos, causando enfermidades e mortalidade, com os quadros sintomáticos mais variados (FEHLHABER; JANETSCHKE, 1992).

Assim, o critério sanitário aplicado aos lamelibrânquios deve ser muito exigente. Os lamelibrânquios com sinais de alteração e anormalidades organolépticas, os que aparecem mortos e os produtos com alta carga microbiana, não são aptos à venda.

Moluscos bivalves – agentes foréticos de protozoários

Vários estudos já mostraram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia duodenalis* em moluscos bivalves. Na Galícia, Espanha, Freire-Santos et al. (2000) e Gómez Bautista et al. (2000) encontraram oocistos de *Cryptosporidium* em vários bivalves importantes para o consumo humano, como mariscos e ostras. Graczyk et al. (1999), ao analisarem moluscos de Chesapeake Bay, Maryland, Estados Unidos, concluíram que estes invertebrados podem indicar o índice de contaminação da água por oocistos de *Cryptosporidium*. Cistos de *Giardia duodenalis* Assemblages A e B já foram detectados em moluscos bivalves, como mariscos e ostras, na Espanha (GÓMES-COUSO et al., 2003).

Lindsay et al. (2001, 2004) demonstraram experimentalmente que ostras do leste (*Crassostrea virginica*), nos Estados Unidos, podem remover oocistos de *T. gondii* da água do mar e que esses oocistos são infectantes oralmente para camundongos. Assim, ostras cruas contaminadas poderiam servir como uma via de transmissão de *T. gondii* para animais marinhos e para o Homem.

RNA específico de *T. gondii* foi detectado em mariscos (*Mytilus galloprovincialis*) em torno de 21 dias pós-exposição experimental a oocistos de *T. gondii*, tendo sido detectado na glândula digestiva de 31 entre 35 moluscos examinados (89%). A infectividade do parasita foi confirmada em camundongos inoculados com qualquer tecido de molusco, mas só na glândula digestiva foram detectadas amostras que permaneceram positivas três dias pós-exposição (ARKUSH et al., 2003).

Na Itália, na região do mar Adriático, não foi detectado *T. gondii* nos moluscos bivalves estudados (*Mytilus galloprovincialis*, *Tapes philippinarum*, *Chamaelea*

gallinae, *Crassostrea gigas*), usando o gene B1 como marcador molecular na nested-PCR (SERACENI et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

4.1 MOLUSCOS BIVALVES MARINHOS

Os moluscos bivalves foram adquiridos, semanalmente, do Mercado de Peixes do município de Santos, estado de São Paulo, e divididos em dois grupos: ostras e mariscos. Estes moluscos foram classificados cientificamente no Instituto de Pesca de Santos como *Crassostrea rhizophorae* e *Mytella guayanensis*, respectivamente, de acordo com Rios (1994). Segundo informações fornecidas pelos comerciantes no local, os moluscos eram provenientes da região de Cananéia. Os bivalves foram transportados em sacola refrigerada até São Paulo e processados no mesmo dia. A cada semana foram adquiridos e processados dois a três grupos de ostras ou mariscos.

4.2 PROCESSAMENTO DOS MOLUSCOS

Inicialmente, foram utilizados grupos de 15 mariscos e grupos de 10 ostras. Posteriormente, os grupos de ostras foram alterados para cinco moluscos, devido ao volume e espessura do material.

As conchas foram lavadas em água corrente, abertas com a utilização de uma faca e os tecidos colocados em um béquer. Os béqueres contendo os tecidos de cada grupo foram pesados e, depois, homogeneizados com água destilada, sendo usado um

homogeneizador de uso doméstico, do tipo “mixer”, até serem totalmente dissolvidos.

Os homogenados de tecidos foram coados com uma gaze, distribuídos em tubos cônicos de 50mL e centrifugados a 4°C, 500 g, por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante era desprezado e o sedimento lavado duas vezes com tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM), pH 8,0, centrifugando-se a 4°C, 500 g, por 10 minutos. Os homogenados de tecidos de cada grupo foram então utilizados para o bioensaio em camundongos e para análise molecular. Três a cinco alíquotas de 1,0 a 1,5ml de cada amostra destinada à análise molecular foram armazenadas em freezer a -70°C até o processamento para obtenção de DNA.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi dividido em duas fases: fase de padronização e fase experimental propriamente dita. Na fase de padronização, os moluscos foram adquiridos no período de 05/01/2007 a 29/02/2008 e, para a fase experimental, foram adquiridos no período de 05/03/2008 a 29/08/08.

4.3.1 Fase de Padronização

Nesta fase, foi verificada a sensibilidade do bioensaio em camundongos para o isolamento do *T. gondii*, a eficácia de dois métodos de extração de DNA a partir dos moluscos e a sensibilidade da nested-PCR para detecção de DNA do parasita.

4.3.1.1 OBTENÇÃO DE OOCISTOS INFECTANTES DE *T. gondii*

Para a obtenção de oocistos de *T. gondii*, dois gatos com aproximadamente dois meses de idade, soronegativos (título <16) para anticorpos IgG anti-*T. gondii* pela RIFI (CAMARGO, 1964) foram utilizados.

Para o sorodiagnóstico, as amostras foram, primeiramente, incubadas a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida na diluição de 1:16. Após três lavagens por 10 minutos com PBS (NaCl 0,731M; KCl 0,027M; Na₂HPO₄ 0,105M; KH₂PO₄ 0,018M), pH 7,2, as lâminas foram secas e adicionou-se o conjugado¹ previamente diluído a 1:400 em solução de PBS, pH 7,2, contendo Azul de Evan 0,01%. O processo de incubação e lavagens foi repetido. Em todas as lâminas havia um soro controle positivo e outro negativo, os quais orientavam a interpretação da correspondente reação. Foi considerada como reação positiva a fluorescência total na superfície dos taquizoítas.

Cada gato ingeriu o cérebro de um camundongo cronicamente infectado com a amostra ME-49 (arquétipo II) de *T. gondii*. Esta amostra é mantida pelo Instituto de Medicina Tropical da USP e os camundongos foram gentilmente cedidos.

Exames coproparasitológicos diários dos gatos foram feitos usando a técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (g= 1,205) (OGASSAWARA; BENASSI, 1980). Os oocistos foram excretados do 5º ao 9º dia P.I.

4.3.1.2 PROCESSAMENTO DOS OOCISTOS DE *T. gondii*

As fezes positivas para oocistos de *T. gondii* foram distribuídas em placas de Petri com bicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) a 2% e mantidas em estufa a 25°C por sete dias para esporulação. Após este período, para a purificação, as fezes foram coadas com a seguinte série de tamises, usando-se água destilada para lavagem: coador de chá convencional, 65 malhas, 100 malhas, 200 malhas e 400 malhas/ polegada. Em seguida, o material coado foi deixado para sedimentar de um dia para o outro em

¹ Anti-Cat IgG FITC conjugate developed in goat, SIGMA®

cálices cônicos de 2000 mL, o sedimento foi distribuído em tubos cônicos de 50 mL, centrifugado a 4°C, 500 g, por 10 minutos, e lavado com água destilada até a eliminação do bicromato de potássio.

A contagem dos oocistos foi feita em câmara de Neubauer. A partir da contagem determinada, foram feitas diluições de 10^1 , 10^2 , 10^3 e $0,5 \times 10^4$ oocistos.

4.3.1.3 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

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

A sensibilidade do bioensaio para o isolamento do parasita em mariscos e ostras foi testada para as diluições de 10^1 , 10^2 , 10^3 e $0,5 \times 10^4$ oocistos.

