

LUCIA EIKO OISHI YAI

**Caracterização biológica e genotípica de isolados de
Toxoplasma gondii de capivaras (*Hydrochaeris
hydrochaeris*) do Estado de São Paulo**

São Paulo
2007

LUCIA EIKO OISHI YAI

**Caracterização biológica e genotípica de isolados de
Toxoplasma gondii de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*)
do Estado de São Paulo**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo
2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1841
FMVZ

Yai, Lucia Eiko Oishi

Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo / Lucia Eiko Oishi Yai. – São Paulo: L. E. O. Yai, 2007.

137 f. : il.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Isolados. 3. Genótipos.
4. Caracterização molecular. Capivaras. I. Título.



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização biológica e genética de isolados de *Toxoplasma gondii* em capivaras do Estado de São Paulo", protocolo nº325/2003, utilizando 150 camundongos, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from capybaras from São Paulo State, Brazil" protocol number 325/2003, utilizing 150 mice, under the responsibility of Prof. Dr. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Biotic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 12 de junho de 2003


Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: YAI, LUCIA EIKO OISHI

Título: Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

| | | | |
|------------|-------|-------------|-------|
| Prof. Dr. | _____ | Instituição | _____ |
| Julgamento | _____ | Assinatura | _____ |
| Prof. Dr. | _____ | Instituição | _____ |
| Julgamento | _____ | Assinatura | _____ |
| Prof. Dr. | _____ | Instituição | _____ |
| Julgamento | _____ | Assinatura | _____ |
| Prof. Dr. | _____ | Instituição | _____ |
| Julgamento | _____ | Assinatura | _____ |
| Prof. Dr. | _____ | Instituição | _____ |
| Julgamento | _____ | Assinatura | _____ |

À memória de meus pais:

Que sempre me incentivaram em todas as etapas da minha vida.

Ao Yozo, meu esposo:

Pelo apoio, incentivo e amor.

Aos meus filhos Raphael e Ricardo:

Pela compreensão.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari pela amizade e paciência na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares pela atenção e paciência nos ensinamentos sobre biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Ricardo A. Dias pela realização da análise estatística.

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

À Prof^a. Dr^a. Claudete Serrano Astolfi Ferreira pela disponibilização do Laboratório de Ornitopatologia para a realização de parte do trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Reiko Matushima pela disponibilização da sala de necrópsia e pessoal do serviço de Patologia Animal (VPT-FMVZ) para coleta de órgãos das capivaras.

À Renata do Departamento de Patologia Animal (VPT-FMVZ) pela realização das necrópsias nas capivaras.

À Hilda Fátima de Jesus Pena pela amizade e paciência na orientação na elaboração de todas as etapas de processamento das amostras no laboratório.

À Adriana Cortez pela amizade e sugestões nas reações de PCR e seqüenciamento.

Aos amigos Sílvio e Alexandre pelo incentivo e ajuda nas reações de seqüenciamento.

À amiga Alessandra pelo agradável convívio, apoio e ajuda nos processamentos das amostras no laboratório.

À Luciana, estagiária do laboratório de Doenças Parasitárias pela ajuda no bioensaio.

À Sandra Nishi pela amizade, incentivo e sugestões.

Aos amigos Richard, Iara, Maurício, Ricardo, Adriano e Micaela pela amizade e agradável convívio.

Ao Bispo pela ajuda no transporte e coleta de sangue dos animais no Abatedouro.

Ao José Jorge Guimarães Júnior, proprietário do Frigorífico Panamby – Porá e a Paulo Bezerra, proprietário do abatedouro Pro-Fauna, pela agradável receptividade,

interesse e compreensão em deixar à disposição dos pesquisadores a coleta de amostras de órgãos e sangue das capivaras.

À Rossana Borioni do IBAMA pelas informações sobre as capivaras do Estado de São Paulo.

À Dr^a Marilene Fernandes de Almeida, sub-gerente do Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores (LabZoo-VIS) do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao Marcelo de Menezes Brandão, gerente do Centro de Controle de Zoonoses pelo incentivo e compreensão.

À querida amiga Maria Lucia de Oliveira pelos constantes incentivos e sugestões.

Ao José Theodoro Damaceno, técnico de laboratório do setor de Parasitologia do LabZoo-VIS, pela ajuda na coleta dos órgãos das capivaras e pelos constantes incentivos.

À amiga Marly pela paciência e compreensão.

Às funcionárias do setor de Parasitologia, Izilda e Eloísa, pelos incentivos e compreensão.

Aos amigos do LabZoo-VIS: Beth, Maria Adelaide, Ana Paula, Maria Cecília, Sandra, Thirsa, Alfred, Hilde, Érica, Luzia pelos incentivos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro – Processo nº 2003/2069-6.

“Sinto-me um lápis nas mãos de Deus”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

YAI, L. E. O. **Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo.** [Biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State]. 2007. 137 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, através do teste de aglutinação modificado (MAT), em 68 amostras de soros de capivaras de seis municípios no Estado de São Paulo. Anticorpos (MAT \geq 25) foram encontrados em 51 (75%) capivaras examinadas. Dentre estas realizou-se o bioensaio em camundongos, com tecidos do cérebro, coração e língua, de 40 capivaras, sendo obtidos 36 isolados (90%). Não houve associação entre o número de isolados e idade das capivaras ($p=0,21$), sexo ($p=0,58$) ou tipo de criação ($p=0,62$), isto é, criadouros e vida livre, bem como a frequência de isolamentos e os títulos de anticorpos ($p=0,99$). A análise de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP) sobre produtos do *locus SAG2* amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) revelou que 20 isolados (55,5%) pertenciam ao genótipo I, 14 (38,9%) ao genótipo III e dois (5,6%) que apresentaram genótipo misto (tipos I e III). Não foi encontrado isolado tipo II. A proporção de isolados tipo I entre as capivaras de vida livre foi maior ($p=0,049$) do que entre as capivaras provenientes de criadouros. Por outro lado, entre as capivaras de criadouros, a proporção de isolados tipo III foi maior ($p=0,041$). A maioria dos isolados tipo I (12/20) causou óbito em todos os camundongos infectados e, em nenhum grupo com este isolado, 100% dos camundongos sobreviveram. A maioria dos isolados tipo III (8/14) não matou nenhum camundongo infectado. A frequência de óbitos em camundongos com genótipo I (86%) foi maior do que o tipo III (44,9%) ($p<0,001$), enquanto a sobrevivência dos camundongos com genótipo III foi significativamente maior que a dos camundongos com genótipo I ($p<0,001$). Foram encontrados cistos nos cérebros dos camundongos infectados em todos os 36 isolados. A análise genotípica também foi realizada diretamente dos tecidos de 35 das 36 capivaras (homogeneizados de tecidos) das quais houve isolamento pelo bioensaio, usando *nested*PCR-RFLP no *locus SAG2*. Foram caracterizadas 22 amostras (62,8%), 21 delas idênticas aos dos isolados correspondentes. Em uma amostra genótipo misto foi obtido dos tecidos primários e tipo I no isolado. Os genótipos mistos foram confirmados pelo seqüenciamento de DNA dos produtos da *nested*PCR obtidos das amostras primárias das capivaras.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Isolados. Genótipos. Caracterização molecular. Capivaras.

ABSTRACT

YAI, L. E. O. **Biological and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State.** [Caracterização biológica e genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) do Estado de São Paulo]. 2007. 137 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Antibodies to *Toxoplasma gondii* were assayed by the modified agglutination test (MAT) in serum samples of 68 capybaras from six counties in São Paulo state, Brazil. Antibodies (MAT \geq 25) were found in 51 (75%) capybaras examined. Tissues (brain, heart and tongue) of 40 of the seropositive capybaras were bioassayed in mice and 36 (90%) isolates were obtained. There was no statistical association between number of isolates and age ($p=0.21$), gender ($p=0.58$) and type of rearing ($p=0.62$), as well as no association with frequency of isolations and antibody titer distribution ($p=0.99$). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in PCR-amplified *SAG2* locus products revealed that 20 isolates (55.5%) were genotype I, 14 (38.9%) were genotype III and two (5.6%) were mixed genotypes (types I and III). Type II isolate was not found. The proportion of type I isolates in the group of wildlife capybaras was higher ($p=0.049$) than in the captive rearing group. On the other hand, the proportion of type III isolates was significantly higher in the captive rearing group ($p=0.041$). Most of the type I isolates (12/20) killed all infected mice and none of those groups had 100% of surviving mice. Most of the mice infected with genotype III isolate survived. The mortality rate in mice infected with genotype I (86%) was higher than the type III (44.9%) ($p<0.001$) and mice infected with type III isolates survived for longer periods than type I isolates ($p<0.001$). Tissue cysts were found in mice infected with all 36 isolates. Genotyping was also done directly from the tissue homogenates from the 35 of 36 capybaras using nested-PCR-RFLP analysis on the *SAG2* locus. Twenty-two samples (62.8%) were characterized and in 21 the genotypes found were the same as those from the corresponding isolates. In one sample, mixed genotype was detected directly from the primary sample and type I from the mice isolate. The mixed genotype was confirmed by direct DNA sequencing of the nestedPCR products from the capybaras primary samples.

Key words: *Toxoplasma gondii*. Isolates. Genotypes. Characterization molecular. Capybaras.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do sistema proposto por Howe et al. (1997) para genotipagem de *T. gondii*, baseado na *nested-PCR-RFLP* de fragmentos do *locus SAG2*. Neste procedimento, dois produtos de *nested-PCR* são produzidos e submetidos a restrição enzimática.....72
- Figura 2 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números das capivaras (CAP) correspondentes aos isolados. C=cérebro; P=pulmão; Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas)91
- Figura 3 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras naturalmente infectadas. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números das capivaras correspondentes aos isolados. C=cérebro; P=pulmão; Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). A amostra 914C (capivara 7) exhibe padrão tipo III e as restantes (913P, 916P e 917P) mostram padrão tipo I.....92
- Figura 4 - *nPCR-RFLP* do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente a partir de amostras primárias de capivaras infectadas naturalmente. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease

HhaI, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números das capivaras. CO= controle negativo (sem DNA). Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras das capivaras 7 e 38 mostram padrões de infecção mista ou digetão parcial.....94

Figura 5 - PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* das amostras de camundongos e *nPCR-RFLP* diretamente de amostras primárias da capivara 38. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e as alíquotas dos tecidos (A-E) da capivara 38. P=Pulmão. CO= controle negativo (sem DNA). Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras da capivaras 38 mostram padrões de infecção mista ou digetão parcial.....95

Figura 6 - Análise de seqüências de DNA de produtos da *nPCR* do fragmento 5' do *locus SAG2*, para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* de amostras primárias da capivara 38. A seta indica a localização do sítio polimórfico. (A) alíquota A: o programa reconheceu a base Timidina no sítio de polimorfismo, mas apresenta também um pico com a base Citosina. (B), (D) e (E) alíquotas B, D e E: genótipos tipo I, sem sítio de restrição para a enzima *MBOI* (GATT). (C) alíquota C: genótipo tipo III, com sítio de restrição para a enzima *MBOI* (GATC)97

Figura 7 – Mapa do Estado de São Paulo indicando a localização de seis municípios e número correspondente de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras naturalmente infectadas, segundo o genótipo no *SAG2*. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – VPS – FMVZ – USP99

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Número de capivaras examinadas e soropositivas para anticorpos anti-*T. gondii*, segundo o tipo de criação - São Paulo - 200683
- Gráfico 2 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, segundo o tipo de criação (criadouro e vida livre) - São Paulo - 200684
- Gráfico 3 – Número de bioensaios realizados e isolamentos de *T. gondii* de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, através de bioensaio em camundongos, segundo o tipo de criação das capivaras - São Paulo - 200686
- Gráfico 4 - Distribuição dos genótipos, determinados pela PCR-RFLP do locus SAG2, das amostras de *Toxoplasma gondii* de capivaras infectadas naturalmente - São Paulo - 2006.....98
- Gráfico 5 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de capivaras, segundo o genótipos encontrados (I, III e I+III) - São Paulo – 2006 100
- Gráfico 6 - Distribuição dos genótipos de *Toxoplasma gondii* de isolados de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, segundo a condição de sobrevivência dos camundongos infectados durante o período experimental - São Paulo - 2006.....102
- Gráfico 7 - Proporção de camundongos sobreviventes infectados com os genótipos I e III de *Toxoplasma gondii*, a partir do dia da inoculação até o término do experimento (60 dias) - São Paulo - 2006..... 103

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas de diferentes países no período de 2002-2007, através da PCR-RFLP no *locus SAG2*54
- Quadro 2 – Comportamento dos produtos da PCR oriundos dos genótipos I, II, III de *toxoplasma gondii* frente à ação das enzimas de restrição *MBOI* e *HhaI*72
- Quadro 3 – Nomes e seqüências dos “primers” usados na PCR para amplificação de fragmentos do gene *SAG2* de *Toxoplasma gondii*73

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Número de capivaras examinadas para a pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> , segundo: município de procedência no Estado de São Paulo, faixa etária e sexo - São Paulo - 2006..... | 64 |
| Tabela 2 – Freqüência de capivaras examinadas e soropositivas para <i>Toxoplasma gondii</i> através do teste de aglutinação modificado (≥ 25), segundo o sexo, faixa etária e o município de procedência no Estado de São Paulo - São Paulo - 2006..... | 82 |
| Tabela 3 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> obtidos pelo teste de aglutinação modificado, em capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo - São Paulo - 2006..... | 84 |
| Tabela 4 - Número de bioensaios em camundongos de tecidos de capivaras, e número de isolados de <i>T. gondii</i> obtidos, segundo o município de procedência das capivaras do Estado de São Paulo - São Paulo - 2006..... | 86 |
| Tabela 5 - Número de isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de capivaras naturalmente infectadas, através do bioensaio em camundongos, segundo os títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> das capivaras - São Paulo - 2006 | 87 |
| Tabela 6 - Número de grupos de camundongos infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> após inoculação com tecidos de capivaras soropositivas, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose - São Paulo - 2006..... | 88 |
| Tabela 7 - Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de capivaras, através de bioensaio em camundongos, segundo o município de procedência no Estado de São Paulo e títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> das capivaras - São Paulo - 2006 | 88 |
| Tabela 7 - Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de capivaras, através de bioensaio em camundongos, segundo o município de procedência no Estado de São Paulo e títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> das capivaras - São Paulo - 2006 | 89 |
| Tabela 8 - Amostras primárias analisadas e positivas, através da amplificação pela <i>n</i> PCR de fragmentos correspondentes às regiões 5' e 3' do <i>locus SAG2</i> de <i>Toxoplasma gondii</i> , segundo o município de procedência - São Paulo - 2006 | 93 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 9 – Genótipos de <i>Toxoplasma gondii</i> de isolados de capivaras naturalmente infectadas, determinados pela PCR-RFLP do locus <i>SAG2</i> , segundo o município de procedência no Estado de São Paulo e a mortalidade em camundongos - São Paulo - 2006..... | 101 |
|---|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|--|
| % | por cento |
| µg | micrograma(s) |
| µL | microlitro(s) |
| µM | micromolar |
| µm | micromilímetro |
| BSA | albumina sérica bovina |
| CH ₃ COONa | acetato de sódio |
| cm | centímetro |
| d | densidade |
| dATP | 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato |
| dCTP | 2'-deoxicitosina 5'-trifosfato |
| dGTP | 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato |
| dTTP | 2'-deoximidina 5'-trifosfato |
| DL | dose letal |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| et al. | e colaboradores |
| g | grama(s) |
| <i>g</i> | aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s ²) |
| H ₃ BO ₃ | ácido bórico |
| HCl | ácido clorídrico |
| <i>Hha</i> | <i>Haemophilus haemolyticus</i> |
| IC | intervalo de confiança |
| IgG | imunoglobulina G |
| IgM | imunoglobulina M |
| KCl | cloreto de potássio |
| Kg | quilograma(s) |
| M | molar |
| MAT | teste de aglutinação modificado |
| <i>Mbo</i> | <i>Moraxella bovis</i> |
| mg | miligrama(s) |
| MgCl ₂ | cloreto de magnésio |
| mL | mililitro(s) |

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

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 | OBJETIVOS | 28 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 30 |
| 3.1 | A CAPIVARA | 30 |
| 3.2 | <i>TOXOPLASMA GONDII</i> | 33 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| 4.1 | PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS..... | 63 |
| 4.2 | LOCAL DO EXPERIMENTO | 64 |
| 4.3 | COLHEITA DE SANGUE E ÓRGÃOS | 64 |
| 4.4 | EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. GONDII</i> | 65 |
| 4.5 | ISOLAMENTO DE <i>T. GONDII</i> EM CAMUNDONGOS..... | 66 |
| 4.5.1 | Digestão péptica de tecidos | 66 |
| 4.5.2 | Bioensaio em camundongos | 67 |
| 4.5.2.1 | Amostras isoladas de camundongos (Isolados)..... | 69 |
| 4.5.2.1.1 | <i>Congelamento</i> | 69 |
| 4.5.2.1.2 | <i>Criopreservação</i> | 69 |
| 4.6 | ANÁLISE GENOTÍPICA..... | 69 |
| 4.6.1 | Extração e purificação do DNA | 69 |
| 4.6.2 | PCR-RFLP | 71 |
| 4.6.2.1 | Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)..... | 73 |
| 4.6.2.2 | Delineamento | 73 |
| 4.6.2.3 | PCR..... | 74 |
| 4.6.2.4 | <i>Nested- PCR</i> | 75 |
| 4.6.2.5 | Ciclo empregado | 75 |
| 4.6.2.6 | Análise do produto amplificado | 76 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.6.2.7 | RFLP | 76 |
| 4.6.3 | Análise por seqüenciamento | 77 |
| 4.6.3.1 | Purificação | 77 |
| 4.6.3.2 | Quantificação | 77 |
| 4.6.3.3 | Reação de seqüenciamento..... | 78 |
| 4.6.3.4 | Precipitação..... | 79 |
| 4.6.3.5 | Preparo das amostras para seqüenciamento..... | 79 |
| 4.7 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 79 |
| 5 | RESULTADOS | 82 |
| 5.1 | SOROLOGIA DAS CAPIVARAS | 82 |
| 5.2 | BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO DE <i>T.GONDII</i> | 85 |
| 5.3 | ANÁLISE GENOTÍPICA | 90 |
| 5.3.1 | PCR-RFLP – Amostras positivas (isolados) | 90 |
| 5.3.2 | PCR-RFLP – Amostras primárias (Capivaras) | 92 |
| 5.3.3 | Análise por seqüenciamento | 95 |
| 5.3.4 | Genótipos de <i>T. gondii</i> em capivaras do Estado de São Paulo | 98 |
| 6 | DISCUSSÃO | 106 |
| 7 | CONCLUSÕES | 115 |
| | REFERÊNCIAS | 117 |
| | APÊNDICE | 134 |

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório com distribuição mundial e capacidade de infectar a maioria dos animais de sangue quente, incluindo aves e animais silvestre e doméstico e o homem (BOOTHROYD et al., 1998). Os primeiros relatos da doença ocorreram em 1909, quando os pesquisadores Nicolle e Manceau¹ (1908 apud TENTER; JOHNSON, 1997, p. 87) descobriram o parasita em um pequeno roedor africano (*Ctenodactylus gondi*) em Túnis, no norte da África. Na mesma época, Splendore² (1908 apud FARREL et al., 1952, p. 181) encontrou o parasita em um coelho de laboratório na cidade de São Paulo, Brasil.