Antes da homogeneização, os tecidos recolhidos dos mariscos ou ostras foram contaminados com oocistos nas diferentes diluições indicadas. Após o processamento, os homogenados foram inoculados oralmente em grupos de cinco camundongos (500µl/animal). A distribuição dos grupos de mariscos e ostras na fase de padronização pode ser observada no Quadro 1. Como controle, grupos de cinco camundongos foram inoculados somente com os oocistos, nas mesmas diluições (Quadro 1).

Os camundongos que vieram a óbito foram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito previamente (DUBEY; BEATTIE, 1988). Impressões de pulmão e fragmentos de cérebro foram examinados sob microscopia de luz, entre lâmina e lamínula, para pesquisa de estágios de *T. gondii* (taquizoítas e/ou cistos). Um fragmento de pulmão foi cortado, o excesso de sangue na superfície de corte foi removido e essa superfície foi aplicada sobre uma lâmina com algumas gotas de salina fisiológica 0,85%, cobrindo-se então com uma lamínula. Fragmentos de cérebro de 3,0-5,0mm² foram comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados para pesquisa de cistos.

Grupos	Identificação	Número de moluscos (peso em gramas)	Diluição de oocistos	Bioensaio (Número de camundongos inoculados)
Controles*	G1	0	$0,5 \times 10^4$	5
	G2	0	$0,5 \times 10^4$	5
	G3	0	10^3	5
	G4	0	10^3	5
	G5	0	10^2	5
	G6	0	10^2	5
	G7	0	10^1	5
	G8	0	10^1	5
Mariscos	G1	15 (64,2 g)	$0,5 \times 10^4$	5
	G2	15 (59,1 g)	$0,5 \times 10^4$	5
	G3	15 (73,4 g)	10^3	5
	G4	15 (58,9 g)	10^3	5
	G5	15 (79,6 g)	10^2	5
	G6	15 (86,8 g)	10^2	5
	G7	15 (78,1 g)	10^1	5
	G8	15 (80,1 g)	10^1	5
Ostras	G1	10 (122,4 g)	$0,5 \times 10^4$	5
	G2	10 (95,9 g)	$0,5 \times 10^4$	5
	G3	10 (89,8 g)	10^3	5
	G4	10 (126,6 g)	10^3	5
	G5	10 (119,1 g)	10^2	5
	G6	10 (100,2 g)	10^2	5
	G7	5 (50,0 g)	$0,5 \times 10^4$	5
	G8	5 (30,0 g)	10^3	5
	G9	5 (40,0 g)	10^2	5
	G10	5 (35,0g)	10^1	5

*somente oocistos

Quadro 1 – Distribuição dos grupos de moluscos durante a fase de padronização

Os camundongos sobreviventes foram examinados sorologicamente para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* dois meses P.I., por meio da RIFI (CAMARGO, 1964), na diluição de 1:16, conforme descrito no item 4.3.1.1, usando-se o conjugado apropriado². A colheita de sangue foi feita pelo plexo retro-orbital, após sedação dos camundongos com uma associação de quetamina 10% (100mg/kg) e xilazina 2,0% (10mg/kg) administrada pela via intraperitoneal. Após a colheita de

² Anti-mouse IgG FITC conjugate developed in sheep, SIGMA®

sangue, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os cérebros dos animais foram examinados da maneira descrita acima.

Foram considerados infectados com *T. gondii*, os camundongos em que estágios do parasita (taquizoítas e/ou cistos) foram encontrados em seus tecidos.

4.3.1.4 ANÁLISE MOLECULAR

Para evitar contaminações cruzadas, todo o material não descartável utilizado (vidraria, material cirúrgico), em todas as fases do experimento, foi submetido à fervura com água, lavagem com detergente neutro, enxágue em água corrente, imersão em HCl 0,1N por dois minutos, enxágue em água destilada e esterilização em forno a 180°C por duas horas. Com o mesmo propósito, as etapas de PCR, nested-PCR e eletroforese foram feitas em salas diferentes.

4.3.1.4.1 *Protocolos de Extração*

Foram testados dois protocolos de extração para ostras e mariscos durante a fase de padronização.

FENOL-CLOROFÓRMIO (FC)

Este método de extração de DNA é baseado nos protocolos de Ausubel et al. (1999).

Após o descongelamento, para cada grupo de ostra ou marisco, foram separados 500µL de cada alíquota armazenada. Para os grupos-controle de oocistos,

foram separados 100µL de cada diluição. Para a amostra RH (SABIN, 1941), usada como controle positivo em todo o experimento, foram utilizados 100µL de uma suspensão obtida de lavado peritoneal de camundongos infectados experimentalmente nos Laboratórios de Doenças Parasitárias-VPS-FMVZ-USP.

As amostras foram lavadas três a quatro vezes com tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM), pH 8,0, q.s.p. 1.500µL, centrifugando-se a 15.000 g por cinco minutos. Foi adicionado ao sedimento o tampão de extração (Tris-HCl 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; água ultrapura autoclavada). Em seguida, foi feito o congelamento das amostras em nitrogênio líquido por um minuto, seguido do descongelamento a 65°C por dois minutos (3×), para facilitar o rompimento da parede dos oocistos. Adicionaram-se 5µL de proteinase K (20µg/µl) e as amostras foram incubadas em banho-seco a 37°C durante quatro horas. Seguiu-se uma nova série de congelamento/descongelamento como descrito acima. Em seguida, foram adicionados 10µL de proteinase K e 50µL de SDS a 10%, para um volume final de 500µL.

As amostras foram então incubadas durante a noite em banho-seco a 37°C, com agitação automática de 15 segundos a cada 15 minutos.

Foi adicionado fenol tamponado (v/v) e o material foi centrifugado a 15.000 g por cinco minutos, após homogeneização. Foi recuperado o máximo de sobrenadante (fase aquosa).

Foram acrescentados fenol e clorofórmio (v/v) às amostras (v/v), que foram então homogeneizadas e centrifugadas a 15.000 g por cinco minutos, recuperando-se o sobrenadante.

Foi adicionado TE (v/v) e em seguida clorofórmio (v/v). Após nova homogeneização e centrifugação a 15.000 g por cinco minutos, foi recuperado o sobrenadante.

Para a insolubilização do DNA obtido, foi acrescentado etanol absoluto (2× o volume da amostra). Após homogeneização, as amostras foram deixadas durante a noite em freezer a -20°C.

As amostras foram centrifugadas a 4°C, 15.000 g por 25 minutos. Foi desprezado o sobrenadante e adicionado 1.000µL de etanol a 70%. Foi repetida a

centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os microtubos ficaram em posição invertida, até secarem completamente, em temperatura ambiente.

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

GT (Guanidine Isothiocyanate)

A extração de DNA foi realizada segundo descrito por Chomkzynski (1993), com algumas alterações, da maneira descrita a seguir.

Após o descongelamento, para cada grupo de ostra ou marisco, foram separados 500µL de cada alíquota armazenada. Para os grupos-controle de oocistos, foram separados 100µL de cada diluição. Para a amostra RH (SABIN, 1941) foram utilizados 100µL.

As amostras foram lavadas três a quatro vezes com tampão TE, pH 8,0, q.s.p. 1.500µL, centrifugando-se a 15.000 g por cinco minutos.

Para cada amostra dos moluscos foram adicionados 300µl de TE. Após homogeneização, foi feito o congelamento das amostras em nitrogênio líquido por um minuto, seguido do descongelamento a 65°C por dois minutos (5×), para facilitar o rompimento da parede dos oocistos. Foram adicionados 450µL de GT (isotiocianato de guanidina) e as amostras deixadas em repouso por 10 minutos, homogeneizando a cada 2,5 minutos.

Foram adicionados 100µL de clorofórmio, deixando dois minutos em repouso após homogeneização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo, recuperando-se o máximo de sobrenadante.

Após essa etapa, foram adicionados 600µL de propanol para insolubilizar o DNA, deixando no freezer a -20°C por duas horas ou durante a noite. As amostras foram então centrifugadas a 4°C, 12.000 g, por 15 minutos, desprezando-se a seguir, o

sobrenadante. Foram adicionados 800µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 4°C, 12.000 g, por cinco minutos.

O sobrenadante foi desprezado e os microtubos deixados em posição invertida até a completa secagem das amostras em temperatura ambiente. O pellet foi então ressuspenso com 30µl de TE e homogeneizado com pipeta. As amostras foram deixadas no banho-seco pré-aquecido a 56°C durante 15 minutos, após o que foram armazenadas em freezer -20°C até a amplificação.

4.3.1.4.2 PCR e nested-PCR

O DNA de *T. gondii* foi detectado pela n-PCR baseada em primers que amplificam um fragmento do gene B1 (BURG et al., 1989). Os primers utilizados (YAI et al., 2003) são mostrados no quadro 2 e os ciclos empregados na PCR e n-PCR são mostrados no quadro 3. O par de primers externos T1-T2 foi utilizado na PCR e o par de primers internos T3-T4, na n-PCR, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados de 300 pb e 155 pb, respectivamente.

Primers	Sequência de bases (5'- 3')
T1	AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA
T2	TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT
T3	TGGGAATGAAAGAGACGCTAATGTG
T4	TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG

Quadro 2 – Sequência de bases dos primers utilizados nas reações de PCR e nested-PCR para amplificação de fragmentos do gene B1 de *Toxoplasma gondii*

Na PCR, a seguinte mistura de reagentes foi utilizada para uma reação de 50µL:

⇒ 25,2µL de água ultrapura autoclavada

- ⇒ 5,0µL de tampão de reação 10× (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- ⇒ 8,0µL da mistura de dNTPs – dATP, dTTP, dCTP, dGTP (1,25mM)
- ⇒ 2,5µL do primer externo T1 (10pmol/µL)
- ⇒ 2,5µL do primer externo T2 (10pmol/µL)
- ⇒ 1,5µL de MgCl₂ (50mM)
- ⇒ 0,3µL de *Taq* DNA polimerase³ (5U/µl)
- ⇒ 5,0µL da amostra de DNA extraído

Na n-PCR, a seguinte mistura de reagentes foi utilizada para uma reação de 50µL:

- ⇒ 29,2µL de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 5,0µL de tampão de reação 10×(KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- ⇒ 8,0µL da mistura de dNTPs – dATP, dTTP, dCTP e dGTP (1,25mM)
- ⇒ 2,5µL do primer interno T3 (10pmol/µL)
- ⇒ 2,5µL do primer interno T4 (10pmol/µL)
- ⇒ 1,5µL de MgCl₂ (50mM)
- ⇒ 0,3µL de *Taq* DNA polimerase³ (5U/µl)
- ⇒ 1,0µL da amostra de DNA amplificado na PCR (puro e na diluição de 1:10)

	PCR	Nested-PCR
1.Desnaturação Inicial	94°C por 3'	94°C por 3'
2.Desnaturação	94°C por 45''	94°C por 45''
3.Hibridização	55°C por 1'	55°C por 1'
4.Extensão	72°C por 1' e 30''	72°C por 1' e 30''
5.Extensão Final	72°C por 10'	72°C por 10'
Ciclos (etapas 2 a 4)	25 ciclos	35 ciclos

Quadro 3 – Ciclos empregados para amplificação de fragmentos de DNA do gene B1 de *Toxoplasma gondii*

³ Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen™, Brazil

A cada corrida de PCR foi incluído um controle positivo (amostra RH) e pelo menos dois controles negativos (água ultrapura autoclavada).

4.3.1.4.3 *Análise do Produto Amplificado*

Os produtos originados pela n-PCR foram dispostos em um gel de agarose a 2,0% em cuba horizontal com solução tampão TBE (Tris-borato 0,045M; EDTA 0,001M), pH 8,0. Alíquotas de 20µl de cada amostra foram analisadas.

Após a corrida eletroforética, os géis eram corados com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/mL) por 15 a 30 minutos e observados sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas, utilizando-se um analisador de imagem para documentação (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA, USA).

4.3.2 Fase Experimental

Nesta fase, foi feita a pesquisa do agente nas ostras e mariscos, em condições naturais, por meio do bioensaio em camundongos e da n-PCR.

4.3.2.1 MOLUSCOS BIVALVES – AMOSTRAGEM

Foi calculada uma amostragem de 300 mariscos e 300 ostras, distribuídos em 20 grupos de 15 mariscos e 60 grupos de cinco ostras.

Para a detecção da presença do parasita, a amostragem foi selecionada, como não existem valores de referência, considerando-se uma prevalência de 1%, com

intervalo de confiança de 95%, e a população de cada grupo de moluscos estimada como >100.000 indivíduos, usando a fórmula abaixo (THRUSFIELD, 1995):

$$n = \{1 - (1 - p_1)^{1/d}\} \{N - d/2\} + 1$$

N = tamanho da população

d = número de indivíduos afetados na população

n = tamanho da amostragem

p₁ = possibilidade de encontrar pelo menos um caso

4.3.2.2 BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

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

A distribuição dos grupos de ostras e mariscos inoculados em camundongos na fase experimental pode ser observada nos quadros 4 e 5. Foram inoculados cinco camundongos por grupo de mariscos e ostras, sendo que a conduta experimental está descrita no item 4.3.1.3.

Os tecidos (pulmão e cérebro) dos camundongos que vieram a óbito a partir de 10 dias P.I. durante o experimento, nos quais não foram encontrados estágios do parasita, foram homogeneizados em salina 0,85% e inoculados intraperitonealmente em três camundongos, como 2ª passagem da amostra, e examinados, posteriormente, como descrito no item 4.3.1.3.

Identificação (peso em gramas)	Identificação (peso em gramas)
G1 (50 g)	G11 (60 g)
G2 (55 g)	G12 (75 g)
G3 (70 g)	G13 (60 g)
G4 (70 g)	G14 (75 g)
G5 (70 g)	G15 (60 g)
G6 (60 g)	G16 (70 g)
G7 (60 g)	G17 (60 g)
G8 (70 g)	G18 (50 g)
G9 (55 g)	G19 (65 g)
G10 (60 g)	G20 (65 g)

Quadro 4 – Distribuição dos grupos de mariscos na fase experimental para isolamento e detecção de *Toxoplasma gondii* em condições naturais, segundo o peso (g) dos tecidos

Identificação (peso em gramas)	Identificação (peso em gramas)	Identificação (peso em gramas)
G1(50 g)	G21 (55 g)	G41 (50 g)
G2 (50 g)	G22 (60 g)	G42 (45 g)
G3 (50 g)	G23 (40 g)	G43 (55 g)
G4 (50 g)	G24 (60 g)	G44 (120 g)
G5 (50 g)	G25 (60 g)	G45 (65 g)
G6 (50 g)	G26 (40 g)	G46 (55 g)
G7 (50 g)	G27 (40 g)	G47 (65 g)
G8 (50 g)	G28 (45 g)	G48 (90 g)
G9 (50 g)	G29 (45 g)	G49 (110 g)
G10 (55 g)	G30 (40 g)	G50 (85 g)
G11 (50 g)	G31 (40 g)	G51 (35 g)
G12 (55 g)	G32 (70 g)	G52 (35 g)
G13 (50 g)	G33 (70 g)	G53 (35 g)
G14 (40 g)	G34 (60 g)	G54 (50 g)
G15 (70 g)	G35 (105 g)	G55 (50 g)
G16 (60 g)	G36 (100 g)	G56 (45 g)
G17 (45 g)	G37 (85 g)	G57 (40 g)
G18 (40 g)	G38 (45 g)	G58 (50 g)
G19 (50 g)	G39 (45 g)	G59 (50 g)
G20 (40 g)	G40 (45 g)	G60 (50 g)

Quadro 5 – Distribuição dos grupos de ostras na fase experimental para isolamento e detecção de *Toxoplasma gondii* em condições naturais, segundo o peso (g) dos tecidos

4.3.2.3 ANÁLISE MOLECULAR

Os procedimentos utilizados na fase experimental foram basicamente os mesmos da fase de padronização, destacando-se as diferenças abaixo.