A patogenicidade da infecção por *T. gondii* em diferentes espécies varia muito, sendo que os mais vulneráveis, nos quais a infecção aguda geralmente é fatal, são os marsupiais australianos como os cangurus (*Macropus fuliginosus*), os coalas (*Phascolarctos cinereus*), os macacos do Novo Mundo e os pingüins (INNES, 1997). Aliado a notável capacidade do *T. gondii* de infectar qualquer célula nucleada, estas características explicariam a ampla difusão do parasita no mundo. Estima-se que até um terço da população humana tenha sido exposta ao *T. gondii* (JACKSON; HUTCHISON, 1989; ASHBURN, 1992; DUBEY, 1998b).

T. gondii apresenta um ciclo de vida heteroxeno facultativo, sendo que em Dubey e Towle (1986), estabeleceu as três vias primárias de transmissão: fecal-oral, carnivorismo e congênita. Os únicos hospedeiros definitivos são os felídeos (silvestres e o gato doméstico) e outros mamíferos e aves são os hospedeiros intermediários. Nos felídeos ocorre a multiplicação enteroepitelial, com a produção de oocistos que são levados ao meio ambiente juntamente com as fezes. Além dos oocistos, outras formas de vida existentes nas fases aguda e crônica da infecção (taquizoítos e cistos) são transmitidas ao hospedeiro susceptível, ampliando o risco de infecção para o homem e outros animais.

¹ NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, I. Sur une infection à corps de Leishmann (organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**. Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.

² SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parasita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'umo. Nota preliminare. **Revista Sociedade Scientifica São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

Após a ingestão pelo hospedeiro, a parede externa de cistos ou oocistos é rompida por degradação enzimática e as formas infectantes (bradizoítos ou esporozoítos) são liberadas no lume intestinal. No intestino, elas rapidamente invadem as células e se diferenciam em taquizoítos (formas de multiplicação rápida), que se dividem assexuadamente por endodiogenia (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000)

A infecção também pode ser vertical, por transmissão transplacentária de taquizoítas (FRENKEL, 1990; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A toxoplasmose congênita é uma das mais significativas causas de abortamento e mortalidade neonatal em ovinos, caprinos e suínos em vários países (DUBEY; TOWLE, 1986). Por outro lado, a toxoplasmose adquirida em condições naturais, através da via oral, é a principal forma de ocorrência e disseminação do agente dentro da população humana e animal.

Normalmente, o *T. gondii* parasita o hospedeiro sem produzir sinais clínicos, mas leva à formação de cistos latentes que podem persistir durante a vida do indivíduo. Os maiores problemas clínicos da toxoplasmose referem-se à (1) infecção primária durante a gestação, que pode resultar em infecção congênita do feto, levando a quadros neurológicos e oculares variados, como retardo mental e cegueira em crianças; em ovinos, caprinos e suínos, leva a abortamentos e mortalidade neonatal causando perdas econômicas; (2) reativação de infecções latentes em indivíduos imunossuprimidos, levando a quadros clínicos severos e às vezes fatais (DUBEY; BEATTIE, 1988; LÜDER; GROSS, 1998; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Pouco se sabe sobre a importância da transmissão horizontal do *T. gondii* entre diferentes espécies de hospedeiros, a importância dos reservatórios do parasita na natureza e do impacto epidemiológico de diferentes espécies causando infecção ou doença em seres humanos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Como a capivara vive em ambientes com recurso hídrico e grande variedade de vegetação, habitat propício para a sobrevivência de oocistos de *T. gondii*, torna-se compreensível o encontro de alta prevalência de animais soropositivos. Acrescenta-se ainda que a capivara encontra-se em número abundante em várias regiões do Estado de São Paulo, devido ao alto grau de interferência humana no meio ambiente e à falta de predadores. Essa elevada

densidade populacional tem levado a ocorrência crescente de danos à agricultura (FERRAZ et al., 2003) e riscos à saúde pública (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA). O IBAMA, com o intuito de minimizar tais problemas, tem incentivado o encaminhamento desses animais para criadouros comerciais, a fim de destiná-los ao consumo humano.

Para a detecção de cistos teciduais do *T. gondii* nos órgãos dos hospedeiros, o método de digestão de tecidos seguido de bioensaio em camundongos pode ser utilizado a fim de aumentar a taxa de recuperação do parasito (DUBEY, 1998a). O bioensaio em camundongos é importante, pois o número de cistos em animais maiores é baixo, ao redor de um cisto por 25-250 g de órgão. A digestão dos tecidos de um hospedeiro em tripsina ou pepsina permite o exame de maior quantidade de material, levando à dissolução da parede dos cistos, liberando os bradizoítos. Um cisto de *T. gondii* contém quatro a muitas centenas de bradizoítos, dependendo da amostra, hospedeiro e tempo de infecção (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY, 1997).

A seleção de tecidos examinados também é um fator importante. Em capivaras, não há relatos de quais os melhores órgãos para o isolamento do parasita, entretanto em outros roedores como camundongos e ratos, o cérebro é o órgão de eleição (DUBEY, 1997). Também no suíno, animal de porte médio à semelhança da capivara, foram pesquisados órgãos de eleição para isolamento de *T.gondii* em camundongos e verificaram que a taxa de recuperação do parasita do coração, cérebro e língua era alta (DUBEY; MURREL; FAYER, 1984; DUBEY, 1988).

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

inoculados experimentalmente com oocistos de *T. gondii*, a susceptibilidade de três diferentes raças (*Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis*) foi avaliada quanto aos parâmetros clínico-laboratoriais. Os autores verificaram que os taurinos foram mais sensíveis ao *T. gondii* do que os zebuínos e estes não diferiram significativamente dos bubalinos, que tiveram aparente normalidade clínico-laboratorial (OLIVEIRA; COSTA; SABATINI, 2001), mostrando que raça e espécie também podem interferir na infecção por este patógeno.

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

A caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* através de métodos moleculares tem sido realizada com amostras de humanos, ovinos, suínos, aves, cães, gatos e animais silvestres.

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

Entretanto, estes estudos foram realizados em amostras procedentes principalmente da Europa e América do Norte e quando as pesquisas começaram a se estender para outros países de outros continentes (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; FERREIRA et al., 2006), observaram alta porcentagem de genótipos atípicos ou recombinantes, sugerindo

que a população de *T. gondii* seria altamente diversa nessas regiões, apontando para variações na epidemiologia do *T. gondii* dependendo da região estudada.

Objetivos

2 OBJETIVOS

As capivaras estão muito disseminadas em todo o Brasil e são utilizadas no consumo de sua carne por humanos. Devido à falta de informações sobre as características biológicas e genóticas dos isolados do *T. gondii* nessa espécie, o estudo tem como objetivos:

- ❖ Isolamento e caracterização biológica de *T. gondii* em tecidos de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, através de bioensaio em camundongos, e
- ❖ Caracterização genotípica dos isolados obtidos e das amostras primárias das capivaras através da utilização da técnica de PCR-RFLP, usando como marcador o *locus SAG2*.

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A CAPIVARA

Os primeiros roedores notificados no continente sul-americano datam de aproximadamente 45 milhões de anos (WYSS et al., 1993) e os mais importantes roedores histricognatas com potencial produtivo para manejo são: a paca, a cutia e a capivara. Pertencem à super-família Cavioidea e a capivara à família Hydrochaeridae, com um gênero e duas espécies: *Hydrochaeris hydrochaeris* e *H. isthmus* (MOREIRA; MACDONALD, 1997).

A capivara é o maior roedor existente com comprimento de 100 a 130cm, altura de até 50cm e peso médio do animal adulto de 52,41 Kg (MOREIRA; MACDONALD, 1993). A capivara é uma espécie semi-aquática, vive próxima da água, raramente a mais de 500m longe desta (OJASTI, 1991). Devido ao fato de não possuir glândulas sudoríparas bem desenvolvidas e destas ficarem muito esparsas no corpo, o animal necessita de água ou de abrigo sombrio para a regulação da temperatura corporal (PEREIRA; MCEVAN; FINLEY, 1980).

Vivem em grupos sociais, nos mais diferentes tipos de ambientes, desde matas ciliares até savanas com áreas alagáveis nos tempos chuvosos, em um corpo d'água, numa área seca (OJASTI, 1973), em manguezais salobros ou mesmo áreas de altitudes de até 1.500m como o Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros em Goiás (MOREIRA; MACDONALD, 1997).

Os grupos são formados geralmente por um macho dominante, dois ou três machos submissos, fêmeas em maior números, jovens e filhotes. Apresentam tamanhos e composições diferentes conforme o tipo de ambiente: em áreas pouco alteradas, variam de três a 14 indivíduos (MACDONALD, 1981) e em áreas antropizadas podem conviver mais de 40 animais adultos. É um animal herbívoro primário, alimentando-se, primariamente de capins, principalmente os de áreas alagadas e plantas aquáticas, porém se adapta facilmente a outros itens alimentares, como: milho, cana de açúcar, abóbora etc. Apresenta eficiência

digestiva similar aos ruminantes ao redor de 52% (ESCOBAR; GONZÁLEZ-JIMENEZ, 1976).

Sua exploração, principalmente para o consumo de carne, remonta desde a caça de subsistência, praticada por camponeses e comunidades indígenas. Os roedores formam a segunda ordem dentre os mamíferos mais capturados pelos índios, superados apenas pelos primatas. Por outro lado, a carne de capivara, fresca ou salgada, é muito apreciada em algumas regiões, principalmente da América do Sul (OJASTI, 1991).

Esses animais estão largamente distribuídos nas Américas Central e Sul, sendo que todos os países, exceto o Chile, possuem populações de capivaras, sendo descrita uma densidade populacional no Pantanal de 1,6 a 7 animais/km² (SCHALLER, 1983; ALHO; CAMPOS; GONÇALVES, 1987) e na Venezuela de 0,3 a 36 animal/ km² (OJASTI, 1973).

No Estado de São Paulo a capivara apresenta alta densidade em ambientes com elevado grau de antropização. Esse elevado número vem ocasionando sérios danos à agricultura, cujas reclamações vem crescendo nos últimos anos. Ferraz et al. (2003) realizaram estudo para avaliar quantitativamente os danos causados por esta espécie numa plantação de milho e verificaram que cerca de 26,5% da área plantada foi danificada. Por outro lado não existem levantamentos populacionais na região, existindo somente dados de reclamações registrados no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, do Ministério do Meio Ambiente (IBAMA). Esse número está crescendo nos últimos anos e estão concentrados principalmente na região centro/leste e centro/noroeste do Estado de São Paulo (IBAMA).

No Brasil, a capivara tem sido vista como alto potencial de recurso natural renovável e seu manejo assistido pode representar alta rentabilidade e reduzir seu impacto danoso à agricultura e riscos de transmissão de doenças para o homem e animais domésticos, que seriam os criadouros.

Para a criação de capivaras, segundo o IBAMA, o ideal seria através do manejo semi-extensivo, que consistiria em manejar os animais em áreas naturais, sem confinamento. Estas áreas naturais são constituídas por lagoas ou reservatórios artificiais em cujas margens ou próximo a elas existem pequenos capões de mata e

áreas abertas ou pastos. As coleções hídricas, os capões de mata e as áreas abertas juntas constituem o habitat ideal para a capivara.

Ao redor da lagoa é realizado um cercamento para evitar a fuga dos animais e o manejo alimentar consiste em adicionar, no brete específico, alguns itens à dieta da capivara, como milho e capim. O manejo sanitário, também realizado em brete, consiste em realizar pulverizações periódicas com carrapaticidas e vermifugações.

A área cercada é utilizada para o manejo de apenas um grupo familiar. Quando o criador pretende trabalhar com mais de um grupo, a área é subdividida em piquetes para evitar a competição entre os indivíduos. A territorialidade e a estrutura hierárquica da capivara são características da espécie que inviabilizam a criação de mais de um grupo no mesmo piquete.

O plantel inicial é formado a partir de capturas autorizadas ou pela aquisição de matrizes e reprodutores de criadouros registrados no IBAMA. Os animais provenientes de captura devem permanecer no criadouro e não podem ser destinados ao abate. O abate é permitido somente a partir da geração F1.

Nos criadouros, quando os animais podem ser mais bem observados, não se tem registros de encontro de sinais clínicos sugestivos de enfermidades e poucas pesquisas de isolamento de microorganismos patogênicos (BERSANO et al., 2002). Na literatura tem-se encontrado alguns estudos de ocorrência de helmintos em capivaras (HOFFMANN et al., 1986; COSTA; CATTO, 1994; NASCIMENTO et al., 2000), oocistos de *Eimeria* spp (CASAS; DUSZYNSKI; ZALLES, 1995), parvovírus suíno (BERSANO et al., 2000) e isolamento de *Trypanosoma evansi* (MUÑOZ; CHÁVEZ, 2001).

Com relação às zoonoses, os roedores são reservatórios naturais de muitas doenças: leptospirose (FOWLER, 1986), hantavirose (ACHA; SZIFRES, 1986), leishmaniose cutânea (GOMES et al., 1990) entre outras. Em relação à febre maculosa, existe uma forte associação epidemiológica entre o aumento da incidência da doença em algumas áreas do Estado de São Paulo, a partir da década de 90, com o notável aumento das populações de capivaras nestes locais, no mesmo período. Também, a capivara pode ser um potencial reservatório da

bactéria uma vez que é considerado hospedeiro primário para o carrapato *Amblyomma cajennense* (LABRUNA et al., 2002).

3.2 TOXOPLASMA GONDII

Pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem: Eimeriina, Família Sarcocystidae e Sub-família Toxoplasmatinae, Gênero: *Toxoplasma* (LEVINE et al., 1980). O gênero *Toxoplasma* compreende somente uma espécie válida: *Toxoplasma gondii*.

O ciclo biológico do *T. gondii* foi somente elucidado após mais de 50 anos do primeiro relato de encontro de taquizoítas no baço, fígado e sangue de roedor silvestre do norte da África (NICOLLE; MANCEUAX¹ 1908, apud TENTER; JOHNSON, 1997, p. 87), e começou com a descoberta de que material fecal de gatos que foram alimentados previamente com carcassas e cérebros de camundongos infectados com cistos induzia infecção quando ingerido por outro camundongo (TENTER; JOHNSON, 1997).

Análise genética do *T. gondii* tem revelado um genoma nuclear marcadamente estável de 87 Mb (megabase), consistindo de 14 cromossomos; um DNA circular extracromossomal dentro de uma organela (apicoplasto) com propriedades plastídeo-*like* de 35Kb (kilobase) e um genoma mitocondrial de 6 Kb. O genoma nuclear é haploide para a maioria dos estágios do ciclo do parasita, exceto para uma fase diploide breve no intestino do gato antes da meiose. Os 14 cromossomos são designados por números romanos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI, XII) e os tamanhos variam de aproximadamente 1,8 Mb a > 10 Mb. *T. gondii* mantém um genoma nuclear bastante conservado, apesar do amplo espectro de hospedeiros e o ciclo sexual não obrigatório (AJIOKA; FITZPATRICK; REITTER, 2001; SU et al., 2002; KHAN et al., 2005).

¹ NICOLLE, M. M. C.; MANCEAUX, I. Sur une infection à corps de Leishmann (organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**. Paris, v. 147, p. 763-766, 1908.

Existem três estágios infectivos de *T. gondii*: taquizoíto, bradizoíto (em cistos teciduais) e esporozoíto (em oocistos). Tanto os hospedeiros definitivos como os intermediários são susceptíveis aos três estágios de *T. gondii* e podem adquirir a infecção pelas vias: (1) horizontal, através da ingestão de oocistos esporulados no meio ambiente; (2) horizontal, pela ingestão de cistos teciduais contidos em carne crua ou mal cozida ou mesmo vísceras de hospedeiros intermediários e (3) vertical, pela transmissão transplacentária por taquizoítos. Assim, *T. gondii* pode ser transmitido dos hospedeiros definitivos para os intermediários, dos intermediários para os definitivos, assim como entre os hospedeiros definitivos e entre os intermediários. O ciclo de vida pode continuar indefinidamente pela transmissão de cistos teciduais entre hospedeiros intermediários (mesmo na ausência dos hospedeiros definitivos) e também pela transmissão de *T. gondii*, através de oocistos entre hospedeiros definitivos, mesmo na ausência de hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Os taquizoítos apresentam a forma em lua crescente, medindo 2 μm x 6 μm de tamanho, penetram a célula hospedeira ativamente pela membrana celular, sendo então, envoltos pelo vacúolo parasitóforo, que os protege dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Multiplicam-se assexuadamente por divisões binárias repetidas até a ruptura da célula, infectando indiscriminadamente muitos tipos celulares e se disseminando rapidamente dentro do organismo do hospedeiro. Após um número desconhecido de divisões, os taquizoítos passam para outro estágio: bradizoítos, dentro de cistos tissulares (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

Os cistos tissulares crescem e permanecem intracelulares. Variam de 5 μm a 70 μm e contém de poucos a várias centenas de bradizoítos. Intactos são inofensivos e podem persistir ao longo da vida do hospedeiro (DUBEY, 1998a), são mais prevalentes nos tecidos muscular e neural, incluindo o cérebro, olhos, músculos cardíaco e esquelético. Os bradizoítos crescem mais lentamente dentro de cistos tissulares, apresentam também a forma de lua crescente, porém mais delgados que os taquizoítos, medindo 1,5 μm x 7 μm de tamanho. O núcleo no bradizoíto está localizado na direção da extremidade posterior, enquanto no taquizoíto a localização é mais central, assim como os bradizoítos são mais resistentes à ação de enzimas proteolíticas. Quando ingerido por um gato, a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago e intestino delgado e

então são liberados os bradizoítos. Alguns penetram a lâmina própria do intestino e se multiplicam como taquizoítos e em poucas horas se disseminam pelos tecidos extra-intestinais. Outros bradizoítos penetram as células do epitélio intestinal e iniciam-se as gerações assexuadas (esquizontes tipo A-E). Os merozoítos, liberados dos esquizontes, formam os gametas masculinos e femininos. Após a fertilização, formam-se as paredes dos oocistos em volta dos gametas e quando os oocistos tornam-se maduros são liberados na luz intestinal através da ruptura das células do epitélio intestinal (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

Os oocistos são formados unicamente nos felinos domésticos e silvestres. Eliminam oocistos após ingestão de bradizoítos, taquizoítos ou esporozoítos, porém, menos de 50% dos gatos eliminam oocistos após ingestão de taquizoítos ou oocistos, enquanto praticamente todos eliminam oocistos após ingestão de bradizoítos (DUBEY; FRENKEL, 1976).

Os oocistos recém eliminados nas fezes, não estão esporulados (não infectantes), apresentam a forma subesférica para esférica e tamanho de 10 µm x 12 µm. A esporulação ocorre no meio ambiente dentro de um a cinco dias, dependendo da aeração e temperatura. Os oocistos esporulados contém dois esporocistos elipsoidais. Cada esporocisto contém quatro esporozoítos (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

Os hospedeiros, incluindo os gatos, podem adquirir *T. gondii* pela ingestão de animais infectados ou alimento ou água contaminados com oocistos esporulados, ou pela transmissão transplacentária. Após a ingestão, os bradizoítos ou esporozoítos penetram os tecidos intestinais, transformam-se em taquizoítos, os quais multiplicam-se no local e se disseminam pelo organismo pela via sanguínea ou linfática. Após poucos ciclos de multiplicação, os taquizoítos se transformam em bradizoítos em uma variedade de tecidos (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

Oocistos de *T. gondii* são eliminados pelos gatos domésticos e outros felinos, resultando na contaminação do meio ambiente (DUBEY; BEATTIE, 1988) e os gatos domésticos são provavelmente a maior fonte de contaminação, pois, uma simples defecação do gato pode conter em torno de 10 milhões de oocistos (DUBEY; BEATTIE, 1988). Oocistos não esporulados podem sobreviver por pelo menos três meses no meio ambiente e conservar sua habilidade em infectar, quando colocados sob condições apropriadas (LINDSAY; BLAGBURN; DUBEY, 2002).

Esses oocistos infectantes podem sobreviver por até 18 meses em condições adversas, contaminando a água e as pastagens e disseminando, por sua vez, o parasita entre os herbívoros (DUBEY; BEATTIE, 1988). Dubey, Hoover e Walls (1977) verificaram que os gatos são susceptíveis em qualquer idade, sexo e raça, sendo que gatinhos infectados congenitalmente também podem eliminar oocistos (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

As taxas de infecção em gatos podem ser determinadas pela taxa de infecção da população de aves e roedores de um determinado local, como foi relatado na Costa Rica, onde foram encontrados oocistos em 23,2% de 232 gatos analisados e a infecção das aves e roedores também foi alta (RUIZ; FRENKEL, 1980).

No Rio de Janeiro (Brasil), foram descritos casos endêmicos da infecção em humanos, onde aproximadamente 60% das crianças de seis a oito anos de idade apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, os quais foram relacionados a ingestão de oocistos do meio ambiente altamente contaminado (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

A água tem sido considerada um importante veículo de disseminação da toxoplasmose humana. Ocorrência de surtos por essa via, pela presença de oocistos de *T. gondii* foi descrita no Canadá, onde 7718 pessoas adquiriram a infecção por *T. gondii* devido à ingestão de água de um reservatório municipal. No Panamá, recrutas das forças armadas, realizando exercícios na selva, adquiriram a infecção ingerindo água de pequeno reservatório de abastecimento público de água (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

No Brasil, foi relatada a ocorrência de surto de toxoplasmose no campus da universidade de São Paulo, na cidade de São Carlos, onde 113 indivíduos apresentaram sintomas e possivelmente a transmissão foi através de água ou alimento contaminado por oocistos, uma vez que pelo menos 200 gatos viviam livremente no local (GATTÁS et al., 2000).

Bahia-Oliveira et al. (2003) verificaram alta porcentagem de soropositivos entre pessoas de baixo nível sócio-econômico (84%) em levantamento sorológico realizado em Campos dos Goytacazes (RJ) e sugerem que a água seria a via principal de transmissão de oocistos de *T. gondii*, uma vez que essas pessoas costumam ingerir água não filtrada de poços, lagos ou riachos.

Recentemente, em Santa Isabel do Ivaí (PR) foi relatado um surto por toxoplasmose na população, da qual foram examinadas 2884 pessoas, sendo detectados anticorpos IgG anti-*T. gondii* em 1255 pessoas. Anticorpos IgM e IgG foram detectados em 426 indivíduos. Este surto foi relacionado à ingestão de água de um dos dois reservatórios do Município, contaminado com fezes de uma família de gatos, estabelecida nos arredores do reservatório (DE MOURA et al., 2006).

Felídeos silvestres têm apresentado papel muito importante na transmissão do *T. gondii* em alguns ambientes. Apesar da ampla distribuição de *T. gondii* no mundo, existem pequenas ilhas e atóis, onde a infecção pelo parasita é virtualmente ausente, devido ao fato da ausência de gatos nesses locais (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Wallace, Zigas e Gajdusek (1974) verificaram prevalências inferiores a 2% em populações primitivas de Nova Guiné, onde a presença de gatos e felídeos silvestres é pouco freqüente, em contraposição às prevalências de 14 a 34% em populações que vivem onde os gatos são numerosos ou vivem na área há muito tempo. Também observaram uma prevalência de 50% em indígenas primitivos das selvas da Colômbia que não possuíam gatos domésticos, mas se alimentavam de felídeos silvestres.

No Brasil, em estudo de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* realizado por Amendoeira et al. (2003) em população indígena do Mato Grosso (MT), os Enawenê-Nawê, 80,4% dos 148 soros analisados foram positivos. Analisando-se os hábitos e costumes, aliados à alta soropositividade encontrada, os autores sugeriram que a presença de felinos silvestres nas imediações da aldeia e coleções de água poderia ter papel importante como fonte de infecção, contaminando o solo e, conseqüentemente, os insetos e fungos consumidos pelos índios.

A toxoplasmose tem sido severa em muitas espécies animais. Em ovinos e caprinos podem ocorrer morte embrionária e reabsorção, morte fetal e mumificação, abortamentos, nascimento prematuro e morte neonatal. Em suínos *T. gondii* pode causar mortalidade em jovens e nos animais silvestres a doença é severa, geralmente fatal, como nos marsupiais australianos, macacos do novo mundo, gatos selvagens e canários (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004) e entre os mamíferos marinhos, as lontras tem apresentado altas taxas de mortalidade devido a encefalites por toxoplasmose ao longo da costa da Califórnia (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004 et al., 2003).

Estima-se que nos EUA a reativação da toxoplasmose, com patologia grave no SNC, ocorra em aproximadamente 30% dos indivíduos que apresentam sorologia positiva para *T. gondii* e a síndrome da imunodeficiência adquirida simultaneamente (LUFT; REMINGTON, 1992). A encefalite é a manifestação mais importante da toxoplasmose em indivíduos imunossuprimidos, sendo a maior causa de mortes entre pacientes com AIDS (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

A infecção congênita pode ocorrer seguida da infecção materna durante a gravidez, porém, nem todas as infecções são transmitidas ao feto e o primeiro caso de infecção congênita por toxoplasmose em humanos foi descrito em 1923 (SUKTHANA, 2006). A incidência da infecção fetal é de aproximadamente 10% a 15% quando ocorre a infecção materna durante o primeiro trimestre da gestação, 30% no segundo trimestre e 60% no terceiro trimestre (WONG; REMINGTON, 1994). A severidade da doença depende do estágio da gravidez em que ocorreu a infecção. Pode ser leve como uma pequena diminuição da acuidade visual, quando a infecção ocorre no terço final de gravidez ou se ocorrer no início da gravidez, desenvolver sinais completos da tetrade como: retinocoroidite, hidrocefalia, convulsão e calcificação cerebral. (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

A infecção adquirida em humanos pode ser localizada ou generalizada, sendo a linfadenite a forma mais frequentemente observada. A linfadenopatia pode estar associada à febre, fadiga, dor muscular, mal estar, dor de garganta e dor de cabeça (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004). O primeiro caso em adulto foi diagnosticado em 1940, apesar da descoberta do ciclo biológico somente em 1970 (SUKTHANA, 2006).

A maioria das pesquisas em *T. gondii* têm sido focadas em seres humanos e animais domésticos, porém estudos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos silvestres têm sido realizados (DUBEY; BEATTIE, 1988; DRESEN, 1990; SMITH; FRENKEL, 1995). Os carnívoros silvestres têm apresentado alta prevalência (45%) e nos herbívoros e omnívoros também tem-se encontrado positividade, de 8% a 19% (FRANTI et al., 1976; BURRIDGE et al., 1979).

Na Finlândia, Oksanen et al. (1997) examinaram 2577 amostras de soro de renas (herbívoros) e encontraram 0,9% de positividade e observaram que a prevalência da infecção por *T. gondii* nos adultos foi significativamente maior do que nos jovens. Nos EUA, Smith e Frenkel (1995) encontraram 15% dos animais

omnívoros e 11% dos herbívoros soropositivos para anticorpos anti-*T. gondii*. Estudos de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais silvestres (52 espécies) também foram realizados na República Popular da China, dos quais 11,1% dos pássaros, 25% dos primatas, 69,4% dos carnívoros e 27,6% dos herbívoros foram positivos (ZHANG et al., 2000).

Nos EUA os carnívoros silvestres têm apresentado alta prevalência (59,0% a 85,9%) (DUBEY et al., 1999) e no Brasil, Gennari et al. (2004), em canídeos silvestres brasileiros, encontraram 35,1% de positividade para anticorpos anti-*T. gondii*.

Entre todos os hospedeiros de *T. gondii* nos EUA e talvez no mundo, os ursos pretos (*Ursus americanus*) apresentam prevalência mais alta (82%). Também, os racoons (*Procyon lotor*) apresentam altas prevalências, entre 48% e 70% e os veados (*Odocoileus virginiana*), 46,5% (DUBEY et al., 2004d).

Carme et al. (2002) verificaram alta soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais não carnívoros da Guiana Francesa (paca, tatu, porco selvagem, tamanduá), variando de 42 a 62% de soropositivos.

Thoisy et al. (2003) analisaram 456 amostras de soros de mamíferos silvestres neotropicais da Guiana Francesa, dos quais foram soropositivos animais das ordens: marsupialia (8% a 20%), xenarthra (0% a 39%), carnívora (10% a 72%), artiodactyla (40% a 68%), primata (05 a 4%) e rodentia (0% a 60%). Os autores também observaram que os animais terrestres eram significativamente mais expostos ao *T. gondii* do que outros mamíferos, devido, provavelmente à exposição oral aos oocistos presentes no solo e/ou carnivorismo.

Com o objetivo de investigar a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em mamíferos silvestres do Parque Nacional de Emas (Goiás), foram examinadas 327 amostras de soro, das quais, 148 (45,3%) foram positivas. Entre os canídeos, 70% dos lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), 38,7% dos cachorros do mato (*Cerdocyon thous*) e 50% das raposas-do-campo (*Pseudolopex vetulus*) apresentaram-se soropositivos. Dos felídeos, 100% dos gatos-palheiro (*Leopardus colocolo*), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) e suçuaranas (*Puma concolor*) e 75% das onças-pintadas (*Panthera onca*) foram positivos. 42,3% das amostras de soro

de queixada (*Tayassu pecari*) e 20% de cateto (*Tayassu tajacu*) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* (SOUZA et al., 2006).

Em gambás da espécie *Didelphis marsupialis*, procedentes da Flórida (EUA), Burridge et al. (1979) encontraram 11% dos animais soropositivos e Hill et al. (1998) encontraram 23% de positividade em gambás da espécie *D. virginiana*, procedentes de Iowa (EUA). No Brasil, foram observadas ocorrências entre 4,7% e 20,4% em gambás da espécie *D. marsupialis* (SALATA et al., 1985; YAI et al., 2003).

Silva (2001) analisou 865 amostras de soro de sete espécies de felídeos silvestres neotropicais no Brasil provenientes de cativeiros e encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em 54,6% dos animais.

Em roedores, estudos de prevalência em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos, encontraram valores de ocorrência de 0 a 35% (FRANTI et al., 1976; BURRIDGE et al., 1979; SMITH et al., 1992; WEBSTER, 1994; SMITH; FRENKEL, 1995; DEFEO et al., 2002; ZHANG et al., 2004).

Franti et al. (1976) analisaram soros de 160 roedores (ratos e camundongos domésticos), provenientes de habitats rurais do norte da Califórnia, encontraram 4% de animais soropositivos. Também observaram que 2% de um total de 399 roedores cricetinos, capturados em habitats silvestres, estavam infectados.

Na Flórida, foram encontrados 13% dos ratos de telhado (*Rattus rattus*) e 25% das ratazanas (*R. norvegicus*) infectados por *T. gondii* (BURRIDGE et al., 1979). Também nos EUA (Maryland), Childs e Seegar (1986) encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em 49,5% de 109 ratos (*R. norvegicus*) examinados.

Smith et al. (1992), estudando a epidemiologia da toxoplasmose em criação de suínos em Iowa, relataram o encontro de 0.3% (2/588) de camundongos (*Mus musculus*) positivos. Porém não encontraram anticorpos anti-*T. gondii* em nenhuma das 21 amostras de soro de camundongos do gênero *Peromyscus* e de nove amostras de soro de ratazanas (*Rattus norvegicus*).

No Missouri foi encontrada baixa prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* (3%) em camundongos (*Mus musculus* e *Peromyscus spp*) e ratos (*Rattus norvegicus* e *Sigmodon hispidus*) (SMITH; FRENKEL, 1995).

DeFeo et al. (2002) fizeram uma investigação epidemiológica através da soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em gatos e roedores em Rhode Island (EUA), sendo que de 756 soros de pequenos roedores silvestres, somente 0.8% foram positivos (6/756).

Na Costa Rica, Chinchilla (1978) examinaram 100 camundongos (*Mus musculus*) e 23 ratos (*R. rattus* e *R. norvegicus*) e encontraram 5% e 30,4% de animais soropositivos, respectivamente.

Na Arábia Saudita foi encontrada soroprevalência de 12,5% em camundongos (*Mus musculus*) e 41,7% em ratos (*R. norvegicus*) (MORSY et al., 1994).

Estudos realizados no Reino Unido, com seis populações de ratos (*R. norvegicus*) de vida livre e uma população controle, sem possibilidade de contato com gatos, a prevalência encontrada foi de 37% e 44%, respectivamente. O autor sugere que *T. gondii* estaria se perpetuando nas populações de ratos e seria principalmente devido à via congênita (WEBSTER, 1994).

Testes sorológicos realizados em 200 camundongos (*Mus domesticus*) capturados na região de Manchester (Reino Unido) detectaram anticorpos anti-*T. gondii* em 59% dos animais (MARSHALL et al., 2004).

Recentemente Dubey et al. (2006c) analisaram amostras de soro de 238 ratos (*Rattus norvegicus*) capturados em Grenada e encontraram somente dois (0,8%) animais positivos.

Especificamente em relação às capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) não haviam estudos relativos a essa zoonose até 2003, quando Cañón-Franco et al. estudaram a ocorrência de *T. gondii* em soros de 149 capivaras de vida livre procedentes de vários municípios do Estado de São Paulo (São Paulo, Pirassununga, Paulínia, Monte Alegre do Sul, Campinas e São João da Boa Vista). Os autores encontraram 69,8% de animais soropositivos ao agente pela técnica de aglutinação modificada (MAT).

Tentativas de isolamento de *T. gondii* de tecidos de animais silvestres tem sido realizadas através de bioensaios em camundongos e em gatos. Dubey, Morales e Lehemann (2004) conseguiram alta porcentagem de isolamentos (70%), de *T. gondii* de coração de ursos pretos (*Ursus americanus*) através de bioensaio em

gatos. Também conseguiram 21 (61,7%) isolados de *T. gondii*, pelo bioensaio em camundongos, de coração de 34 veados (*Odocoileus virginianus*) e das 33 amostras de coração de racoons (*Procyon lotor*), conseguiram isolar sete amostras (21,2%). Isolaram *T. gondii* de coração de todos os cinco lincos (*Linx rufus*), das duas raposas (*Urocyon cinereoargenteus* e *Vulpes vulpes*) e um coiote (*Canis latrans*) soropositivos, todos dos EUA.

A virulência de *T. gondii* está bem caracterizada no modelo murino, sendo normalmente baseada na dose letal de 100% (DL₁₀₀) em camundongos (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992; HOWE; SUMMERS; SIBLEY, 1996; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005). Os critérios para avaliação da virulência no camundongo têm sido a taxa de mortalidade e o tempo até a morte de camundongos infectados com inóculos graduais do parasita (KAUFMAN; REMINGTON; JACOBS, 1958). A amostra altamente virulenta RH (SABIN², 1941, apud FARREL et al., 1952, p. 182) e amostras geneticamente similares exibem uma dose letal de 100% (DL₁₀₀) de um único parasita viável. As amostras não virulentas exibem uma DL₁₀₀ ≥10³ parasitas, sendo as infecções crônicas facilmente estabelecidas (HOWE; SUMMERS; SIBLEY, 1996) e as amostras de virulência intermediária estariam em transição entre os fenótipos não virulento e virulento do parasita (LITERÁK et al., 1998).

Pouco se sabe sobre a correlação entre a virulência de *T. gondii* em camundongos comparado com outras espécies. Segundo Dubey e Beattie (1988) a virulência em camundongos não apresenta correlação com doença em humanos ou animais domésticos. Vários estudos têm investigado a correlação entre genótipo e a manifestação da doença (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

O papel individual dos genes na patogenia da doença por *T. gondii* tem sido investigado. Pesquisas sobre os antígenos de superfície SAG3, antígenos de grânulo denso GRA2, carbamoyl fosfato sintetase II e proteínas do micronema MIC1 e MIC3 mostraram que estes exercem influência na virulência em camundongos (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005).

² SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.

Ultrapassar barreiras biológicas, como o epitélio intestinal, barreira entre corrente sanguínea e cérebro ou a placenta, é importante para o sucesso de uma infecção. A capacidade de migração do parasita pode contribuir nas diferenças específicas da amostra na disseminação do parasita e assim atingir áreas imuno privilegiadas como o sistema nervoso central (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005).

Barragan e Sibley (2002) demonstraram que subpopulação do parasita tipo I demonstram um aumento da migração *in vitro*, quando comparado com amostras tipos II ou III. Também, quando observado *in vivo*, os parasitas da amostra RH (tipo I) migram mais efetivamente para o baço de camundongos infectados experimentalmente do que os parasitas das amostras tipo II e III.

Análises genéticas comprovam a associação entre a capacidade migratória de *T. gondii* e virulência. Análises de *loci* de amostras resultantes de cruzamento de amostras tipo I e tipo III, identificaram o *locus* relacionado à virulência, localizado no cromossomo VIIa de *T. gondii*, a mesma região anteriormente relacionada à virulência aguda (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). A menor associação com virulência, por outro lado, foi relacionado ao marcador *ROP1* (cromossomo X). Estudos de recombinantes de várias progêneses têm mostrado que a virulência aguda é multigênica (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005).

No modelo de evolução clonal proposto por Maynard Smith et al. (1993), incluem-se organismos que geram progêneses idênticas ou quase idênticas e os genótipos se propagam independentemente pelas gerações, são de origem tipicamente ancestral, onde o sexo contribui pouco, ou nada e são estáveis por longos períodos. A diferença em nível de seqüência de DNA entre as linhagens arquetípos é menor do que 2% (GRIGG et al., 2001a). A investigação de estruturas populacionais em espécies de protozoários é realizada a partir de testes que identificam o desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*) entre *loci* gênicos, isto é, testes que identificam associação não aleatória entre genes de diferentes *loci* (TIBAYRENC, 1999). Alto desequilíbrio de ligação ao longo do genoma significa que este é inteiramente transmitido entre gerações como uma unidade, como na reprodução clonal (LEHMANN et al., 2004).

Existem várias explicações para a existência de estrutura populacional clonal em *T. gondii*. Primeiro, este parasita é capaz de transmitir entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos, sem passar pelo hospedeiro

definitivo, felino, e sofrer meiose e recombinação sexual. Segundo, muitos macrogametas do parasita permanecem infertilizados, mas são capazes de formar oocistos no intestino delgado dos felídeos através de partenogêneses. Terceiro, a recombinação ocorreria se felídeos fossem infectados simultaneamente com diferentes amostras de *T. gondii*, um evento bastante raro de acontecer na natureza, uma vez que eles teriam que se alimentar de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerissem duas presas, cada uma abrigando uma amostra diferente, porém, esse evento teria que acontecer em um intervalo de tempo bem curto. Também pode contribuir para essa estrutura populacional incomum, o fato do *T. gondii* ser haplóide, ou seja, um felídeo infectado com apenas um tipo de amostra, produz oocistos contendo progêneses geneticamente idênticas à amostra infectante original (AJZENBERG et al., 2004).