Com relação aos protocolos de extração, os resultados obtidos durante a padronização permitiram escolher o método mais adequado para cada grupo de moluscos. Para a extração de DNA de *T. gondii* nos tecidos de mariscos, foi utilizado apenas o método do FC e para a extração de DNA de *T. gondii* dos tecidos das ostras, foi utilizado apenas o método do GT.

A seguinte mistura de reagentes foi utilizada na n-PCR para uma reação de 50 μ L:

- ⇒ 25,2 μ L de água ultrapura autoclavada
- ⇒ 5,0 μ L de tampão de reação 10 $\times$ (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- ⇒ 8,0 μ L da mistura de dNTPs (1,25mM)
- ⇒ 2,5 μ L do primer interno T3 (10pmol/ μ L)
- ⇒ 2,5 μ L do primer interno T4 (10pmol/ μ L)
- ⇒ 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM)
- ⇒ 0,3 μ L de *Taq* DNA polimerase⁴ (5U/ μ L)
- ⇒ 5,0 μ L da amostra de DNA amplificado na PCR

As amostras positivas obtidas na n-PCR foram submetidas à análise por sequenciamento.

⁴ Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen™, Brazil

4.3.2.3.1 *Análise por sequenciamento*

As bandas de interesse foram recortadas do gel de agarose utilizando uma espátula. Para a purificação do DNA a partir do gel foi utilizado 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.

Alíquotas de 5,0µl dos produtos purificados foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% e quantificadas visualmente.

Na reação de sequenciamento foi utilizado o “kit” comercial de sequenciamento ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Para um volume final de 20µl, foram misturados os seguintes reagentes:

- ⇒ 2,0µL de Big Dye
- ⇒ 4,0µL de Tampão Save Money 5× (Tris-HCl 400mM, MgCl₂ 10mM, pH 9,0)
- ⇒ 1,0µL do primer interno T3 ou T4 (senso ou anti-senso) (10pmol/µL)
- ⇒ 13,0µL de DNA purificado (≈1,0ng)

As amostras foram então submetidas ao seguinte programa:

Desnaturação inicial: 96°C por um minuto

Desnaturação: 96°C por 15 segundos – Rampa: 1,0°C/s

Hibridização: 50°C por 15 segundos – Rampa: 1,0°C/s

Extensão: 60°C por quatro minutos – Rampa: 1,0°C/s

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

Para a precipitação, inicialmente, foram adicionados 80µL de isopropanol a 65%. Após homogeneização, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente, em

local escuro, por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 20.000 *g* por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão dos microtubos e foram adicionados 300µL de etanol a 70%. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 20.000 *g* por 10 minutos. O etanol foi descartado com auxílio de pipeta. As amostras foram, então, colocadas em banho-maria a 95°C por cinco minutos e mantidas a -20°C.

Após a precipitação, as amostras foram tratadas com formamida para o sequenciamento automático.

A eletroforese em sequenciador automático foi realizada seguindo o protocolo contido no manual técnico do equipamento ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA).

As sequências de nucleotídeos de cada amostra foram então alinhadas manualmente com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 Copyright 1997-2007 Tom Hall (HALL, 1999) e a similaridade com sequências biológicas depositadas no Genbank® foi pesquisada por meio do programa netBLAST (NCBI, 2008).

4.3.2.3.2 *PCR-RFLP Multilocal*

A genotipagem das amostras de *T. gondii* inicialmente detectadas pela n-PCR do gene B1 foi realizada seguindo os protocolos descritos por Su, Zhang e Dubey (2006), Dubey et al. (2007a) e Pena et al. (2008). Foram utilizados os marcadores SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, CS3 e Apico. No Quadro 6, podem ser visualizadas as informações referentes aos marcadores que foram utilizados, como localização no genoma, primers, tamanho dos produtos obtidos, além das enzimas de restrição.

A genotipagem dos controles positivos utilizados em todas as corridas de PCR pode ser visualizada no Quadro 7. Como controles negativos foram utilizados fibroblastos de células dérmicas humanas e água ultrapura estéril.

Marcador	Nº	Cromossomo	Primers externos [#]	Primers internos [#]	Tamanho (pb)	Enzimas de restrição
SAG1	VIII		F: GTTCTAACACGCGACCGCTGAG R: AAGAGTGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCCTCGTGGGTGTGAG	503	<i>Sau96I</i>
5-SAG2	VIII		F: GCTACCTCGAACAGGAAACAC R: GCATCAACAGCTCTCTGTTGC	F: GAAATGTTTCAGGTTGTCTGC R: GAAAGAGCGAAGCTTGAACAC	241	<i>HaeII</i> <i>MboI</i>
3-SAG2	VIII		F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAGCGGTGCAATTATCGC	F: ATTCTCATGCCCTCCGCTTC R: AACGTTTTCACGAAGGCACAC	221	<i>HhaI</i>
SAG3	XII		F: CAAGCTCACCAATCCACCC R: GCGCGTTGTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACCTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAAGGA	311	<i>NciI</i>
SAG2	VIII		F: GGAACGCGAACATGAGTTT R: GCAGCTGTTGTCCAGGGTTT	F: ACCCATCTGCCGAGAAACCG R: ATTTCGACACGCGGGAGCAC	546	<i>HinfI</i> <i>TaqI</i>
BTUB	IX		F: TCCAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAATGACGAAGA	F: GAGGTCACTCTCGGACGAAACA R: TTGTAGGAACAACCCGGACCG	411	<i>BstE1</i> <i>TaqI</i>
GRA6	X		F: ATTGTGTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTTGGT	F: TTTCGGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>MseI</i>
c22-8	Ib		F: TGAATGCATCCATGCCGTTAT R: CCTCCACTCTTCGGTGICA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	<i>BsmAI</i> <i>MboII</i>
c29-2	III		F: ACCCACTGAGCGAAAGAAA R: AGGGTCTCTTCCGCATACAT	F: AGTCTCGAGAGTGTCCG R: TGTCTAGGAAAGAGGCCGC	446	<i>HpyCH4IV</i> <i>RsaI</i>
L358	V		F: TCTCTCGACTTCGCCCTCTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGC	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCTCTGGCTGCAGTGCT	418	<i>HaeIII</i> <i>NlaIII</i>
PK1	VI		F: GAAGCTGTCCACCCCTGAA R: AGAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTCG	903	<i>AvaI</i> <i>RsaI</i>
Apico	Plastídeo		F: TGGTTTAAACCTAGATTGGG R: AACCGGAATTAAATGAGATTGAA	F: TGCAAATCTTGAATCTCAGTT R: GGGATTCGAACCCCTTGATA	640	<i>AflIII</i> <i>DdeI</i>
CS3	VIIa		F: GTGATCTCCGAGGGGGTCT R: TGTGACTCTTCGCATCGAC	F: AGCGGATTTCCAAACACTGTC R: CTGCTGCATTCACAACCTCC	557	<i>NlaIII</i> <i>MboI</i>

* Dados obtidos de Su, Zhang, Dubey (2006); Dubey et al. (2007a) e Pena et al. (2008)

F: Forward (sensol); R: Reverse (anti-sensol)