Para o *T. gondii* seria esperado a ocorrência de recombinação por trocas gênicas, resultantes de ciclos sexuais (padrão de evolução panmítica), uma vez que apresenta distribuição mundial, infecta várias espécies de hospedeiros e possui fase sexuada bem definida em seu ciclo de vida. Porém, esta espécie de parasita é caracterizada pela baixa diversidade genotípica e a evolução de suas linhagens vem sendo considerada eminentemente clonal (GRIGG; SUZUKI, 2003).

Algumas das primeiras evidências de clonalidade, como desequilíbrio de ligação, foram demonstradas pela análise das diferenças entre perfis eletroforéticos de isoenzimas. Estudos realizados com amostras de *T. gondii* mostraram que variações genéticas intraespecíficas podem ser demonstradas pela análise isoenzimática e em associação com outros parâmetros, pode ser utilizada para classificar amostras de *T. gondii* de origem humana e animal (DARDÉ, 1996).

Dardé, Bouteille e Pestre-Alexandre (1988) testaram quatro sistemas: aspartato aminotransferase (ASAT), glutatona redutase (GSR), glicose fosfato isomerase (GPI) e amilase (AMY) e de acordo com os perfis isoenzimáticos apresentados, agruparam sete isolados de *T. gondii* em três zimodemas. Também relacionaram algumas características biológicas das amostras em camundongos com os zimodemas. As três amostras do zimodema 1 eram altamente virulentas para camundongos, mas não produziam oocistos em felinos, enquanto as amostras pertencentes aos zimodemas 2 e 3 apresentaram baixa virulência para

camundongos, desenvolviam infecção crônica e produziam oocistos nos intestinos dos felinos.

Posteriormente, Dardé, Bouteille e Pestre-Alexandre (1992) realizaram análise isoenzimática em 35 isolados, acrescentando mais dois sistemas enzimáticos: propionil esterase (PE) e fosfatase alcalina (ACP). Este estudo mostrou perfis eletroforéticos variáveis, sendo então descritos cinco zimodemas, incluídos os três anteriormente descritos.

A mesma análise foi então realizada por Dardé (1996), em 61 isolados de *T. gondii* de origem humana e animal, na qual foram descritos mais cinco perfis isoenzimáticos. Dardé et al. (1998) também descreveram um novo perfil isoenzimático associado com um caso humano de toxoplasmose.

As diferentes associações identificaram, portanto, 11 zimodemas entre os isolados de *T. gondii*, sendo que quatro (Z1, Z2, Z3 e Z4) compreendiam 88% das amostras estudadas.

Posteriormente, outros estudos vieram contribuir para comprovar a existência de linhagens bem definidas, como marcadores baseados no polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP). RFLP é um método que detecta variações mínimas em um gene e ocorrendo uma única substituição de bases, pode criar ou extinguir um sítio, sendo, assim, capaz de ser digerido por uma determinada enzima de restrição (SINGH, 1997). RFLPs são, portanto, resultados da clivagem do DNA com enzimas de restrição. Endonucleases de restrição pertencem a uma classe de enzimas bacterianas que cortam ou digerem o DNA apenas quando ocorre uma seqüência específica de quatro ou mais bases. Quando se examina a mesma região de um cromossomo de dois organismos relacionados, mas não idênticos, observa-se que a seqüência de DNA é similar, mas não exatamente a mesma. A quantidade dessa diferença depende de quão relacionados são os organismos. Assim, sítios de restrição que estão presentes na seqüência de uma amostra, podem estar faltando na amostra semelhante. Ao se clivar duas moléculas de DNA relacionadas, mas diferentes, com a mesma enzima de restrição, podem ser obtidos segmentos de comprimentos diferentes, que quando separados em um gel, originam bandas de diferentes pesos moleculares (CLARK; RUSSEL, 1997).

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

Cristina et al. (1995) estudaram o polimorfismo genético de 14 amostras de *T. gondii* através da análise isoenzimática e de RFLP dos genes *TGR* (elementos repetitivos, não codificadores), utilizando duas sondas *TGR1E* e *TGR6*. Análise de agrupamento mostrou a divisão das amostras em dois grupos, sendo um correspondendo a cepas virulentas para camundongos (zimodemas 1 e 5) e outro cepas não virulentas (zimodemas 2, 3 e 4).

Utilizando dois *loci* com função desconhecida (*850* e *BS*) e um *locus* do gene de cópia única (*SAG1*), que codifica para a proteína P30, o principal antígeno de superfície de taquizoítos de *T. gondii*, Sibley e Boothroyd (1992) analisaram 28 amostras de *T. gondii* de diferentes hospedeiros e de vários países, incluindo duas amostras (origem humana e suína) provenientes do Brasil por RFLP. Os resultados obtidos sugeriram que amostras virulentas de *T. gondii* compreendiam uma única linhagem clonal, apesar dos diferentes hospedeiros e origem geográfica, quando analisadas no *locus SAG1*, enquanto as não virulentas possuíam um genótipo heterogêneo.

Parmley et al. (1994) realizaram análise por RFLP de 25 amostras de *T. gondii* utilizando três *loci* (*v22*, fragmento interno de 438pb do gene *P22* ou *SAG2*, que codifica para o segundo principal antígeno de superfície de taquizoítos, *SAG1* e *850*). Os autores sugeriram a possibilidade de haver três linhagens clonais entre as amostras de *T. gondii* analisadas, denominadas grupo A (composto por amostras virulentas para camundongos), grupo B e grupo C (compostos por amostras não virulentas).

Para determinar a estrutura populacional de *T. gondii* e avaliar a correlação entre genótipo do parasita e a toxoplasmose humana e animal, Howe e Sibley (1995) analisaram 106 amostras isoladas de várias espécies de hospedeiros, de regiões geográficas diversas, localizadas primariamente na América do Norte e Europa. Foram utilizados como marcadores genéticos (*SAG1*, *SAG2*, *ROP1*, que

codifica para uma proteína de roproia, 850, L328 e 62) e os resultados obtidos por análise de RFLP mostraram que o *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional altamente clonal, sendo que 95% dos isolados puderam ser definidos em um entre três genótipos altamente similares, os quais foram designadas como linhagens dos tipo I, II e III. Somente quatro amostras apresentaram genótipos muito variados, indicando que a recombinação entre gametas das três linhagens é extremamente rara nas populações. Correlacionando o genótipo do parasita e o hospedeiro, os autores verificaram que houve uma predominância de amostras do tipo II na toxoplasmose humana. Amostras do tipo I estavam mais associadas com a toxoplasmose humana congênita do que as infecções em animais, enquanto a frequência do tipo III foi significativamente mais alta em animais. Em 34 isolados de animais, foram encontrados 44% do tipo II e 47% do tipo III e somente 9% do tipo I. Amostras do tipo I são extremamente virulentas em camundongos e as amostras tipos II e III são consideradas não virulentas em camundongos e altamente cistogênicas.

Howe et al. (1997) determinaram os genótipos de 68 amostras isoladas de pacientes com toxoplasmose, no período de 1988 a 1996, em Paris. Utilizaram a *nested-PCR-RFLP* e a tipagem genética foi baseada em polimorfismo no *locus SAG2*. Amostras do tipo II foram encontradas em 81% das amostras, sendo 34 (76%) das 45 amostras provenientes de pacientes com AIDS, oito (80%) de 10 amostras de pacientes com toxoplasmose e todas as 13 (100%) relacionadas à infecção congênita. Amostras dos tipos I e III foram encontradas em 10% e 9% das amostras analisadas, respectivamente.

Mondragon et al. (1998) analisaram 43 amostras isoladas de suínos abatidos em Iowa (EUA), através da RFLP, nos *loci SAG1* e *SAG2*. Amostras do tipo II foram as mais prevalentes, constituindo 83,7% das amostras e o genótipo III foi encontrado em 16,3% dos isolados. A alta prevalência de linhagens tipo II nas amostras de suínos foi concordante com a alta prevalência encontrada em isolados de humanos com toxoplasmose (81% do tipo II) por Howe et al. (1997). Como os suínos são considerados fonte primária de infecção por *T. gondii* para humanos nos EUA, os autores sugeriram que a associação entre o genótipo II e a infecção humana era em parte devido à elevada prevalência destas amostras em suínos.

O genótipo de 13 amostras (placenta) de *T. gondii* associadas com abortamentos em ovinos naturalmente infectados e de dois roedores silvestres (*Apodemus sylvaticus*) foram analisadas através da PCR-RFLP do *locus* SAG2. Todas amostras foram classificadas como tipo II (OWEN; TREES, 1999).

Fuentes et al. (2001) analisaram 34 amostras clínicas primárias de pacientes com toxoplasmose na Espanha, através da PCR-RFLP nos *loci* SAG1 e SAG2. Genótipos I e II foram encontrados na mesma porcentagem dos casos (40%), isto é em dez amostras cada. Genótipo III (20%) foi encontrado em cinco amostras. Amostras do tipo II foram as mais prevalentes em pacientes imunocomprometidos (52%), enquanto as amostras do tipo I estavam presentes em 75% dos casos de infecção congênita.

O gene *B1* é utilizado rotineiramente para detecção de *T. gondii*, através da PCR, principalmente em amostras clínicas. Grigg e Boothroyd (2001) verificaram que este gene apresentava 10 sítios polimórficos, que poderia distinguir através da RFLP, as amostras virulentas tipo I, das amostras não virulentas tipos II e III e quando analisaram 24 amostras clínicas, incluindo amostras dos três tipos, observaram que poderia ser um bom método para identificação rápida do parasita e também bastante sensível para genotipagem rotineira de amostras clínicas.

Grigg et al. (2001a) seqüenciaram múltiplos *loci* das três linhagens arquétipos (tipo I, II e III) e observaram que a configuração genotípica de *T. gondii* seria formada por diferentes combinações de, basicamente, duas classes de alelos, designadas "A" e "E", em que o alelo A foi definido como a classe alélica compartilhada por pelo menos dois dos três tipos de genótipo. Para cada *locus*, essas duas classes alélicas estavam distribuídas aleatoriamente entre os parasitas das três linhagens. Para alguns *loci*, as linhagens I e II compartilhavam a mesma classe alélica, enquanto a linhagem III era diferente, e assim por diante. Com os dados encontrados, os autores sugeriram a hipótese de que a predominância de apenas três genótipos clonais derivariam de um ancestral comum, que por sua vez deve ter emergido da recombinação meiótica entre duas linhagens primárias.

Su et al. (2003) estimam que as três linhagens arquétipos teriam divergido a aproximadamente 10.000 anos, período que coincide com a domesticação dos animais de companhia e de produção.

Grigg et al. (2001b) identificaram os genótipos de 12 amostras de *T. gondii*, de humor vítreo de pacientes com toxoplasmose ocular grave ou atípica. Baseados na análise de polimorfismo pelo PCR-RFLP, utilizando dois novos *loci*, *SAG3* (p43) e *SAG4* (p18), além de outros *loci* polimórficos, *B1*, *SAG1* e *SAG2*. O genótipo I foi identificado em três isolados, o tipo II em três isolados e o tipo III em um isolado. Também foram identificados cinco novos genótipos recombinantes, que apresentavam alelos típicos de amostras do tipo I ou III nos *loci* examinados.

Aspinall et al. (2003) determinaram os genótipos em 32 casos associados a toxoplasmose aguda na Inglaterra e País de Gales. Utilizando a RFLP e o gene *SAG2* como marcador, os autores encontraram praticamente as mesmas frequências para amostras tipo I e II (31% e 34%, respectivamente), porém, não apresentavam nenhuma associação com formas clínicas da doença. Por outro lado, dez dos 32 pacientes (31%) mostraram evidência de infecção mista (tipos I e II), associada, principalmente com os casos congênitos. Os autores sugeriram que a causa provável de infecção mista seria a ingestão simultânea de carne de animais infectados com parasitas de genótipos diferentes. Este achado foi evidenciado na pesquisa realizada anteriormente por Aspinall et al. (2002).

Amostras de 71 produtos de carne suína, bovina ou ovina coletados em vários mercados do Reino Unido, foram submetidas à análise de restrição utilizando a PCR-RFLP no *SAG2* de *T. gondii*. Os pesquisadores encontraram tipo I em 21 amostras das 27 positivas para *T. gondii* (77,8%), enquanto seis (22,2%) tinham os tipos I e II (ASPINALL et al., 2002).

A fim de determinar a prevalência de cistos viáveis de *T. gondii* em carnes de várias origens (bovina, suína e ave) oferecidas para consumo humano e procedentes de 28 grandes áreas dos EUA, Dubey et al. (2005d) isolaram *T. gondii* em gatos e camundongos. Somente obtiveram isolamento de amostras de carne suína e não conseguiram nenhum isolado de origem bovina ou de ave. Os autores caracterizaram também genotipicamente os sete isolados de suínos, utilizando o RFLP no *locus SAG2* e cinco *loci* microssatélites hipervariáveis e encontraram duas amostras tipo I, duas amostras tipo II e três amostras tipo III.

Sousa et al. (2005) isolaram *T. gondii* pela primeira vez de 15 suínos (47,5%) em Portugal, sendo que dos camundongos inoculados, somente um camundongo morreu devido à toxoplasmose. Os isolados foram analisados por

PCR-RFLP no *SAG2* e os resultados confirmados pela análise multilocus com cinco microssatélites e encontraram 11 isolados tipo II e quatro tipo III. Foi observado que um isolado tinha alelo atípico para um *locus* microssatélite (*W35*), mas foi incluído como linhagem tipo II. Os autores concluem que fenotipicamente e genotipicamente os isolados de Portugal eram similares aos isolados de suínos dos E.U.A. e diferentes das amostras do Brasil.

Soroprevalência de 45,2% em gatos da Colombia foi encontrada por Dubey et al. (2006c) e quando realizaram a genotipagem, utilizando o polimorfismo dos *loci SAG1, SAG2, SAG3, BTUB* e *GRA6* de 15 isolados, a análise revelou que três isolados tinham alelos tipo I, um isolado tinha alelo tipo II e 11 isolados tinham a combinação dos alelos tipos I e III e foram divididos em três genótipos. Dubey et al. (2007c) encontraram alta porcentagem de gatos soropositivos na China (79,4%), dos quais foi isolado *T. gondii* de 17 amostras. Quando realizaram análise genotípica dos isolados pela RFLP através de 11 marcadores (*SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, novo SAG2* e *Apico*) encontraram dois genótipos distintos, diferentes dos arquétipos I, II e III (no prelo)³.

Tinti et al. (2003) compararam a organização genômica e o polimorfismo do *locus* multigênico *SAG5* de amostras de *T. gondii* pertencentes aos três genótipos arquétipos (tipos I, II e III). Os autores desenvolveram um novo método de PCR-RFLP baseado no gene *SAG5C*, capaz de discriminar genótipos I, II e III, utilizando uma única enzima de restrição.

Poucos estudos relacionados a genotipagem de *T. gondii* de amostras de animais silvestres foram realizados. Owen e Trees (1999) analisaram amostras de dois roedores silvestres capturados em uma fazenda do Reino Unido, utilizando a PCR-RFLP do *locus SAG2*, nas quais encontraram genótipo II.

Infecção por *T. gondii* associado com meningoencefalite é considerada como a maior causa de mortalidade em lontras (*Enhydra lutris nereis*) adultas jovens na Califórnia (KREUDER et al., 2003). Cole et al. (2000) estudaram amostras de 15 lontras da Califórnia, as quais faziam parte de monitoramento da mortalidade que

³ DUBEY, J. P.; ZHU, X. Q.; SUNDAR, N.; ZHANG, H.; KWOK, O. C.; SU, C. Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. **Veterinary Parasitology**, 2007c. (No prelo).

ocorria nesses animais. Foram determinados genótipos de 13 isolados através da PCR-RFLP, utilizando dois *loci* *SAG1* e *SAG2*. Todas as amostras genotipadas eram tipo II no *locus* *SAG2*, porém pela análise de restrição de fragmentos gerados no *locus* *SAG1* foi observado que seis isolados tinham alelos II e sete tinham alelos III, sugerindo que os isolados são geneticamente distintos.

Miller et al. (2004) analisaram 35 isolados de *T. gondii* de cérebro de lontras procedentes também da Califórnia, necropsiadas no período de 1998 a 2002. Baseado na análise multi-*locus* da PCR-RFLP dos genes *B1*, *SAG1*, *SAG2*, *SAG3* e *GRA6*, foram identificados dois genótipos distintos: tipo II e um novo genótipo denominado x, o qual possuía alelos distintos em três dos quatro *loci* polimórficos seqüenciados. A maioria das amostras (60%) foram identificadas como genótipo x e o restante como tipo II. Os autores sugerem que os isolados tipo x são novos, aparentemente recombinante, não arquétipos e são geneticamente distintos da linhagem tipo II. Também observaram que a maioria (47%) das lontras infectadas com o tipo x apresentavam a meningoencefalite como causa primária de morte enquanto as infectadas com o tipo II representavam 21%.

Conrad et al. (2005) realizaram estudos de prevalência em amostras de soro de lontras da Califórnia e encontraram até 52% de positividade. Das lontras soropositivas, foi isolado *T. gondii* de 15 amostras que foram genotipadas. Observaram que 72% dos isolados tinham alelos x nos *loci* *B1* e *SAG1*. Também realizaram a genotipagem de amostras de foca (*Phoca vitulina*) e leão marinho (*Zalophus californianus*) e encontraram também o genótipo x.

Foi identificado *T. gondii* em focas (*Monachus schauinslandi*) com lesões no cérebro e vísceras e quando analisaram as amostras pela RFLP no *SAG2*, encontraram genótipo III (HONNOLD et al., 2005).

Dubey et al. (2004a), nos EUA, analisaram através da PCR-RFLP do *locus* *SAG2*, isolados de 21 veados, sete racoons, cinco linceas, duas raposas, um coioote e sete ursos. Das amostras de racoons, duas foram tipo I, duas tipo II e três tipo III. Das sete amostras de urso, quatro foram classificadas como tipo III, duas como tipo II e uma amostra como recombinante dos tipos II e III e as restantes foram classificadas como tipo II.

Há também descrição do isolamento do agente de três furões, um ganso, dois gatos selvagens e cinco araras também nos EUA (DUBEY et al., 2004d). A análise molecular dessas amostras as classificou como *T.gondii* tipo III, com exceção das de gatos selvagens que se apresentaram como tipo II. Todas as amostras das aves e duas das três amostras de furão foram virulentas para camundongos.

Gallego, Saavedra-Matiz e Gómez-Marin (2006) caracterizaram DNA de *T. gondii* obtido diretamente de amostras de tecidos de dois pássaros (*Myarchus cephalotes*) e um gambá (*Didelphis marsupialis*) e encontraram através da PCR-RFLP no SAG2, genótipo I em todas as amostras.

Dubey et al. (2006a) isolaram *T. gondii* de tecidos (cérebro e coração) de apenas um rato (*Rattus norvegicus*) dentre os 238 animais bioensaiados. Realizaram análise genotípica do isolado utilizando cinco marcadores (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB* e *GRA6*), o qual apresentou genótipo III.

Galinhas caipiras infectadas por *T. gondii* têm sido consideradas bons indicadores da prevalência de oocistos do parasita no solo, uma vez que estas se alimentam diretamente no chão (DUBEY et al., 2002). Desta forma, vários autores têm pesquisado o parasita nessas aves através de isolamento e análise por RFLP no gene *SAG2*, em vários países, de vários continentes como: América do Sul (Brasil, Peru, Venezuela, Argentina, Colômbia), América Central e Caribe (Guatemala, México, Grenada), América do Norte (EUA), África e Oriente Médio (República Democrática do Congo, Kenia, Mali, Burkina Faso, Egito, Israel), Ásia (Srilanka, Índia) e Europa (Áustria, Portugal), a fim de avaliarem a estrutura populacional do *T. gondii* no mundo. Esses trabalhos tiveram início em 2002 com amostras de São Paulo, Brasil por Dubey et al. Subseqüentemente foi isolado *T. gondii* de amostras do Rio de Janeiro e Paraná, correspondendo às regiões sudeste e sul do Brasil. Nestas regiões os pesquisadores encontraram 66,3% dos isolados como tipo I (DUBEY et al., 2003d,e).

Dubey et al. (2006b) examinaram também galinhas provenientes de Rondônia, região norte do Brasil e oeste da Amazônia. Além da grande distância e da diversidade ambiental das outras regiões estudadas anteriormente, também foi encontrado maior porcentagem de isolados tipo I (58,3%) seguido de 41,7% de tipo

III e não sendo encontrado o tipo II, contrastando com os resultados obtidos em outros países onde isolados classificados como tipo I foram raros.

Até então, acreditava-se que *T. gondii* tinha uma estrutura populacional clonal, com três linhagens predominantes (tipos I, II e III) e os estudos foram baseados na genotipagem de mais de 100 isolados originados de uma variedade de hospedeiros animais e humanos, porém oriundos na sua maioria, da Europa e América do Norte (HOWE; SIBLEY, 1995). Os estudos em galinhas haviam sido realizados até 2005, com um único marcador (gene *SAG2*). Em estudos mais recentes de nove amostras de pacientes humanos da Guiana Francesa e 53 amostras de galinhas do Brasil sugeriram alta taxa de transmissão e *outcrossing* (situação na qual o cruzamento ocorre entre haplótipos não idênticos, resultando no rearranjo de material genético) (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004). Para aumentar o poder de distinguir linhagens arquetípicas das atípicas, Su, Zhang e Dubey (2006) desenvolveram nove marcadores para PCR-RFLP (*c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1*, novo *SAG2*, *BTUB*, *GRA6*, *SAG3* e *Apico*).

Amostras de galinhas caipiras provenientes da Costa Rica, Chile e Nicaragua foram então analisadas utilizando cinco marcadores (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB* e *GRA6*). Dos isolados da Costa Rica encontraram cinco isolados com alelos tipo I e um isolado com alelos tipo III em todos os *loci* analisados. As 26 amostras restantes tinham a combinação dos alelos tipo I e II ou alelos tipo I e III. A análise genotípica dos 32 isolados revelou a presença de cinco genótipos (DUBEY et al., 2006d). Dos 22 isolados do Chile analisados, 17 tinham alelos tipo II, quatro alelos III em todos os *loci* e uma amostra com a combinação de alelos tipos I e III (DUBEY et al., 2006c). Das 84 amostras de galinhas soropositivas da Nicaragua, foram obtidos 47 isolados e através da PCR-RFLP nos cinco *loci*, foram encontrados oito genótipos diferentes (DUBEY et al., 2006f).

Continuando as análises das amostras do Brasil, onde têm se apresentado fenotípica e genotípicamente diferentes dos isolados da Europa e América do Norte (DUBEY et al., 2002; 2003a,d, 2006b; LEHMANN et al., 2004) foram estudados isolados procedentes do Pará (norte) e Rio Grande do Sul (sul), distantes aproximadamente 3.500 km um do outro. Foram utilizados 11 marcadores (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1*, novo *SAG2* e *Apico*). Dos 15 isolados do Pará, obtiveram 11 genótipos e sete genótipos diferentes foram obtidos

dos 19 isolados do Rio Grande do Sul e não foram observadas infecções mistas. Os autores concluíram que o padrão genético do *T. gondii* nestas regiões é altamente diverso dentro de um número relativamente pequeno de isolados, o que não é usual e as populações de *T. gondii* são distintas entre diferentes locais no Brasil (DUBEY et al., 2007a).

O quadro 1 apresenta resultados da genotipagem de isolados de *T. gondii* em galinhas encontrados em diferentes países, através da PCR-RFLP no *SAG2*.

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

*utilizaram mais quatro marcadores

**utilizaram mais dez marcadores

Quadro 1 – Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas de diferentes países no período de 2002-2007, através da PCR-RFLP no locus *SAG2*

No Brasil, há alguns trabalhos que relatam a genotipagem do *T. gondii* em outras espécies animais e em humanos. O primeiro isolado brasileiro tipificado foi uma amostra isolada de suíno de Erechim (RS), amostra S-11, que foi classificada como tipo I (HOWE; SIBLEY, 1995).

Vallochi et al. (2005) analisaram 92 amostras de pacientes com lesões do globo ocular, retinocoroidite, provenientes de um banco de olhos de São Paulo (SP) e de duas amostras de olhos enucleados de pacientes com toxoplasmose ocular de Erechim (RS). Através da PCR-RFLP no *SAG2* detectaram DNA para *T. gondii* em 11 amostras, todas compatíveis com o genótipo I.

Num estudo realizado em 111 cães com sintomatologia nervosa do Estado de São Paulo, 34 apresentaram-se soropositivos para o *T.gondii*, sendo obtidos nove isolados para o agente e a análise através da PCR-RFLP no *SAG2*, mostrou que quatro isolados eram do tipo I e cinco do tipo III (DA SILVA et al., 2005).

Utilizando método molecular semelhante, foram analisados isolados de *T. gondii* de gatos e suínos do Estado de São Paulo. Dentre as 47 amostras de gatos provenientes de 15 municípios, foram observados 72,4% (34) do tipo I, 25,5% (12) do tipo III e uma infecção mista tipo I e tipo III (PENA et al., 2006). De suínos procedentes de cinco municípios do Estado de São Paulo, foram isoladas sete amostras, das quais também foi observada a ocorrência de linhagens tipo I em dois e tipo III em cinco isolados, quando analisados pela PCR-RFLP no *SAG2* (SANTOS et al., 2005).

Também foi isolado *T. gondii* de tecidos de 37 gatos de Santa Isabel do Ivaí (PR) e na análise de restrição dos fragmentos gerados pela PCR no *locus SAG2*, revelou-se que 15 isolados eram tipo I e 22 eram tipo III (DUBEY; MORALES; LEHMANN, 2004).

Da Silva et al. (2005) analisaram 70 amostras de linguiça de porco obtidos de 55 estabelecimentos comerciais da cidade de Botucatu (SP) através da *nPCR* no *locus SAG2* e detectaram o parasita em 19 (27,14%) das amostras. Pela digestão dos fragmentos gerados através das enzimas de restrição *HhaI* e *Sau3AI* observaram que 14 amostras (73,7%) eram tipo I e cinco (26,3%) eram tipo III.

Em caprinos provenientes do Ceará foi realizado estudo de genotipagem de apenas dois isolados (G1 e G2) e ao utilizar a PCR-RFLP no *SAG2* foi detectado

uma amostra do tipo I (G2) e outra tipo III (G1) (CAVALCANTE, 2004), mantendo o perfil que vem sendo observado em todas as regiões do Brasil já estudados. Porém, quando estes isolados foram submetidos à análise de restrição utilizando outros marcadores: genes *SAG3*, *GRA6*, *L363*, *cS10-A6* e *cB21-4*, o isolado G1 tinha haplótipo III para os genes *SAG3*, *GRA6* e *L363*, porém mostrou padrão de restrição idêntico à amostra RH (tipo I) para os genes *cS10-A6* e *cB21*. Para o isolado G2, foi observado haplótipo I também para o gene *SAG3*, mas haplótipo III foi observado para os outros genes. Concluíram que as duas amostras eram recombinantes dos tipos I e III. Também Cavalcante et al. (2006) observaram a virulência de *T. gondii* das amostras em camundongos, sendo a amostra G1 considerada altamente virulenta e a G2 de baixa virulência para camundongos (no prelo)⁴.

Estudos de variabilidade genética de 20 amostras de origem humana e animal, provenientes dos Estados de São Paulo e Minas Gerais foram realizados, utilizando para a análise a RAPD-PCR (amplificação aleatória de DNA polimórfico), SSR-PCR (reação em cadeia pela polimerase ancorada a repetições de seqüências simples) e PCR-RFLP. A PCR-RFLP foi realizada em oito *loci* independentes (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *B1*, *cb21-4*, *cS10-A6*, *GRA6* e *L363*). Todas as amostras pertenciam ao tipo I, de acordo com a genotipagem do *locus SAG2*, porém quando analisado o polimorfismo de restrição de outros *loci*, os autores verificaram que as amostras brasileiras apresentavam padrão recombinante ou atípico, com alelos típicos de amostras dos tipos I, II e III na maioria dos *loci* examinados. O *locus cB21-4* (marcador microssatélite) mostrou um maior polimorfismo alélico, com sete alelos entre as amostras analisadas. Também 14 amostras das 20 analisadas apresentaram um novo haplótipo no *locus L363*. Através de fenogramas representando os dados de RAPD-PCR, SSR-PCR e PCR-RFLP, foram separados dois grupos distintos (grupos 1 e 2). As amostras do grupo 1, eram altamente virulentas para camundongos e somente estas apresentaram haplótipo I no *locus L363*, sugerindo a possibilidade de ser um marcador de amostras altamente virulentas. Amostras do grupo 2 (amostras cistogênicas) apresentaram padrões mais heterogêneos, com algumas amostras virulentas, outras não virulentas e a maioria

⁴ CAVALCANTE, A. C. R.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; FUX, B.; BRANDÃO, G. P.; VITOR, R. W. A. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. **Small Ruminant Research**, 2006. (no prelo).

de virulência intermediária. Os pesquisadores sugerem que o impacto da recombinação genética na população brasileira de *T. gondii* parece ser maior que nas populações da Europa e América do Norte, onde a maioria dos estudos têm sido realizados (FERREIRA et al., 2004,2006).

Khan et al. (2006) analisaram amostras brasileiras, isoladas de humanos e animais. Para a análise genotípica, foi utilizado o multilocus *nested*-PCR com quatro marcadores independentes (*SAG2*, *SAG3*, *BTUB* e *GRA6*) e encontraram genótipos atípicos.

Su, Zhang e Dubey (2006) desenvolveram nove marcadores PCR-RFLP, sendo oito de cromossomos nucleares (*c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1*, *novo SAG2*, *BTUB*, *GRA6*, *SAG3*) e um do apicoplasto (*Apico*) e cada um capaz de distinguir os três alelos em uma reação com enzima de restrição. Analisaram 46 isolados de diferentes origens, entre os quais, 18 amostras que foram intensivamente estudadas anteriormente (GRIGG et al., 2001a; SU et al., 2003; AJZENBERG et al., 2004), e 28 de 58 amostras de gatos do Paraná (Brasil). Os dez isolados clonais tiveram padrões de tipificação uniformes. Os marcadores distinguiram isolados não arquétipos com alto poder discriminatório, sendo 36 isolados classificados como atípicos, dos quais obtiveram 19 genótipos diferentes. Das amostras do Brasil, todas apresentaram padrões atípicos e foram identificados 12 genótipos e cada genótipo tinha uma combinação de dois a quatro alelos, indicando suas diversidades. Os resultados encontrados nas amostras do Brasil foram bem diferentes dos apresentados por estudo realizado anteriormente por Dubey, Morales e Lehmann (2004), utilizando somente o *locus SAG2* como marcador, no qual encontraram somente os tipos I e III.

De Moura et al. (2006) isolaram *T. gondii* de um reservatório de água em Santa Isabel do Ivaí (PR), durante um surto de toxoplasmose humana, e identificaram o isolado como tipo I, através da RFLP do *locus SAG2*.

Recentemente, Dubey et al. (2007b) isolaram 19 amostras de *T. gondii* de 119 cães provenientes de São Paulo. Dos 15 isolados obtidos de camundongos, cinco amostras mostraram alta letalidade, matando todos os camundongos inoculados do grupo. Outros quatro isolados foram obtidos através de bioensaio em gatos. Para a análise genotípica, utilizaram 10 marcadores nucleares (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358*, *PK1* e um novo marcador *SAG2*) e um

marcador apicoplasto (*Apico*). Os resultados mostraram que pela RFLP no *locus* SAG2, 11 amostras eram tipo I e oito amostras eram tipo III. Porém, quando compararam os haplótipos nos outros *loci*, verificaram que somente uma amostra apresentava genótipo tipo III em todos os *loci* e as outras 18 amostras tinham a combinação de diferentes alelos e foram, assim, divididos em 11 genótipos. Portanto, os autores encontraram 12 genótipos no total, confirmando os achados prévios de que a população de *T. gondii* é altamente diversa no Brasil. Também não encontraram o tipo II em nenhuma das amostras analisadas (no prelo)⁵.

Muitos autores têm enfatizado que a caracterização molecular tem sido realizada diretamente de amostras clínicas, sem o prévio isolamento em camundongos (FUENTES et al., 2001; ASPINALL et al., 2003; VILLENA et al., 2004; GALLEGO; SAAVEDRA-MATIZ; GÓMEZ-MARIN, 2006). Observaram o aumento da frequência de isolados do tipo I ou infecções mistas, quando caracterizaram isolados diretamente de amostras clínicas, enquanto foi mais freqüente a ocorrência de isolados do tipo II, quando a caracterização foi feita após isolamento e crescimento por passagens em camundongos ou em cultura celular.

O reconhecimento das linhagens I, II e III é uma condição consagrada mundialmente pela comunidade científica, porém existem evidências de que linhagens divergentes das três linhagens arquetípos, assim como linhagens recombinantes devam existir (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

Trabalhos mais recentes de caracterização genotípica de *T. gondii* vem apresentando resultados de pesquisa com marcadores com maior grau de polimorfismo do que exibidos por genes codificadores de antígenos ou constitutivos ou por isoenzimas, como os minissatélites e microsatélites.

Costa et al. (1997) utilizaram marcadores microsatélites, através do dinucleotídeo (TG)_n, repetido no *intron* do gene *beta-tubulina*, para verificar a correlação entre fenótipo de virulência de *T. gondii* em camundongos e a toxoplasmose congênita em humanos. Os autores examinaram 34 amostras, sendo sete amostras virulentas e 27 amostras não virulentas para camundongos. As sete amostras virulentas apresentaram oito repetições (TG), enquanto as amostras não

⁵ 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, 2007b (no prelo).

virulentas apresentaram sete. Quando analisaram 37 amostras de líquido amniótico de fetos infectados por *T. gondii*, verificaram que todas apresentaram o marcador (TG)₇, demonstrando que a maioria dos casos de toxoplasmose congênita humana está associada a amostras não virulentas para camundongos.

Blackston et al. (2001) descreveram seis *loci* altamente variáveis em *T. gondii*, sendo cinco microssatélites e um minissatélite, denominados *TRD*. Estes *loci* revelaram variação intra-linhagem substancial com os quais facilitaríamos, segundo os autores, a classificação dos isolados de *T. gondii* além do nível de linhagem.

Ajzenberg et al. (2002a) analisaram 83 amostras de origem humana e animal, provenientes da Europa, América do Norte, e América do Sul, utilizando oito marcadores microssatélites e marcadores isoenzimáticos. Os microssatélites permitiram a diferenciação de 72 genótipos, demonstrando seu alto poder discriminatório, além de detectar também infecções mistas e isolados epidemiologicamente relacionados. Pela análise da diversidade genética, mostrou-se que a estrutura populacional de *T. gondii* consistiria de apenas duas linhagens clonais, grupo 1 e grupo 2. As amostras do grupo 1, além de apresentarem uma individualidade genética, tinham características em comum, como a alta virulência em camundongos e serem raramente isoladas na natureza. No grupo 2 a diversidade genética foi mais marcante e o comportamento dos isolados para camundongos foi mais heterogêneo, sendo que alguns eram virulentos.

Ajzenberg et al. (2002b) analisaram 86 amostras de pacientes com toxoplasmose congênita, sendo 82 amostras procedentes da França e quatro, de diferentes países da Europa. Utilizaram os mesmos marcadores anteriormente descritos (AJZENBERG et al., 2002a). O objetivo deste trabalho foi estudar a influência dos genótipos na severidade da toxoplasmose congênita. Três marcadores microssatélites menos polimórficos permitiram classificar os isolados nos tipos clássicos (tipo I, II e III) e detectar genótipos atípicos. Independentemente dos achados clínicos, isolados tipo II foram predominantes (84,88%), enquanto que os isolados do tipo I e atípicos não foram encontrados nos casos assintomáticos ou benígnos. Porém, foi encontrado tipo I em quatro amostras de placenta, cujas crianças não foram infectadas.

A teoria clonal da estrutura populacional de *T. gondii*, com três linhagens predominantes é baseada em amostras coletadas principalmente da Europa e

América do Norte, do ciclo doméstico ou casos clínicos de toxoplasmose humana ou ainda, de animais de produção (suínos, ovinos e frangos). Isto pode não refletir o verdadeiro estatus do *T. gondii* em áreas geográficas remotas ou em regiões tropicais, onde o sistema ecológico é bastante diferente. Vários estudos têm sido conduzidos em amostras de galinhas de vários países, porém, com exceção de alguns pesquisadores e dos mais recentes estudos, estes trabalhos têm sido realizados com apenas um marcador (SAG2).

Desta forma, Ajzenberg et al. (2004) analisaram 43 amostras de diferentes origens geográficas (países da Europa, EUA, Uruguai, Guiana Francesa, entre outros) e hospedeiros (humano, animais domésticos e silvestres) para avaliar a estrutura populacional e desenvolver um quadro mais real da diversidade genética entre as amostras de *T. gondii* através da filogenia e análise molecular (sequenciamento multi-locus de cinco marcadores microsatélites). Os estudos mostraram que, enquanto a maioria dos isolados eram classificados entre as três linhagens arquetípos, como era esperado, nove amostras da Guiana Francesa eram claramente atípicas, bem diferentes das linhagens clássicas, mas também diferentes das amostras atípicas da França e Uruguai. Cada amostra da Guiana Francesa possui um único genótipo multilocus e alguns dos alelos não são observados em amostras de outras áreas. Também, através da análise filogenética dos isolados, não apresentou uma estrutura típica de um organismo clonal. A hipótese adotada pelos autores seria que *T. gondii* teria uma estrutura populacional complexa, com uma mistura de propagação clonal e sexual, como uma função da condição ambiental. A comparação de dados sobre as amostras domésticas e silvestres favorece a teoria de que a recombinação sexual seria mais freqüente no ambiente silvestre, uma vez que a subpopulação de *T. gondii* em humanos e animais domésticos é amplamente clonal.