Quadro 6 – Informações referentes aos marcadores genéticos e endonucleases utilizados na PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de amostras de *Toxoplasma gondii* detectadas em ostras adquiridas no Mercado de Peixes do município de Santos, estado de São Paulo

Identidade do	Marcadores PCR-RFLP													Genótipo
	5'3'													
controle positivo	SAG1	SAG2 ¹	SAG2 ²	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	IIouIII	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II		Tipo II
CTG	IIouIII	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

u-1 e u-2 são alelos diferentes dos alelos clonais I, II e III; ¹ Marcador SAG2 baseado na terminação 5' - e 3' - da sequência do gene (Howe et al., 1997)
² Novo marcador SAG2 baseado na terminação 5' - da sequência do gene (Su et al., 2006)

Quadro 7 – Amostras clonais Tipos I, II e III e outras amostras de referência de *Toxoplasma gondii* que foram utilizadas como controles positivos na PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de amostras de *T. gondii* detectadas em ostras adquiridas no Mercado de Peixes do município de Santos, estado de São Paulo

As sequências de DNA-alvo foram primeiramente amplificadas por multiplex PCR usando os primers externos (multiplex 1: SAG1, 5'3'SAG2, SAG3, BTUB e GRA6; multiplex 2: c22-8, c29-2, L358, PK1, CS3, SAG2 e Apico), seguido de n-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 detectadas):

- ⇒ 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 MgCl₂ (50mM)
- ⇒ 0,1µL de *Taq* DNA polimerase⁵ (5U/µl)
- ⇒ 1,5µL da amostra de DNA

Para a n-PCR, primeiramente, 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 podem ser visualizados no quadro 8.

	PCR	Nested-PCR
1.Desnaturação Inicial	95°C por 4'	95°C por 4'
2.Desnaturação	94°C por 30"	94°C por 30"
3.Hibridização	55°C por 30"	60°C por 1'
4.Extensão	72°C por 1' e 30"	72°C por 2' '
Ciclos (etapas 2 a 4)	25 ciclos	35 ciclos

Quadro 8 – Ciclos empregados na realização da PCR-RFLP Multilocal

⁵ Platinum® *Taq* DNA Polymerase, Invitrogen™, Brazil

Em uma segunda etapa, a PCR foi realizada individualmente para cada marcador, e não como multiplex. O protocolo de reação para os controles foi mantido e as seguintes modificações foram feitas com as amostras pesquisadas:

- a) foram utilizados 2,5µl de DNA para a PCR
- b) foram utilizados 2,5µl do produto da PCR, sem diluição, para a n-PCR

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra, 3µL do produto da n-PCR foram misturados a 17µL de reação de digestão contendo tampão NE (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 (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; 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).

Em uma segunda etapa, o protocolo da reação de digestão das amostras pesquisadas foi modificado, utilizando-se 10µl do produto da n-PCR em 10µL de reação de digestão.

5 RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi dividida abaixo em fase de padronização e em fase experimental.

5.1 FASE DE PADRONIZAÇÃO

A sensibilidade do bioensaio para o isolamento de *T. gondii* em mariscos e ostras contaminados experimentalmente com oocistos do parasita pode ser observada na Tabela 1. O parasita foi isolado nos grupos de mariscos nas diluições de $0,5 \times 10^4$, 10^3 e 10^2 . Nos grupos de ostras houve isolamento nas diluições de $0,5 \times 10^4$ e 10^3 .

Tabela 1 – Número de camundongos infectados pelo *Toxoplasma gondii* após inoculação oral com tecidos de mariscos e ostras contaminados experimentalmente com oocistos, segundo a diluição de oocistos e o grupo de moluscos. São Paulo, 2008

Diluição dos oocistos	Grupos*		
	Mariscos	Ostras	Controle#
$0,5 \times 10^4$	4 (G1)	3 (G1)	5 (G1)
	4 (G2)	1 (G2)	5 (G2)
		5 (G7)	
10^3	1 (G3)	0 (G3)	5 (G3)
	3 (G4)	1 (G4)	5 (G4)
		5 (G8)	
10^2	0 (G5)	0 (G5)	4 (G5)
	3 (G6)	0 (G6)	4 (G6)
		0 (G9)	
10^1	0 (G7)	0 (G10)	4 (G7)
	0 (G8)		0 (G8)

* cinco camundongos inoculados por grupo

somente oocistos

Na tabela 2, encontram-se os resultados referentes à detecção de *T. gondii* na n-PCR, após utilização de diferentes protocolos de extração de DNA nos moluscos contaminados experimentalmente com oocistos do parasita. O parasita foi detectado nos grupos de mariscos nas diluições de $0,5 \times 10^4$ e 10^3 com o FC, e não foi detectado com o GT. Nos grupos de ostras, houve detecção do parasita somente na diluição de $0,5 \times 10^4$ com o FC e houve detecção nas diluições de $0,5 \times 10^4$, 10^3 e 10^2 com o GT.

Tabela 2 – Detecção de *T. gondii* na nested-PCR em amostras[§] de tecidos de moluscos contaminados experimentalmente com oocistos do parasita, segundo a diluição dos oocistos, o grupo de moluscos e o método de extração de DNA empregado. São Paulo, 2008

Diluição dos oocistos	Grupos					
	Mariscos		Ostras		Controle#	
	FC*	GT**	FC	GT	FC	GT
$0,5 \times 10^4$	5/8	0/8	1/11	7/11	2/2	2/2
10^3	2/8	0/8	0/11	5/11	2/2	2/2
10^2	0/5	0/5	0/8	3/8	2/2	2/2
10^1	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2

* método do fenol-clorofórmio

** método de isotiocianato de guanidina

somente oocistos

§ número de amostras de 500µL positivas/número de amostras examinadas

FASE EXPERIMENTAL

Os resultados da fase experimental encontram-se divididos nos itens bioensaio em camundongos e análise molecular.

5.2.1 Bioensaio em camundongos

Entre os 20 grupos de mariscos e, igualmente, entre os 60 grupos de ostras, não houve isolamento do *T. gondii* usando o bioensaio em camundongos. O resultado da RIFI foi negativo (título <16) para todos os camundongos sobreviventes e, nos camundongos que vieram a óbito, não houve o encontro de estágios do parasita nos tecidos examinados. Foi feita a 2ª passagem da amostra em camundongos que vieram a óbito 20, 32 e 33 dias P.I. nos grupos de ostras G19 e G60 e no grupo de mariscos G12, respectivamente. Não houve isolamento do parasita nesses grupos.

5.2.2 Análise molecular

Entre os 20 grupos de mariscos, não houve detecção molecular do *T. gondii* usando a n-PCR, tendo sido examinadas cinco amostras de 500µl de cada grupo, com exceção dos grupos G17 e G18, nos quais quatro amostras de 500µl foram examinadas.

Entre os 60 grupos de ostras, foram examinadas cinco amostras de 500µl de cada grupo, com exceção dos grupos G14 e G45, nos quais quatro amostras de 500µl foram examinadas. Houve detecção molecular do *T. gondii* nos grupos G19 e G59, correspondendo a 3,3% dos grupos de ostras (Figura 1). Nesses dois grupos, entre as cinco alíquotas examinadas, somente uma estava positiva.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando fragmentos de 155 pb obtidos na nested-PCR baseada no gene B1 de *Toxoplasma gondii*. Linhas 1, 3, 5 e 7: controles negativos; linhas 2 e 8: controles positivos; linha 4: grupo de ostras G19 e linha 6: grupo de ostras G59. M: marcador de peso molecular de 50pb

Não houve sucesso no sequenciamento da amostra G59. O sequenciamento da amostra G19 levou à obtenção de três sequências (duas senso e uma anti-senso) que permitiram a análise da amostra por meio do programa netBLAST. Foi encontrada somente identidade molecular (100%) com uma sequência parcial do gene B1 de *T. gondii* (Figura 2).


```
> gb|AF179871.1| Toxoplasma gondii B1 gene, partial sequence
Length=2214

Score = 287 bits (155), Expect = 1e-74
Identities = 155/155 (100%), Gaps = 0/155 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query    1      GGAATGAAAGAGACGCTAATGTGTTTGCATAGGTTGCAGTCACTGACGAGCTCCCCTCT
60
      |||
Sbjct    731    GGAATGAAAGAGACGCTAATGTGTTTGCATAGGTTGCAGTCACTGACGAGCTCCCCTCT
790

Query    61      GTGGCGAAAAGTGAAATTCATGAGTATCTGTGCAACTTTGGTGTATTTCGCAGATTGGTC
120
      |||
Sbjct    791    GTGGCGAAAAGTGAAATTCATGAGTATCTGTGCAACTTTGGTGTATTTCGCAGATTGGTC
850

Query    121    GCCTGCAATCGATAGTTGACCACGAACGCTTTAAA 155
      |||
Sbjct    851    GCCTGCAATCGATAGTTGACCACGAACGCTTTAAA 885
```

Figura 2 – Análise de similaridade de sequência de nucleotídeos de usando o programa netBLAST

Não foi possível a genotipagem das amostras positivas dos grupos de ostras G19 e G59 baseada na PCR-RFLP, para nenhum dos marcadores estudados, pois não houve amplificação das amostras nos dois protocolos testados.

6 DISCUSSÃO

Os Lamelibrânquios, como as ostras e mariscos, são consumidos vivos, cozidos e crus, sendo comestível todo o conteúdo da concha. O fato desses animais, particularmente as ostras, serem consumidos crus os tornam potenciais transmissores de agentes de diversas etiologias. Geralmente, os organismos responsáveis pela enfermidade penetram na carne dos moluscos pela filtração da água do mar contaminada ou podem penetrar também quando se utiliza água doce contaminada para lavar esses animais.

Quantidades massivas de fezes humanas, de animais de estimação e outros animais domésticos são despejadas por esgotos ou carregadas pelas enchentes, levando protozoários agentes de zoonoses para estuários e águas costeiras. Ao contrário de cistos e oocistos de *Giardia* e *Cryptosporidium*, respectivamente, que já tiveram sua presença constatada em águas costeiras, o relato de oocistos de *T. gondii* nesse ambiente ainda não foi feito (FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004).

Estudos já mostraram que ostras e mariscos em condições naturais podem albergar protozoários agentes de zoonoses como *Giardia* e *Cryptosporidium* (GRACZYK et al., 1999; FREIRE-SANTOS et al., 2000; FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004).

Em relação ao *T. gondii*, vários estudos experimentais já mostraram a capacidade de esporulação e manutenção da infectividade dos oocistos na água do mar e a capacidade de remoção desses oocistos pelas ostras (LINDSAY et al., 2001, 2004). No entanto, só existe um estudo descrito na literatura pesquisando esse agente em moluscos sob condições naturais (SERACENI, 2008). Assim, o presente estudo foi motivado pela falta de informações nesse campo.

No presente trabalho, dos 20 grupos de mariscos (*Mytillus guayanensis*) estudados, não houve isolamento de *T. gondii* pelo bioensaio em camundongos em nenhum desses grupos. Também não houve detecção molecular pela n-PCR. Embora os trabalhos de Lindsay et al. (2001, 2004) tenham mostrado a capacidade de filtração e retenção de oocistos de *T. gondii*, experimentalmente, em ostras e não em mariscos, a presença de outro protozoário, o *Cryptosporidium*, já foi demonstrada por métodos moleculares também no gênero *Mytillus* em condições

naturais (GOMEZ-BAUTISTA et al., 2000), mostrando a capacidade de retenção de protozoários por este molusco.

Esses grupos de mariscos negativos para *T. gondii* eram procedentes da região de Cananéia, mesmo local de onde vieram as ostras nas quais foi feita a detecção do parasita no presente estudo, como será descrito abaixo. Durante a fase de padronização, foi verificado que o bioensaio foi mais sensível que a n-PCR, detectando 10^2 parasitas, no entanto, o isolamento só seria possível se os oocistos estivessem viáveis. Estudos mais amplos são necessários para verificar se esse grupo de moluscos bivalves pode reter oocistos de *T. gondii* em ambientes marinhos contaminados. A utilização de métodos moleculares como o RT-PCR associado ao estudo individual, e não em grupos, dos mariscos, poderia melhorar a sensibilidade dessa detecção.

Quanto aos 60 grupos de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) estudados, houve detecção molecular do *T. gondii* em dois grupos pela n-PCR, sendo uma delas confirmada pelo sequenciamento e pesquisa no Genbank®, correspondendo a 3,3% dessas amostras. Não houve isolamento do parasita pelo bioensaio em camundongos. Ao contrário dos grupos de mariscos, a n-PCR foi mais sensível na fase de padronização, detectando 10^2 parasitas. O fato de não ter havido isolamento do parasita nos mesmo grupos em que houve a detecção molecular, pode estar relacionado particularmente aos fatores viabilidade e quantidade do parasita nas amostras.

Experimentalmente, foi verificado que o *T. gondii* pode permanecer viável na água do mar por até seis meses, com uma taxa de esporulação de 75 a 80% (LINDSAY et al., 2003). No presente trabalho, a detecção molecular foi obtida em apenas uma das cinco alíquotas examinadas, para os dois grupos positivos, sugerindo que a distribuição do parasita não era homogênea e ainda a pequena quantidade de oocistos. A corrida eletroforética das amostras positivas mostrou um sinal relativamente fraco, também indicando pequena quantidade de DNA nessas amostras.

Na Itália, Seraceni et al. (2008) pesquisaram a presença de *T. gondii* em ostras do gênero *Crassostrea* e mariscos do gênero *Mytillus*, entre outros gêneros de moluscos do Mar Adriático, num total de 140 moluscos, usando a n-PCR baseada no gene B1. Apesar de terem encontrado altas taxas de bactérias e biotoxinas, não foi detectado o DNA de *T. gondii*, sendo concluído que os moluscos estudados não

eram capazes de adquirir *T. gondii* ou reter a infectividade por períodos longos. Esses autores também usaram a PCR convencional, porém o protocolo de extração não é citado. No presente estudo, durante a fase de padronização, foi verificada uma diferença na detecção do DNA, relacionada com o protocolo de extração utilizado. Para os mariscos, o protocolo mais adequado foi o do fenol-clorofórmio, enquanto que para as ostras o mais adequado foi o GT. Essa diferença determinou o procedimento para a fase experimental. Uma hipótese que poderia ser colocada é que produtos do metabolismo desses animais possam ter influenciado na eficiência de cada método.

Assim, o presente estudo é o primeiro a relatar a presença de DNA de *T. gondii* em moluscos bivalves. Pode-se presumir, indiretamente, que o ambiente marinho de onde foram extraídos esses moluscos está contaminado com oocistos de *T. gondii* e, portanto, está havendo uma passagem do parasita do ambiente terrestre para o marinho. Embora a viabilidade do parasita não tenha sido confirmada pelo isolamento em camundongos, o consumo de ostras cruas da espécie *Crassostrea rhizophorae*, uma das mais frequentes no litoral do estado de São Paulo, pode ser uma potencial via de transmissão de *T. gondii* para o Homem. Oocistos de *T. gondii* podem ser inativados a 70°C por pelo menos 10 minutos (ITO et al., 1975; SHIMURA; ITO; TSUNODA, 1984), assim, o cozimento dos moluscos seria adequado para evitar essa possível via de transmissão do agente.