A elucidação da contribuição da variação genética entre parasitas no padrão de transmissão e manifestação da doença, tem sido o objetivo de muitos estudos. Focando no componente geográfico desta variação, os estudos têm mostrado que a maioria das amostras são locais-específicas, mas alguns são encontrados entre continentes e são estreitamente relacionados um com outro, indicando uma recente radiação de um genótipo pandêmico. Também as pesquisas têm mostrado que o *T. gondii* tem uma população que é encontrada em todos os

continentes, exceto na América do Sul. Por outro lado, outras populações de *T. gondii*, geralmente confinadas na América do Sul e ainda uma população encontrada no mundo todo. Os autores concluem que as populações da América do Sul e Eurásia tem evoluído separadamente até recentemente, quando navios da Eurásia, transportando ratos, camundongos e gatos ofereceram grandes oportunidades migratórias do *T. gondii* para a América do Sul (LEHMANN et al., 2006).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

Contatos foram feitos com os responsáveis pelo frigorífico de animais silvestres Panamby-Porã em Miracatu (SP) e abatedouro Pro-Fauna em Iguape (SP), que recebem capivaras criadas em diferentes localidades do Estado e que permitiram a amostragem desses animais. Em relação aos animais de vida livre, o IBAMA colaborou comunicando e permitindo a coleta de amostras dessas capivaras (Licença IBAMA nº 238/2005).

Esses animais foram provenientes de seis municípios do Estado de São Paulo, sendo que de duas localidades (São Paulo e Cordeirópolis) os animais eram de vida livre e o restante (Andradina, Cosmorama, Ribeirão Preto e Valparaíso), de criadouros devidamente licenciados pelo IBAMA. A maioria das amostras foi colhida no Frigorífico Panamby-Porã e no Abatedouro Pro-Fauna. Nos animais procedentes desses dois locais colheram-se amostras de sangue e tecidos (língua, coração e cérebro) na linha de abate. Também foram colhidas amostras de um animal atropelado na marginal do rio Tietê em São Paulo, de duas capivaras sacrificadas no Parque Ecológico do Tietê e de um animal morto no Parque Estadual Alberto Lofgren (Instituto Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo). Os animais foram encaminhados pelo IBAMA e necropsiados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

A distribuição dos animais entre os municípios, assim como as características sexo e faixa etária encontram-se na tabela 1.

Foram analisadas amostras de 68 capivaras, sendo 31 machos e 37 fêmeas, e em relação à idade, 42 eram adultas (idade superior a doze meses) e 26 eram jovens (de seis a onze meses). A idade foi estimada pelo porte corporal e características sexuais das capivaras.

Tabela 1 – Número de capivaras examinadas para a pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, segundo município de procedência no Estado de São Paulo, faixa etária e sexo - São Paulo - 2006

| Município | Origem | Número de capivaras examinadas | | | | | | TOTAL |
|----------------|------------|--------------------------------|----|-------|---------|----|-------|-------|
| | | Jovens | | | Adultos | | | |
| | | M | F | Total | M | F | Total | |
| Andradina | criadouro | - | - | - | 3 | 7 | 10 | 10 |
| Cordeirópolis | vida livre | - | - | - | 6 | 3 | 9 | 9 |
| Cosmorama | criadouro | 2 | 7 | 9 | 2 | 4 | 6 | 15 |
| Ribeirão Preto | criadouro | 3 | 3 | 6 | 3 | 4 | 7 | 13 |
| São Paulo | vida livre | 4 | 4 | 8 | 6 | - | 6 | 14 |
| Valparaíso | criadouro | - | - | - | 2 | 5 | 7 | 7 |
| TOTAL | | 9 | 14 | 23 | 22 | 23 | 45 | 68 |

M=macho; F=fêmea

4.2 LOCAL DO EXPERIMENTO

Todo o procedimento experimental foi realizado nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ-USP.

4.3 COLHEITA DE SANGUE E ÓRGÃOS

As capivaras foram sacrificadas através de eletrocussão e as amostras de sangue foram obtidas durante a sangria, no momento do abate dos animais e, quando possível, antes da realização deste. Quando a coleta ocorreu previamente ao abate, o sangue foi obtido através da venopunção da veia radial, com o animal

sedado com uma associação de cloridrato de quetamina (15 mg/kg) e xilasina (0,15mg/kg), ambas de uso veterinário, por via intramuscular.

Os órgãos foram colhidos na linha de abate e acondicionados individualmente em sacos plásticos, armazenados em caixa de isopor com gelo e levados diretamente ao laboratório. As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente até a chegada ao laboratório, onde foram centrifugadas a 2.000 *g* por 15 minutos para obtenção do soro. Os soros foram mantidos a -20°C.

4.4 EXAME SOROLÓGICO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS IgG ANTI-*T. GONDII*

Os soros das capivaras foram examinados para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* através do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) segundo Dubey e Desmonts (1987).

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

Em seguida, 135µL de antígeno-estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) eram diluídos em 2,5mL de solução salina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03m; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de Mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Essa mistura era então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço. Os soros diluídos eram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (v/v). A placa era selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada, durante a noite em estufa a 37°C.

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

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

Em todas as reações foram usados controles positivo e negativo, previamente conhecidos e controle do antígeno. O antígeno foi fornecido gentilmente pelo Dr. J. P. Dubey do Laboratório de Biologia, Epidemiologia e Sistemática de Parasitos, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviado por via aérea.

4.5 ISOLAMENTO DE *T. GONDII* EM CAMUNDONGOS

4.5.1 Digestão péptica de tecidos

Os tecidos (cérebro, coração e língua) foram mantidos refrigerados até o resultado do MAT, 12 horas depois de iniciado. O procedimento seguiu o protocolo descrito por Dubey (1998a).

Os tecidos dos animais soropositivos foram primeiramente cortados em pequenos pedaços, sendo removidos a gordura e o tecido conectivo. De cada órgão foi utilizado, aproximadamente 16,6g, até completar o total de 50g de tecidos.

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

Foram separadas cinco alíquotas de 1,5 mL do homogeneizado de tecidos de cada amostra, antes de acrescentar a pepsina ácida, em microtubos de 2,0 mL e armazenadas em freezer a -70°C até o processamento para obtenção do DNA (amostras de tecidos das capivaras ou amostras primárias).

Ao material homogeneizado adicionou-se o mesmo volume de uma solução de pepsina ácida, pH 1,1-1,2 (pepsina, 2,6g; NaCl, 5,0g; HCl, 7,0mL; água

destilada suficiente para 500mL de solução) recém preparada e aquecida em banho-maria a 37°C.

A mistura foi incubada em banho-maria sob agitação a 37°C por uma hora.

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

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

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

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

Imediatamente a amostra foi inoculada nos grupos de camundongos. Foram usados camundongos albinos Swiss, fêmeas, com idade ao redor de dois meses, provenientes do Biotério do VPS, FMVZ.

4.5.2 Bioensaio em camundongos

Cada grupo era constituído de cinco animais, identificados individualmente com brincos, com números sequenciais e alojados na mesma caixa; cada camundongo foi inoculado subcutaneamente com 1,0 -1,2 mL da amostra digerida e observados diariamente.

Três capivaras provenientes do criadouro de Ribeirão Preto, assim como o animal que foi encontrado atropelado na marginal do rio Tietê apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* baixos (25). Optou-se em inocular as amostras de

tecidos digeridas em 10 camundongos por grupo, ao invés de cinco para aumentar as chances de isolamento.

Os camundongos inoculados que vinham a óbito eram examinados para pesquisa de *T. gondii* nos tecidos. Os animais que sobreviviam até seis semanas pós-inoculação (P.I.) foram examinados sorologicamente para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, através do MAT, na diluição 1:25 (DUBEY, 1997), como descrito no item 4.4. Para isso, a colheita de sangue foi feita pelo plexo retro-orbital, usando pipeta de Pasteur, após a sedação dos camundongos com uma associação de quetamina 10% (100 mg/kg) e xilazina 2% (10mg/kg), injetada pela via intraperitoneal.

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

Todos os camundongos usados no bioensaio foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* nos tecidos, como descrito previamente por Dubey e Beattie (1988).

Impressões de pulmão e fragmentos de cérebro dos animais foram examinados sob microscopia de luz, entre lâmina e lamínula, para pesquisa de estágios de *T. gondii* (taquizoítos e/ou cistos). Cortava-se um fragmento do pulmão, removia-se o excesso de sangue da superfície do corte, a qual era então aplicada sobre uma lâmina contendo uma gota de salina, cobria-se com lamínula e examinava-se à procura de taquizoítas. Fragmentos de cérebro de 3-5mm² eram comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados para pesquisa de cistos. O cérebro dos animais soropositivos e dos soronegativos eram examinados da maneira descrita acima.

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

4.5.2.1 Amostras isoladas de camundongos (Isolados)

4.5.2.1.1 Congelamento

Para a análise genotípica dos isolados de *T. gondii*, o pulmão e/ou cérebro de cada camundongo positivo para *T. gondii* foi macerado separadamente utilizando gral e pistilo. Adicionava-se, após, 1,0mL de salina estéril. A suspensão obtida era então colocada em microtubo de 2,0mL e armazenada a -70°C até o processamento para obtenção do DNA.

4.5.2.1.2 Criopreservação

Objetivando a preservação dos isolados para futuros estudos, o restante do material foi criopreservado em DMSO 50% em meio RPMI-1640 e BSA 16% em RPMI-1640 (concentração final, DMSO 12,5% e BSA 4%) (DUBEY; BEATTIE, 1988).

4.6 ANÁLISE GENOTÍPICA

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

4.6.1 Extração e purificação do DNA

Para cada isolado, se havia ocorrido 100% de óbitos dos camundongos, era selecionado o pulmão de dois animais; se não havia ocorrido óbito, selecionava-

se o cérebro de dois camundongos e se dentro do grupo houvesse óbitos e sobreviventes, selecionava-se pulmão e cérebro dos que vieram a óbito e dos sobreviventes.

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

Eram processadas no máximo cinco amostras por vez e acrescentado um controle negativo contendo TE.

Alíquotas de 100µL foram separadas após descongelamento das amostras de camundongo e da cepa RH (SABIN¹, 1941, apud FARREL et al., 1952, p. 182). Das amostras primárias (capivaras) foram utilizadas alíquotas de 500µL por amostra. Para a amostra RH, usada como controle positivo, eram utilizados 100µL de uma suspensão obtida de lavado peritoneal de camundongos infectados experimentalmente.

As amostras foram lavadas três vezes com tampão TE, pH 8,0 (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM), centrifugando-se a 12.000 *g* por 5 minutos.

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

Ao sedimento foi adicionado fenol tamponado (v/v), o qual era então homogeneizado e centrifugado a 12.000 *g* por 5 minutos. Recuperava-se o máximo de sobrenadante (fase aquosa), evitando contaminação com fenol, aspirando a fase orgânica.

Adicionava-se fenol e clorofórmio (v/v) às amostras, as quais eram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 *g* por 5 minutos, recuperando-se o máximo de sobrenadante, tomando-se cuidado de não aspirar a interface orgânica.

Adicionava-se TE (v/v) e em seguida clorofórmio (v/v), homogeneiza-se e centrifugava-se por 5 minutos a 12.000 *g*. O máximo de sobrenadante era

¹ SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.

recuperado, sendo este o volume final de DNA obtido. Acrescentava-se então o acetato de sódio 3M (CH₃COONa), pH 8,0, cujo volume era calculado em 1/10 do volume da amostra. Em seguida era acrescentado duas vezes esse volume de etanol absoluto. Após homogeneização as amostras eram deixadas a -20°C, durante a noite.

As amostras eram centrifugadas a 12.000 g por 25 minutos a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante e adicionava-se 1.000µL de etanol a 70%. Centrifugava-se novamente e o sobrenadante descartado e os microtubos ficavam em posição invertida, até secarem completamente, em temperatura ambiente.

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

4.6.2 PCR-RFLP

Para a determinação dos genótipos de *T. gondii* das amostras analisadas, seguiu-se protocolo descrito por Howe et al. (1997), utilizando como marcador genético, segmentos do *locus SAG2*, localizado no cromossomo VIII.

Dois fragmentos do *locus SAG2* foram amplificados pela PCR e submetidos à clivagem enzimática, utilizando as endonucleases MBOI (isoesquisômero *Sau3AI*) e *HhaI*. Os fragmentos produzidos correspondem a 241 e 221 pares de bases, sendo o primeiro oriundo da região 5' e o segundo da região 3' do *locus SAG2*. A enzima MBOI é utilizada para clivar o fragmento maior e a endonuclease *HhaI* para clivar o fragmento menor. A endonuclease MBOI cliva fragmentos oriundos de alelos característicos do tipo III, podendo, assim, diferenciar de outros dois tipos de genótipos. Por outro lado, a enzima *HhaI* somente cliva fragmentos oriundos de alelos do tipo II enquanto o tipo I não é clivado por nenhuma dessas enzimas mencionadas. No quadro 2 está ilustrada a tipificação das amostras isoladas, conforme a ação das respectivas enzimas e na figura 1 pode ser visualizado o esquema de determinação dos genótipos, conforme proposto por Howe et al. (1997).

| Genótipo | Enzimas de restrição | |
|----------|--------------------------|--------------------------|
| | <i>Mbol</i> | <i>HhaI</i> |
| Tipo I | Fragmento 5' NÃO clivado | Fragmento 3' NÃO clivado |
| Tipo II | Fragmento 5' NÃO clivado | CLIVAGEM de fragmento 3' |
| Tipo III | CLIVAGEM de fragmento 5' | Fragmento 3' NÃO clivado |

Quadro 2 – Comportamento dos produtos da PCR oriundos dos genótipos I, II, III de *Toxoplasma gondii* frente à ação das enzimas de restrição *MBOI* e *HhaI*

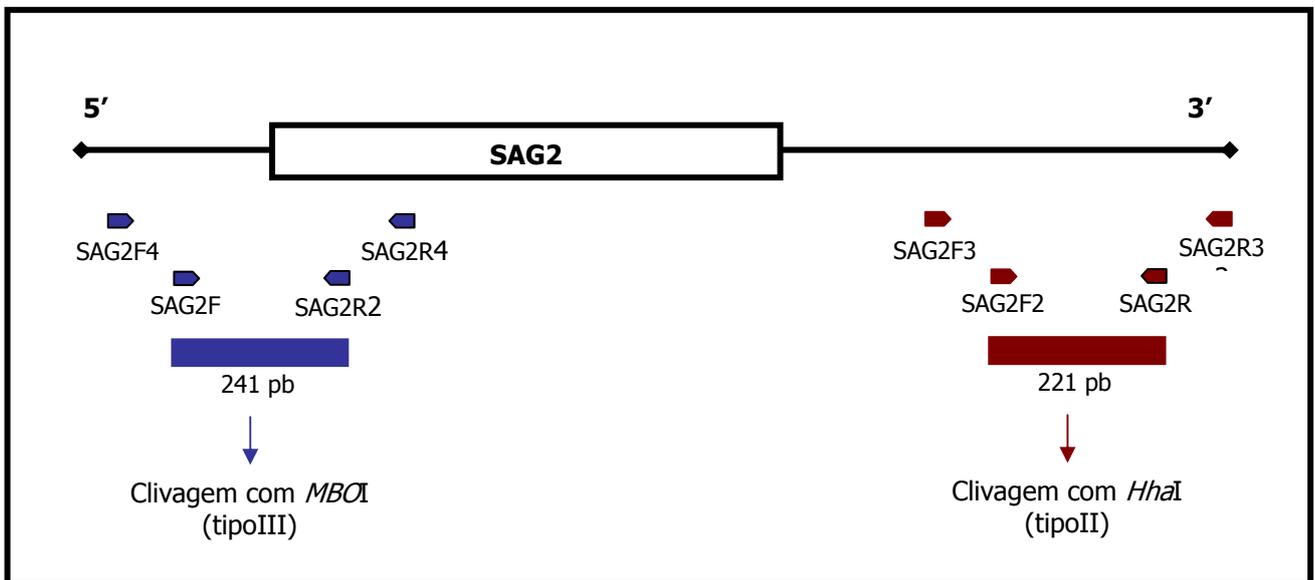


Figura 1 - Representação esquemática do sistema proposto por Howe et al. (1997) para genotipagem de *T. gondii*, baseado na *nested-PCR-RFLP* de fragmentos do *locus SAG2*. Neste procedimento, dois produtos de *nested-PCR* são produzidos e submetidos à restrição enzimática

4.6.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

O quadro 3 relaciona os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) usados na PCR para amplificação do gene *SAG2* de *T. gondii*.

| PCR | Nome do "primer" | Seqüência de bases |
|----------------------|------------------|------------------------------|
| 5' PCR primária | <i>SAG2</i> F4* | 5' GCTACCTCGAACAGGAACAC 3' |
| | <i>SAG2</i> R4* | 5' GCATCAACAGTCTTCGTTGC 3' |
| 3' PCR primária | <i>SAG2</i> F3* | 5' TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC 3' |
| | <i>SAG2</i> R3* | 5' TCAAAGCGTGCAATTATCGC 3' |
| 5' <i>nested</i> PCR | <i>SAG2</i> F** | 5' GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 3' |
| | <i>SAG2</i> R2** | 5' GCAAGAGCGAACTTGAACAC 3' |
| 3' <i>nested</i> PCR | <i>SAG2</i> F2** | 5' ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3' |
| | <i>SAG2</i> R** | 5' AACGTTTCACGAAGGCACAC 3' |

(Fonte: Howe et al., 1997)

* "primers" externos 1 e 2

** "primers" internos 1 e 2

Quadro 3 – Nomes e seqüências dos “primers” usados na PCR para amplificação de fragmentos do gene *SAG2* de *Toxoplasma gondii*

4.6.2.2 Delineamento

A amostra RH (SABIN², 1941 apud FARREL et al., 1952, p. 182), mantida em camundongos no VPS, foi utilizada como controle positivo do genótipo I; o controle positivo do genótipo II era um isolado de veado e o controle positivo do genótipo III um isolado de gambá. Os DNAs dos isolados tipo II e tipo III foram fornecidos gentilmente pelo Prof. Dr. J. P. Dubey (USDA, Beltsville, Maryland) para servirem como controles.

Para as amostras de camundongos e para o controle positivo do genótipo tipo I não foi necessária a realização da *n*PCR, pois se obteve uma boa detecção

² SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, p. 801-807, 1941.

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

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

Para as amostras primárias e para os controles positivos dos genótipos II e III foi realizada a PCR, seguida da *nested*PCR.

4.6.2.3 PCR

Para uma reação em 50µL, foi utilizada a seguinte mistura de reagentes:

- 25,2 µL de água ultra pura autoclavada
- 5,0 µL de tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0)
- 8,0 µL da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 2,5 µL do “primer” 1 (10pmol/ µL)
- 2,5 µL do “primer” 2 (10pmol/ µL)
- 1,5 µL de MgCl₂ (50mM)
- 0,3 µL de *taq* DNA polimerase
- 5,0 µL da amostra de DNA extraído

Para as amostras de pulmão e RH (lavado peritoneal de camundongo inoculado) o DNA foi utilizado na diluição de 1:100 e para as amostras de cérebro e para os controles tipo I e Tipo III, o DNA foi utilizado na diluição 1:10.

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

4.6.2.4 *Nested*- PCR

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

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

Para cada corrida de *n*PCR eram incluídas no máximo cinco amostras e três controles negativos (água ultrapura autoclavada).

4.6.2.5 Ciclo empregado

Desnaturação inicial: 94°C por 30 segundos

- Desnaturação: 94°C por 20 segundos
- Hibridização: 60°C por 25 segundos
- Extensão: 72°C por 25 segundos

A partir da desnaturação, o ciclo se repete mais 39 vezes.