Como a ocorrência de *T. gondii*, pelos resultados obtidos no presente estudo, é baixa em ostras e mariscos na localidade estudada, a confirmação da infectividade de oocistos de *T. gondii* apresenta uma limitação, que é o modelo biológico empregado. Geralmente, camundongos são utilizados neste tipo de estudo, devido a sua susceptibilidade, no entanto, a quantidade de material que pode ser administrada oralmente é pequena. O uso de outros modelos animais de alta susceptibilidade como gatos e suínos poderia ser mais adequado para estudos de viabilidade, pois uma grande quantidade de material poderia ser fornecida. No entanto, atualmente, questões bioéticas estão restringindo a utilização de animais como modelos experimentais.

A população mundial de felídeos, únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii*, é desconhecida, estimando-se que haja ao redor de 40 milhões de gatos domésticos nos Estados Unidos. Um gato pode eliminar 25g de fezes por dia, e o período de excreção de oocistos de *T. gondii* é de apenas alguns dias, no entanto, milhões de

oocistos podem ser excretados em um único dia, sendo a dose infectante de um oocisto para camundongos e suínos. A dose infectante é desconhecida para humanos (DUBEY et al., 1996; FAYER; DUBEY; LINDSAY, 2004). No estado de São Paulo, dados de prevalência indicam soropositividade entre 27 e 35% em gatos não-domiciliados (SILVA et al., 2002; PENA et al., 2006). A probabilidade de um gato soropositivo já ter excretado oocistos em algum período da sua vida é de quase 100% (DUBEY; BEATTIE, 1988), ou seja, a contaminação ambiental deve ser alta nessa região estudada, havendo possibilidade desses oocistos estarem sendo carregados pelas águas das chuvas para ambientes aquáticos.

Não houve sucesso na genotipagem dos dois grupos de ostras positivos utilizando a PCR-RFLP multilocal, pois não houve amplificação de DNA nos marcadores estudados. Este resultado pode ser explicado considerando-se que as amostras positivas apresentavam pequena quantidade de DNA, indicado pelo sinal fraco obtido após a realização da n-PCR do gene B1, e o método de genotipagem usado ter sido padronizado para isolados de *T. gondii*, onde se trabalha com grande quantidade de DNA (SU; ZHANG; DUBEY, 2006). A tentativa de mudança do protocolo inicial também não logrou sucesso para nenhum dos marcadores.

No Brasil, existe um conhecimento acumulado de genotipagem de 308 isolados de *T. gondii* de galinhas, cães, gatos, ovinos, caprinos e capivaras de diferentes regiões, mostrando alta diversidade genética. O conhecimento dos genótipos circulantes no ambiente marinho será importante para confirmar a transição do *T. gondii* do ambiente terrestre para o marinho, no entanto não existem ainda dados publicados sobre a presença desse parasita nos animais marinhos brasileiros. Existe ainda muito pouco estudo sobre a toxoplasmose em animais marinhos brasileiros, mas o fato de Silva et al. (2000) terem encontrado um peixe-boi marinho positivo entre 12 animais examinados (8,3%) é indicativo de que o agente está circulando no ambiente marinho das águas brasileiras e, portanto, necessita melhor investigação.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- Ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* são capazes de filtrar e reter oocistos de *T. gondii*.
- O ambiente marinho do litoral do estado de São Paulo está contaminado com oocistos de *T. gondii*.
- Ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* quando ingeridas cruas podem ser uma potencial via de transmissão de *T. gondii* para o Homem e animais marinhos.
- O método de fenol-clorofórmio é mais adequado para extração de DNA de mariscos e o método de isotiocianato de guanidina é mais adequado para extração de DNA de ostras.

REFERÊNCIAS

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A. L.; SU, C.; DUMETRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B. M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 10, p. 1185-1196, 2004.

AMARAL, A. C. Z.; JABLONSKI, S. Conservação da Biodiversidade Marinha e Costeira do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 43-51, 2005.

ARKUSH, K.; MILLER, M. A.; LEUTENEGGER, C. M.; GARDNER, I. A.; PACKHAM, A. E.; HECKEROTH, A. R.; TENTER, A. M.; BARR, B. C.; CONRAD, P. A. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocysts uptake by mussels (*Mytillus galloprovincialis*). **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1087-1097, 2003.

AUSUBEL, F.; BRENT, F.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed). **Short protocols in molecular biology**. 4th ed. New York: Wiley, 1999. sections 2-3 – 2-7.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State. **Brazilian Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2003.

BANDOLI, J. G.; DE OLIVEIRA, C. A. B. Toxoplasmose em *Sotalia guianensis*, Cetácea-Delphinidae. **Folha Médica**, v. 75, p. 459-468, 1977.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H.; ISAAC-RENTON, J. L.; BELL, A.; ENG, S. B.; MARION, S. A. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **Lancet**, v. 350, n. 9072, p. 173-177, 1997.

BURG, J. L.; GROVER, C. M.; POULETTY, P.; BOOTHROYD, J. C. Direct and Sensitive Detection of a Pathogenic Protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989.

CABEZÓN, O.; RESENDES, A. R.; DOMINGO, M.; RAGA, J. A.; AUGUSTÍ, C.; ALEGRE, F.; MONS, J. L.; DUBEY, J. P.; ALMERÍA, S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Wild Dolphins from the Spanish Mediterranean Coast. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 643- 644, 2004.

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.

CHESSUM, B. S. Reactivation of *Toxoplasma* oocysts production in the cat by infection with *Isospora felis*. **British Veterinary Journal**, v. 128, n. 7, p. xxxiii-xxxvi, 1972.

CHOMKZYNSKI, P. A. Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v, 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; HOWE, D. K.; RODERICK, C. L.; DUBEY, J. P.; THOMAS, N. J.; BAETEN, L. A. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-530, 2000.

CRUICKSHANK, J. J.; HAINES, D. M.; PALMER, N. C.; STAUBIN, D. J. Cysts of *Toxoplasma*-like organisms in an Atlantic bottle-nose dolphin. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, n. 3, p. 213-215, 1990.

DEMAR, M.; AJZEMBERG, D.; MAUBON, D.; DJOSSOU, F.; PANCHOE, D.; PUNWASI, W.; VALERY, N.; PENEAU, C.; DAIGRE, J. L.; AZNAR, C.; COTTRELE, B.; TERZAN, L.; DARDÉ, M. L.; CARME, B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 7, p. 88-95, 2007.

DOMINGO, M. J.; VISA, M.; PUMAROLA, A. J.; FERRER, M. L.; RABANAL, R.; KENNEDY, S. Pathologic and immunohistochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 1992.

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

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

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

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

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

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

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

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. **Veterinary Pathology**, v. 11, n. 4, p. 350-379, 1974.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; VIANNA, M. C. B.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36-40, 2006.

DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M. C. B.; BANDINI, L. M.; YAI, L. E. O.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Diverse and Atypical Genotypes Identified in *Toxoplasma gondii* from Dogs in São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 60-64, 2007a.

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

DUBEY, J. P.; LIPSCOMB, T. P.; MENSE, M. Toxoplasmosis in an Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 410-411, 2004.

DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; ASHFORD, D. A.; THULLIEZ, P. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 438-443, 1996.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 447-456, 1970a.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat faeces. **Journal of Experimental Medicine** v. 132, n. 4, p. 636-662, 1970b.

DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B.; CAVALCANTE, G. T.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 182-188, 2007b.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F. J.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M. G.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3- 4, p. 299-305, 2008.

DUBEY, J. P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N. J.; WONG, S. K.; VAN BONN, W.; BRIGGS, M.; DAVIS, J. W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O. C. H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 275-296, 2003.