Extensão final: 72°C por 5 minutos

4.6.2.6 Análise do produto amplificado

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

Após a corrida eletroforética, o gel era corado com solução de brometo de etídeo (solução a 0,5µg/mL) por 30 minutos, lavado em água destilada por 30 minutos e observado sob transiluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas. Documentação fotográfica e análise de imagem – Alphamager ® Imaging System (Alpha Innotech).

4.6.2.7 RFLP

Protocolo da mistura para 20 µL de reação:

Região 5´:

- 1.0 µL (10 unidades) de *Mbol* (isoesquisômero *Sau3AI*) (Fermentas Life Sciences)
- 2,0 µL de tampão R⁺ 10x (Fermentas Life Sciences)
- 7,0 µL de água ultrapura autoclavada
- 10,0 µL de DNA

Região 3´:

- 1.0 µL (20 unidades) de *HhaI* (BioLabs)
- 2,0 µL de tampão Y⁺ tango 10x (BioLabs)
- 7,0 µL de água ultrapura autoclavada
- 10,0 µL de DNA

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

Após a incubação as amostras eram submetidas novamente à análise em gel de agarose a 2,0%, como descrito anteriormente. Em cada corrida eletroforética colocava-se um controle positivo dos genótipos I, II e III.

4.6.3 Análise por seqüenciamento

A análise por seqüenciamento foi realizada quando as amostras exibiram um padrão de digestão parcial na RFLP.

4.6.3.1 Purificação

Para a purificação do DNA foi utilizado o “kit” GFX™ (Amersham Biosciences), obedecendo as instruções do fabricante, porém aumentado os tempos de centrifugações de três a quatro minutos.

Volumes máximos de DNA amplificados na região 5` eram corridos em gel de agarose a 2% e a banda com fragmento de tamanho esperado era recortada com lâmina de bisturi descartável, na quantidade máxima de 300 mg de gel.

Era obtido um volume final de 35 µL de DNA purificado.

4.6.3.2 Quantificação

A quantificação foi feita utilizando-se 5 µL do DNA purificado. O material foi examinado conforme descrito no ítem 4.2.4, usando como padrão o *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder* (MBI Fermentas).

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

4.6.3.3 Reação de seqüenciamento

Na reação de seqüenciamento foi utilizado o “kit” ABI PRISM™ BigDye Terminator™ (Applied Biosystems).

Para um volume final de 10 µL foram misturados os seguintes reagentes:

- 5,0 ng de DNA purificado
- 1,0 µL de BigDye
- 2,0 µL de Tampão Save Money 5 x (Tris-HCl 400 mM; MgCl₂ 10 mM, pH 9,0)
- 1,0 µL do “primer” (senso ou anti-senso)
- Água q.s.p (volume ajustado, conforme a quantidade de DNA)

As amostras eram 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 34 vezes a partir da desnaturação. As amostras são mantidas a 4°C até a próxima etapa

4.6.3.4 Precipitação

Após a reação de seqüenciamento, era adicionado 40 µL de isopropanol a 65% (v/v em água) a cada amostra. Após homogeneização, as amostras eram mantidas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos e em seguida centrifugadas a 14.000 *g* por 25 minutos também em temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

O isopropanol era descartado e em seguida, acrescentado etanol 60% (v/v em água) e centrifugado a 14.000 *g* por 10 minutos em temperatura ambiente.

O etanol era removido com auxílio de pipeta e as amostras eram colocadas no termobloco a 80°C por dois minutos para secar o “pellet”.

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

4.6.3.5 Preparo das amostras para seqüenciamento

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

O seqüenciamento foi realizado seguindo o protocolo contido no manual técnico do equipamento ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). As seqüências eram posteriormente visualizadas usando o programa CodonCode Aligner v. 1.6.0 beta.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As associações entre faixas etárias ou sexo e presença de anticorpos anti-*T. gondii* foram analisadas pelo teste Qui-quadrado.

Para comparar as distribuições dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii*, segundo o tipo de criação (criadouro ou vida livre) utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Associações entre títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das capivaras, tipo de criação e isolamento do parasita nos bioensaios foram analisadas pelo teste de proporções.

Para comparar os títulos de anticorpos com o tipo de isolado (I e III) foi utilizado o teste t, para duas amostras independentes [pressuposições de distribuição normal e variâncias iguais ($P=0,63$) foram atendidas].

Para comparar a proporção de capivaras positivas segundo o tipo de criação com as linhagens obtidas (tipo I e III) foi utilizado o teste exato de Fischer.

Para comparar a proporção de grupos com camundongos sobreviventes e grupos os quais morreram camundongos com relação aos genótipos dos isolados foi utilizado o teste de proporções. Posteriormente, o número absoluto de óbitos foi comparado através do mesmo teste.

Para analisar o comportamento da mortalidade devida a cada um dos isolados, comparando-os ao final do período de observação, foi utilizado o método da tábua de vida, considerando-se como evento de sucesso a mortalidade ocorrida durante o período de observação e como dado censurado, os animais que permaneceram vivos durante todo o período de observação. Comparou-se a tábua de vida dos diferentes isolados através do teste Wilcoxon (Gehan) para verificar se havia diferença das mortalidades e o isolado avaliado.

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

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

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 SOROLOGIA DAS CAPIVARAS

Dos 68 animais examinados, 51 (75%) foram positivos para anticorpos anti-*T. gondii*. A distribuição das capivaras examinadas e soropositivas, segundo sexo, faixa etária e localidade de procedência encontra-se na tabela 2.

Em relação ao sexo, 83,3% (25/30) dos machos foram positivos enquanto 68,4% (26/38) das fêmeas se apresentaram positivas. Não foi observada diferença estatística significativa entre as proporções de animais positivos machos e fêmeas ($p=0,33$).

Entre os animais jovens, 75% (18/24) foram soropositivos, sendo que os municípios com maior porcentagem de positividade foram São Paulo (87,5%) e Cosmorama (100%). Das amostras analisadas, 64,7% (44/68) foram de capivaras adultas sendo que 75% destas (33/44) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*, mesma porcentagem encontrada para as jovens. Não houve diferença estatística significativa entre as proporções de animais positivos jovens e adultos ($p=0,88$).

Tabela 2 – Frequência de capivaras examinadas e soropositivas para *Toxoplasma gondii* através do teste de aglutinação modificado (≥ 25), segundo o sexo, faixa etária e o município de procedência no Estado de São Paulo - São Paulo – 2006

| Município | Nº de capivaras examinadas (Nº de capivaras positivas) | | | | Total | Positivas (%) |
|----------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| | Adultos | Jovens | Machos | Fêmeas | | |
| Andradina | 10 (8) | 0 | 3 (2) | 7 (6) | 10 (8) | 80,0 |
| Cordeirópolis | 9 (9) | 0 | 6 (6) | 3 (3) | 9 (9) | 100,0 |
| Cosmorama | 5 (5) | 10 (10) | 3 (3) | 12 (12) | 15 (15) | 100,0 |
| Ribeirão Preto | 7 (2) | 6 (1) | 6 (2) | 7 (1) | 13 (3) | 23,1 |
| São Paulo | 6 (4) | 8 (7) | 10 (8) | 4 (3) | 14 (11) | 78,6 |
| Valparaíso | 7 (5) | 0 | 2 (2) | 5 (3) | 7 (5) | 71,4 |
| Total | 44 (33) | 24 (18) | 30 (25) | 38 (26) | 68 (51) | 75,0 |

O número de capivaras soropositivas relacionadas ao tipo de criação pode ser observado no gráfico 1. Das 45 capivaras provenientes de criadouros, 31 (68,9%) apresentaram títulos iguais ou superiores a 25 e das 23 de vida livre, 20 (87%) foram positivas. Não houve diferença entre a proporção de animais positivos de vida livre e criadouros ($p = 0,14$).

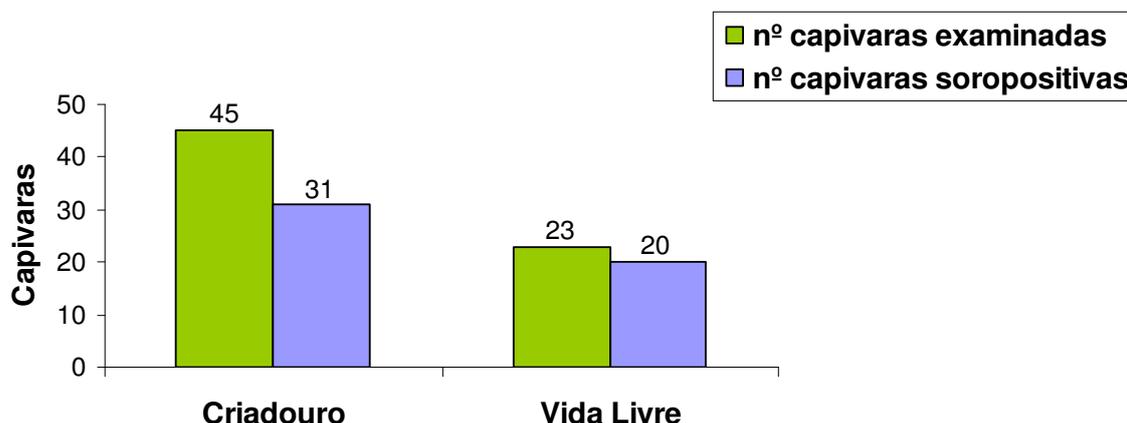


Gráfico 1 – Número de capivaras examinadas e soropositivas para anticorpos anti-*T. gondii*, segundo o tipo de criação - São Paulo - 2006

O perfil dos títulos de anticorpos, segundo os tipos de criação, foi semelhante ($p = 0,48$). Dos animais procedentes de criadouros, 50% apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* entre 25 e 200 (mediana=50) e nos de vida livre, 50% das amostras apresentaram títulos entre 50 e 200 (mediana=100) conforme ilustrado no gráfico 2.

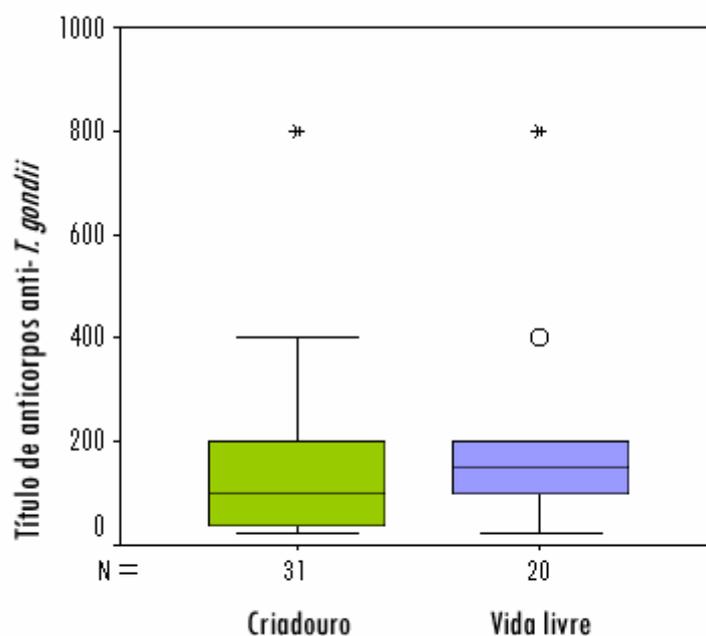


Gráfico 2 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, segundo o tipo de criação (criadouro e vida livre) - São Paulo - 2006

Os títulos de anticorpos variaram de 25 a 800, sendo que em 82,3% (42 animais), os títulos variaram de 25 a 200 e em 17,6% (nove animais) a variação dos títulos foi de 400 a 800 (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* obtidos pelo teste de aglutinação modificado, em capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo - São Paulo - 2006

| Título | Número de capivaras soropositivas | % |
|--------------|-----------------------------------|------------|
| 25 | 12 | 23,5 |
| 50 | 6 | 11,8 |
| 100 | 14 | 27,5 |
| 200 | 10 | 19,6 |
| 400 | 5 | 9,8 |
| 800 | 4 | 7,8 |
| Total | 51 | 100 |

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

Foram realizados 40 bioensaios em camundongos, dentre as 51 capivaras soropositivas, sendo nove amostras de tecidos de capivaras jovens e 31 de animais adultos. Com relação ao sexo, as capivaras ensaiadas corresponderam a 19 machos e 21 fêmeas e com relação à procedência, 17 dessas capivaras eram de vida livre e 23 de criadouros.

Das 11 capivaras soropositivas procedentes de São Paulo, três morreram antes do abate e não foram introduzidas no bioensaio. Dos 15 animais soropositivos de Cosmorama, foram selecionados os sete que tiveram títulos ≥ 200 , tendo em vista que estávamos obtendo alta porcentagem de isolamentos, mesmo das capivaras que apresentavam títulos baixos, não havendo, portanto, necessidade de realizar bioensaio de todas as capivaras, uma vez que eram procedentes do mesmo criadouro.

Foram obtidos 36 (90%) isolados de *T. gondii*. Das capivaras adultas (n=31), isolou-se de 29 (93,5%) e das nove jovens, isolados foram obtidos de sete (77,8%) animais.

Considerando o tipo de criação, a porcentagem de isolamentos de *T. gondii* entre as capivaras de vida livre foi de 94,1%, com 16 isolados dos 17 bioensaios realizados. Dentre os animais de criadouros (n=23), 20 isolados (86,9%) foram obtidos. O número de isolamentos, entre as capivaras provenientes de criadouro e as de vida livre está ilustrada no gráfico 3.

Não houve diferença entre a proporção de isolados e idade das capivaras (p=0,21), tipo de criação (p=0,62) e sexo (p=0,58).

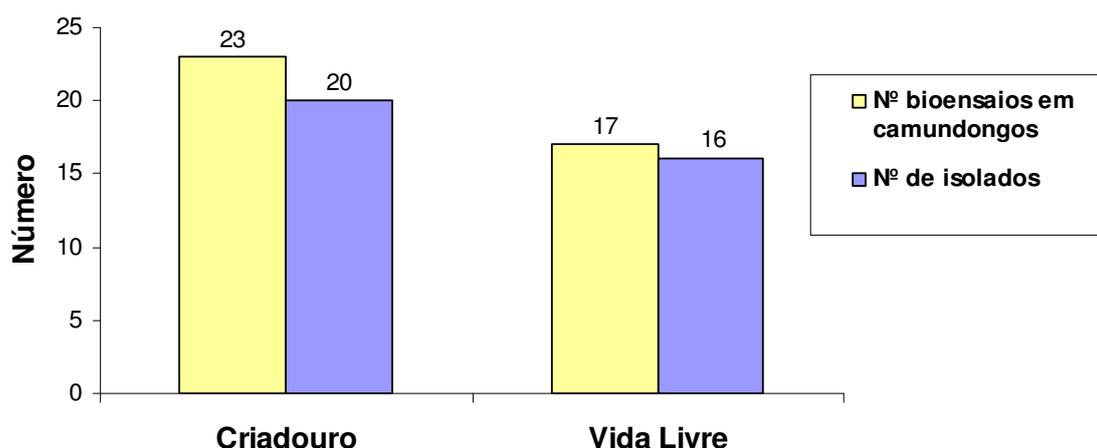


Gráfico 3 – Número de bioensaios realizados e isolamentos de *T. gondii* de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, através de bioensaio em camundongos, segundo o tipo de criação das capivaras - São Paulo - 2006

A distribuição do número de bioensaios e número de isolados entre os municípios pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4 - Número de bioensaios em camundongos de tecidos de capivaras, e número de isolados de *T. gondii* obtidos, segundo o município de procedência das capivaras do Estado de São Paulo - São Paulo - 2006

| Município | Número de bioensaios em camundongos | Número de isolados | Isolamentos % |
|----------------|-------------------------------------|--------------------|---------------|
| Andradina | 8 | 7 | 87,5 |
| Cordeirópolis | 9 | 9 | 100,0 |
| Cosmorama | 7 | 6 | 85,7 |
| Ribeirão Preto | 3 | 2 | 66,7 |
| São Paulo | 8 | 7 | 87,5 |
| Valparaíso | 5 | 5 | 100,0 |
| Total | 40 | 36 | 90,0 |

Os números absolutos e percentuais de isolados obtidos entre os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das capivaras estão ilustradas na tabela 5. Não houve associação da freqüência de isolamentos com os títulos de anticorpos ($p=0,99$).

Tabela 5 - Número de isolados de *T. gondii* obtidos de capivaras naturalmente infectadas, através do bioensaio em camundongos, segundo os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das capivaras - São Paulo - 2006

| Título | Número de bioensaios | Número de isolados | % |
|---------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|
| 25 | 11 | 9 | 81,8 |
| 50 | 4 | 4 | 100,0 |
| 100 | 7 | 6 | 85,7 |
| 200 | 9 | 9 | 100,0 |
| 400 | 5 | 5 | 100,0 |
| 800 | 4 | 3 | 75,0 |
| Total | 40 | 36 | 90,0 |

Dos 215 camundongos inoculados nos bioensaios, 156 (72,6%) foram infectados por *T. gondii*. Óbitos dos camundongos por toxoplasmose ocorreram desde o 8º até o 31º dia pós-infecção (P.I.), com média por grupo variando de 12 a 27 dias e média geral de 18 dias P.I. Cistos nos cérebros dos camundongos foram observados em todos os 36 grupos de isolados e dentre os camundongos que foram a óbito, cistos foram detectados já no 11º dia P.I.

Nos camundongos que sobreviveram e encontravam-se negativos sorologicamente (título <25), não foram observados cistos nos cérebros. Entretanto, em todos os camundongos soropositivos (título ≥ 25) sobreviventes, após a eutanásia, cistos estavam presentes nos cérebros.

Em 28 grupos que apresentaram camundongos infectados por *T. gondii* houve pelo menos um óbito e desses camundongos mortos, foram observados cistos nos cérebros em 26 grupos. Dezenove grupos tiveram camundongos sobreviventes e foram observados cistos em todos.