FAYER, R.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Zoonotic protozoa: from land to sea. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 531-536, 2004.

FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. Peces, Crustaceos y Moluscos. In: FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. (Ed.). **Higiene Veterinaria de Los Alimentos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, S.A., p. 507-583, 1992.

FERREIRA, A. M., VITOR, R. W. A., GAZZINELLI, R. T., MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22-31, 2006.

FREIRE-SANTOS, F.; OTEIZA-LÓPEZ, A. M.; VERGARA-CASTIBLANCO, C. A.; ARESMAZÁS, E.; ÁLVAREZ-SUÁREZ, E.; GARCÍA-MARTÍN, O. Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Bivalve Molluscs Destined for Human Consumption. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 853-854, 2000.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-896, 1970.

FRENKEL, J. K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 3, p. 439-443, 1975.

FUJII, K.; KAKUMOTO, C.; KOBAYASHI, M.; SAITO, S.; KARIYA, T.; WATANABE, Y.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUZUKI, M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Seals around Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 4, p. 393-398, 2007.

GLASNER, P. D.; SILVEIRA, C.; KRUKON-MORAN, D.; MARTINS, M. C.; BURNIER, M.; SILVEIRA, S.; CAMARGO, M. E.; NUSSENBLATT, R. B.; KASLOW, R. A.; BELFORT, R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, n. 2, p. 136-144, 1992.

GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M.; TABARES, E.; LOPEZ-RODAS, V.; COSTAS, E. Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and Cockles (*Cerastoderma edule*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1866-1870, 2000.

GÓMEZ-COUSO, H.; FREIRE-SANTOS, F.; AMAR, C. F. L.; GRANT, K. A.; WILLIAMSON, K.; ARES-MAZÁS, M. E.; MCLAUCHLIN, J. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 279-288, 2003.

GRACZYK, T. K.; FAYER, R.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M.; FARLEY, C. A. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. **Parasitology Research**, v. 85, n. 7, p. 518-521, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HONNOLD, S. P.; BRAUN, R.; SCOTT, D. P.; SREEKUMAR, C.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 695-697, 2005.

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411-1414, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

INSKEEP, I. W.; GARDINER, C. H.; HARRIS, R. K.; DUBEY, J. P.; GOLDSTON, R. T. Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 3, p. 377-382, 1990.

ITO, A.; TSUNODA, K.; TAKI, T.; NISHIKAWA, H.; MATSUI, T. Destructive effect of heating against *Toxoplasma* oocysts. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v. 15, n. 3, p. 128, 1975.

JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 55-105, 1989.

JARDINE, J. E.; DUBEY, J. P. Congenital Toxoplasmosis in a Indo-Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*). **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 197- 199, 2002.

KHAN, A.; FUX, B.; SU, C.; DUBEY, J. P.; DARDÉ, M, L.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, M. M.; SIBLEY, L. D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14872-14877, 2007.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V., BELFORT JR., R.; VITOR, R. W. A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D., 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

LAMBOURN, D. M.; JEFFRIES, S. J.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Harbor Seals (*Phoca vitulina*) in Southern Puget Sound, Washington. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1196-1197, 2001.

LEHMANN, T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; 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**, v. 4, n. 2, p. 107-114, 2004.

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

LINDSAY, D. S.; COLLINS, M. V.; MITCHELL, S. M.; COLE, R. A.; FLICK, G. J.; WETCH, C. N.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J. P. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in seawater. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 687-688, 2003.

LINDSAY, D. S.; COLLINS, M. V.; MITCHELL, S. M.; WETCH, C. N.; ROSYPAL, A. C.; FLICK, G. J.; ZAJAC, A. M.; LINDQUIST, A.; DUBEY, J. P. Survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1054-1057, 2004.

- LINDSAY, D. S.; PHELPS, K. K.; SMITH, S. A.; FLICK, G.; SUMNER, S. S.; DUBEY, J. P. Removal of *Toxoplasma gondii* oocysts from sea water by eastern oysters (*Crassostrea virginica*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 1, supplement 197-198, 2001.
- LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Toxoplasmosis: from clinics to basic science. **Parasitology Today**, v. 14, n. 2, p. 43-45, 1998.
- MILLER, M. A.; CROSBIE, P. R.; SVERLOW, K.; HANNI, K.; BARR, B. C.; KOCK, N.; MURRAY, M. J.; LOW ENSTINE, L. J.; CONRAD, P. A. Isolation and characterization of *Sarcocystis* from brain tissue of a free-living southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*) with fatal meningoencephalitis. **Parasitology Research**, v. 87, n. 3, p. 252-257, 2001.
- MILLER, M. A.; GARDNER, I. A.; KREUDER, C.; PARADIES, D. M.; WORCESTER, K. R.; JESSUP, D. A.; DODD, E.; HARRIS, M. D.; AMES, J. A.; PACKHAM, A. E.; CONRAD, P. A. Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 997-1006, 2002.
- MURATA, K.; MIZUTA, K.; IMAZU, K.; TERASAWA, F.; TAKI, M.; ENDOH, T. The Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Wild and Captive Cetaceans from Japan. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 896-898, 2004.
- NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, Paris, v. 148, p. 369-372, 1909.
- NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishmann (ou organisms voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.
- NCBI. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>. Acesso em: 10 de Dez. 2008.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 47, n. 1-2, p. 27-32, 1980.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

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

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de uréase isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 591-595, 2004.

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

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2 ed. Rio Grande. Universidade do Rio Grande, 1994, 368 p.

ROPER, D. S.; HICKEY, C. W. Effects of food and silt on filtration, respiration and condition of the freshwater mussel *Hyridella menziesi* (Unionacea: Hyriidae). **Hydrobiologia**, v. 312, p. 17-25, 1995.

RUPERT, E. E.; BARNES, R. D. Moluscos. In: RUPERT, E. E.; BARNES, R. D. (Ed.). **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996, p. 412-449.

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

SERACENI, S.; MACCHIA, C.; CULTRERA, R.; RUBINI, S.; CONTINI, C. Search of *Toxoplasma gondii* DNA in Shellfish from Adriatic Sea In: TOXOPLASMA CENTENNIAL, 2008, Búzios. **Anais...** Búzios, 2008, p. 110.

SHIMURA, K.; ITO, S.; TSUNODA, K. Sterilization of *Toxoplasma* oocysts by means of heated steam. **Bulletin of the National Institute of Animal Health**, n. 87, p. 33-39, 1984.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, London, v. 359, n. 1, p. 82-85, 1992.

SILVA, J. C. R.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; AMAJONES, V. R.; MAGNABOSCO, C.; YAI, L. E. O.; FERREIRA-NETO, J. S.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* Antibodies in Sera of Domestic Cats from Guarulhos and São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 419-420, 2002.

SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PICANÇO, M. C.; LIMA, R. P.; VERGARA-PARENTE, J. E.; MARCONDES, M. C. C.; FERREIRA, P. M.; MORAIS, Z. M.; OGASSAWARA, S.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA-NETO, J. S. Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans* e *Brucella abortus* em peixes-bois-marinhos (*Trichechus manatus manatus*) mantidos em cativeiro. In: V Congresso e X Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 2000, São Paulo, p. 27.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il kala-azar dell'umo. Nota preliminaire pel. **Revista da Sociedade Scientifica, São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. Filo Mollusca. In: STORER, T. I.; USINGER, R. L. (ed.). **Zoologia Geral**. 2. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1976, p. 418-425.

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 for Parasitology**, v. 36, n. 7, p. 841-848, 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995, 477p.

YAI, L. E. O.; VIANNA, M. C. B.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Evaluation of Experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) Infection in Pigs by Bioassay in Mice and Polymerase Chain Reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 227-234, 2003.