A porcentagem de óbitos dentre os camundongos infectados foi de 25 a 90% para 11 grupos, enquanto 17 grupos apresentaram 100% de óbitos e em oito não ocorreram óbitos (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de grupos de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii* após inoculação com tecidos de capivaras soropositivas, segundo a porcentagem de óbitos por toxoplasmose - São Paulo - 2006

| Porcentagem* de óbitos | 0 | 25 | 33 | 40 | 60 | 75 | 88 | 90 | 100 | Total |
|-------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|-----|-------|
| Número de grupos infectados** | 8 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | 17 | 36 |

* N° de óbitos/N° de infectados x 100

** pelo menos 1 dos camundongos inoculados do grupo apresentaram-se infectados

Os dados detalhados dos 36 isolados e os municípios de procedência das capivaras estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* de capivaras, através de bioensaio em camundongos, segundo o município de procedência no Estado de São Paulo e títulos de anticorpos anti- *T. gondii* das capivaras - São Paulo - 2006

(Continua)

| Município | N° da capivara | Título de anticorpos | Bioensaio em camundongos* | | | |
|---------------|----------------|----------------------|-----------------------------------|-------------|-----------------------|--------------|
| | | | N° de óbitos/ N° de infectados | % de óbitos | Sobrevida (dias P.I.) | Média (dias) |
| Andradina | 44 | 200 | 4/4 | 100 | 14-17-19-19 | 17,3 |
| | 45 | 50 | 0/3 | 0 | sobreviveram | 0 |
| | 46 | 800 | 5/5 | 100 | 9-10-18-18-19 | 14,8 |
| | 47 | 100 | 0/3 | 0 | sobreviveram | 0 |
| | 49 | 25 | 0/3 | 0 | sobreviveram | 0 |
| | 51 | 200 | 0/4 | 0 | sobreviveram | 0 |
| | 53 | 50 | 0/1 | 0 | sobreviveu | 0 |
| Cordeirópolis | 11 | 200 | 5/5 | 100 | 17-18-21-23-25 | 20,8 |
| | 12 | 400 | 5/5 | 100 | 14-14-14-14-16 | 14,4 |
| | 13 | 100 | 5/5 | 100 | 21-23-24-24-27 | 23,8 |
| | 14 | 200 | 1/3 | 33 | 26 | 26,0 |
| | 15 | 400 | 4/4 | 100 | 15-16-17-21 | 17,3 |

Tabela 7 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* de capivaras, através de bioensaio em camundongos, segundo o município de procedência no Estado de São Paulo e títulos de anticorpos anti- *T. gondii* das capivaras - São Paulo – 2006

(Conclusão)

| Município | Nº da capivara | Título de anticorpos | Bioensaio em camundongos | | | |
|----------------|----------------|----------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------|--------------|
| | | | Nº de óbitos/ Nº de infectados | % de óbitos | Sobrevida (dias P.I.) | Média (dias) |
| Ribeirão Preto | 20** | 25 | 9/10 | 90 | 11-11-11-11-11 12-12-12-14 | 11,7 |
| | 32** | 25 | 7/8 | 86 | 13-15-16-18-20 25-26 | 19,0 |
| São Paulo | 1 | 100 | 5/5 | 100 | 14-14-14-16-16 | 14,8 |
| | 5 | 800 | 5/5 | 100 | 14-15-16-16-16 | 15,4 |
| | 6 | 200 | 5/5 | 100 | 13-13-15-15-21 | 15,4 |
| | 7 | 100 | 3/4 | 75 | 11-12-12 | 11,7 |
| | 33** | 25 | 1/1 | 100 | 27 | 27,0 |
| | 42 | 25 | 5/5 | 100 | 8-12-16-17-18 | 14,2 |
| | 43 | 50 | 4/4 | 100 | 16-20-22-22 | 20,0 |
| Valparaíso | 36 | 100 | 5/5 | 100 | 12-13-17-18-20 | 16,0 |
| | 37 | 50 | 3/4 | 75 | 20-22-26 | 22,7 |
| | 38 | 25 | 5/5 | 100 | 14-14-15-16-19 | 15,6 |
| | 39 | 25 | 5/5 | 100 | 16-16-16-18-18 | 16,8 |
| | 40 | 50 | 1/5 | 20 | 18 | 18,0 |

Nº= Número

*Cinco camundongos por grupo

**Dez camundongos por grupo

P.I.= pós inoculação

5.3 ANÁLISE GENOTÍPICA

5.3.1 PCR-RFLP – Amostras positivas (isolados)

Foram identificadas amostras tipos I e III e uma mostrou padrão de genótipo misto (tipo I e tipo III) na análise de restrição em segmentos do *locus* SAG2. Em um dos grupos examinados (capivara nº 7), quatro camundongos foram infectados e quando se analisaram as amostras de dois camundongos, uma delas mostrou padrão tipo I e a outra, padrão tipo III. A amostra de um camundongo do grupo 6 (capivara nº 6) apresentou padrão de genótipo misto ou digestão parcial e o outro camundongo apresentou tipo III.

Uma nova extração de DNA foi realizada das amostras dos outros camundongos desses dois grupos. Na análise de restrição diminuiu-se a quantidade de DNA para 5 µL e os padrões apresentados pelas amostras de camundongos do grupo 6 apresentaram genótipo tipo III, mostrando, portanto que era resultante de digestão parcial. Porém, do grupo 7, o camundongo nº 914 continuou apresentando o tipo III, sem apresentar padrão de digestão parcial; este foi o único sobrevivente do grupo e naqueles que apresentaram óbito, encontrou-se o genótipo 1 (Figura 3).

Os padrões observados na PCR-RFLP para a diferenciação dos genótipos tipo I e tipo III a partir dos isolados de camundongos podem ser visualizados na figura 2.

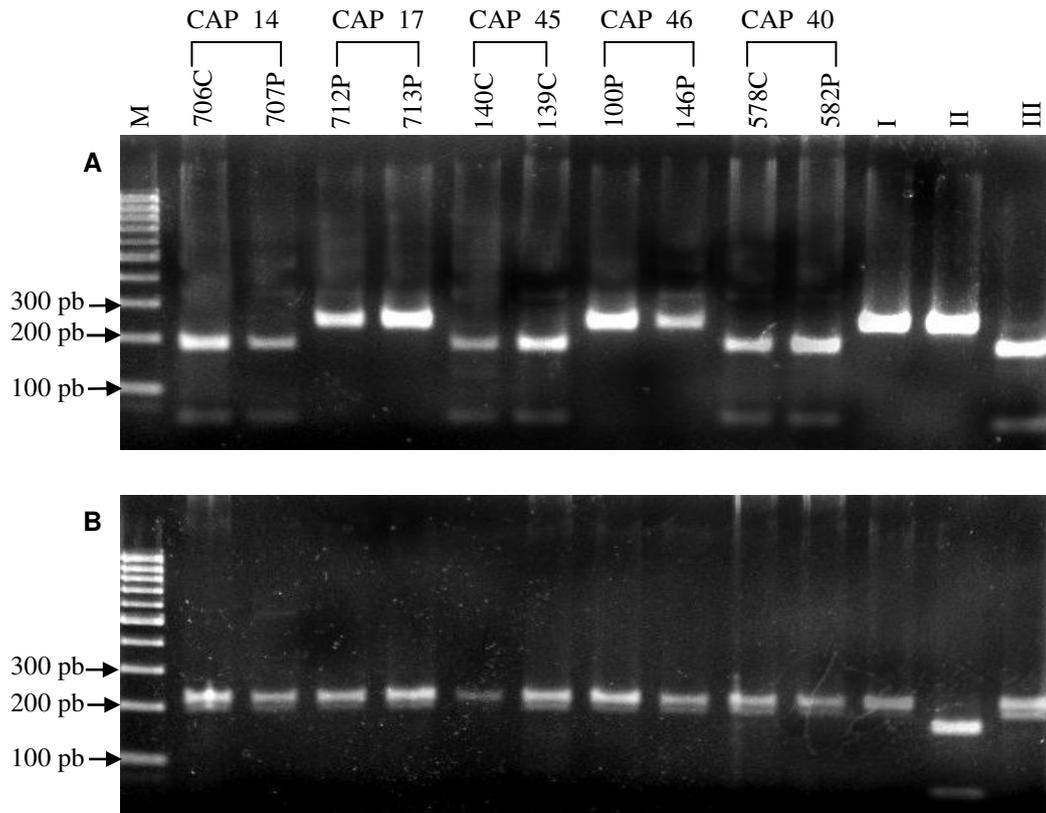


Figura 2 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease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

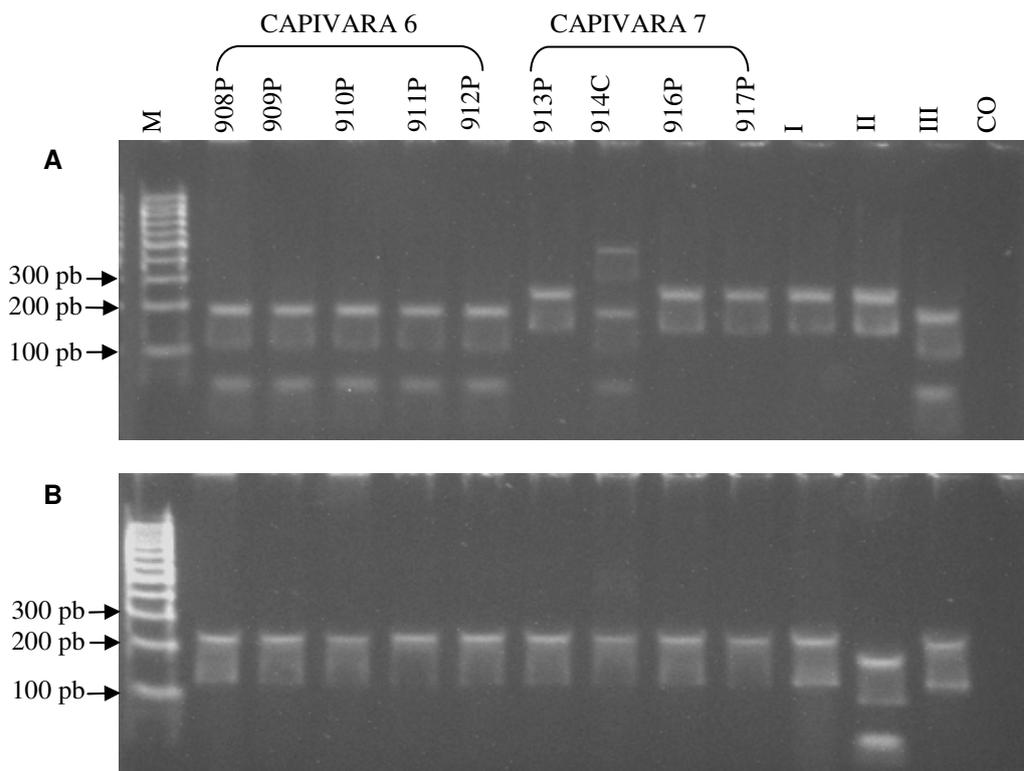


Figura 3 – PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras naturalmente infectadas. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MboI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e os números das capivaras correspondentes aos isolados. C=cérebro; P=pulmão; Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). CO= controle negativo (sem DNA). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). A amostra 914C (capivara 7) exhibe padrão tipo III e as restantes (913P, 916P e 917P) mostram padrão tipo I

5.3.2 PCR-RFLP – Amostras primárias (Capivaras)

Foi realizada a *nested* PCR de duas alíquotas (A e B) de cada uma das 35 capivaras das quais isolamentos foram obtidos, utilizando-se homogeneizados de tecidos. Dessas amostras, foram amplificados os fragmentos correspondentes às regiões 5' e 3' do *locus SAG2* de 22 amostras (62,8%), sendo depois submetidos à

análise de restrição. Os resultados de 21 amostras primárias foram similares aos obtidos na genotipagem dos isolados obtidos no bioensaio.

Fragmentos da região 5´ foram amplificados em 27 amostras (75%), e dentre estas, porém não foram amplificados os fragmentos da região 3´ em cinco amostras, mesmo depois de se tentar realizar a *nPCR* de outras três alíquotas das amostras primárias.

Os resultados da detecção de DNA de *T. gondii* nas regiões 5´ e 3´ do gene *SAG2* das amostras primárias das capivaras, através da *nPCR*, conforme o município de procedência, estão relacionados na tabela 8.

Tabela 8 - Amostras primárias analisadas e positivas, através da amplificação pela *nPCR* de fragmentos correspondentes às regiões 5´ e 3´ do *locus SAG2* de *Toxoplasma gondii*, segundo o município de procedência - São Paulo – 2006

| Município | Nº de amostras analisadas | Nº de amostras Positivas | % |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------|
| Andradina | 7 | 5 | 71,4 |
| Cordeirópolis | 9 | 4 | 44,4 |
| Cosmorama | 6 | 3 | 50,0 |
| Ribeirão Preto | 2 | 2 | 100,0 |
| São Paulo | 6 | 4 | 66,7 |
| Valparaíso | 5 | 4 | 80,0 |
| Total | 35 | 22 | 62,8 |

Quando se realizou a restrição das amostras primárias da capivara 7, estas mostraram padrões de genótipos mistos ou digestão parcial (Figura 4). Estas amostras foram então submetidas à análise por seqüenciamento.

Quanto à capivara nº 38, as amostras dos dois camundongos infectados foram analisadas e mostraram padrão tipo I, mas quando foram realizadas análise de restrição de duas alíquotas (A e B) das amostras primárias, estas apresentaram padrões do tipo misto ou digestão parcial (Figura 4). Foi então realizada a extração das outras três alíquotas (C, D e E) das amostras primárias e de outros três camundongos infectados do mesmo grupo. Os cinco camundongos infectados (568,

569, 570, 571 e 572) apresentaram padrão de genótipo I, mas todas as amostras primárias apresentaram padrões do tipo misto ou de digestão parcial (Figura 5). As amostras primárias foram analisadas através de seqüenciamento.

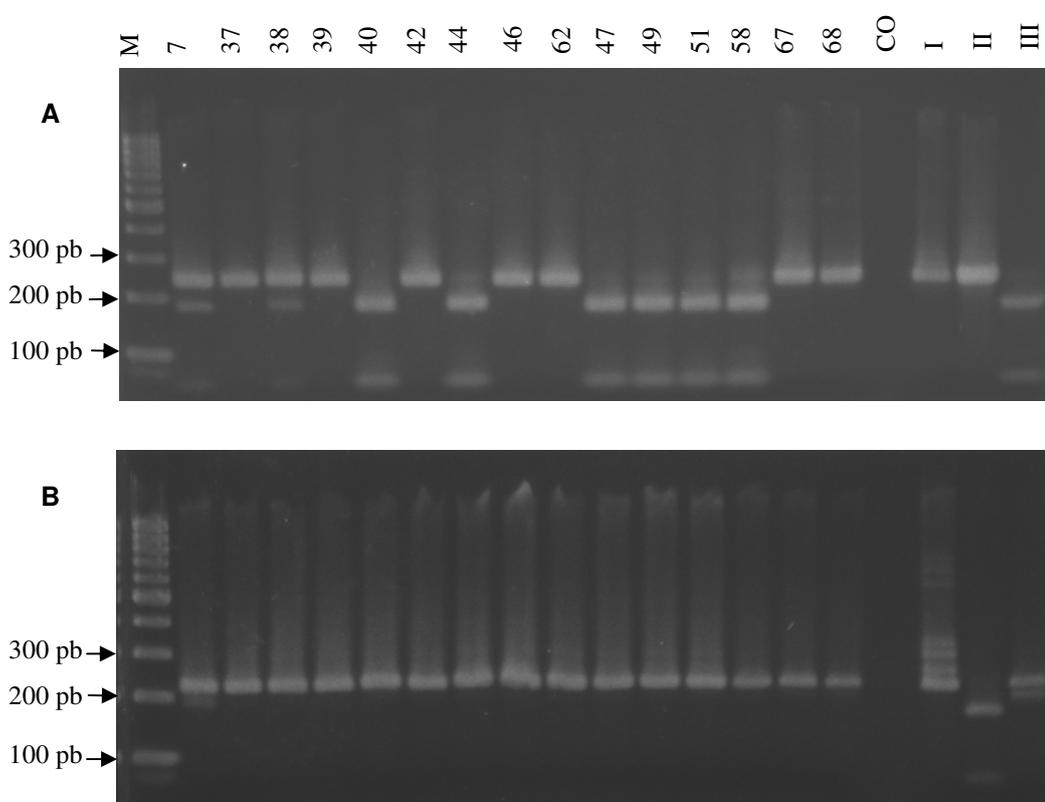


Figura 4 - *n*PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* diretamente a partir de amostras primárias de capivaras infectadas naturalmente. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números das capivaras. CO= controle negativo (sem DNA). Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras das capivaras 7 e 38 mostram padrões de infecção mista ou digestão parcial

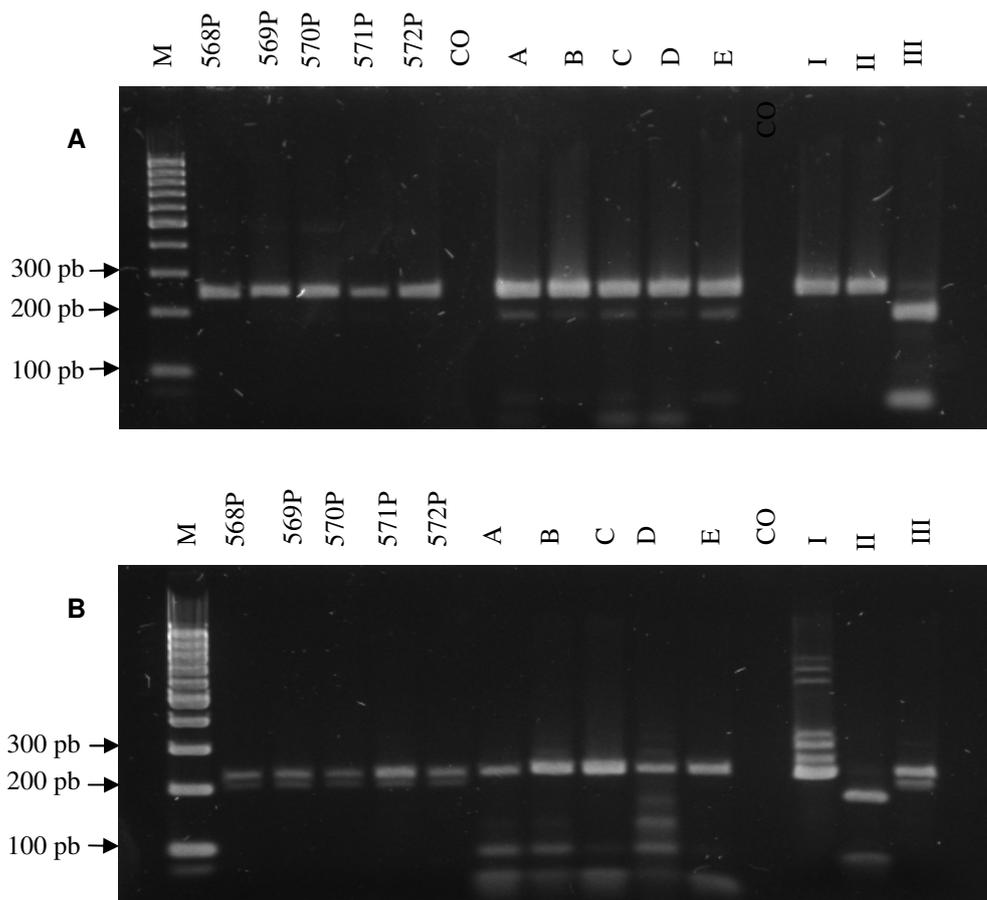


Figura 5 - PCR-RFLP do *locus SAG2*, em gel de agarose a 2%, para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* das amostras de camundongos e *n*PCR-RFLP diretamente de amostras primárias da capivara 38. (A) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 5' com a endonuclease *MBOI*, que distingue amostras do tipo III de amostras dos tipos I e II. (B) Análise de restrição de produtos amplificados do fragmento 3' com a endonuclease *HhaI*, que distingue amostras do tipo II de amostras dos tipos I e III. Nas linhas estão os números dos camundongos e as alíquotas dos tecidos (A-E) da capivara 38. P= Pulmão. CO= controle negativo (sem DNA). Linha I= controle do tipo I (amostra RH); linha II= controle do tipo II (isolado de veado); linha III= controle do tipo III (isolado de gambá). M= marcador de peso molecular (100pb, Fermentas). As amostras da capivara 38 mostram padrões de infecção mista ou digestão parcial

5.3.3 Análise por seqüenciamento

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

Das cinco alíquotas do pool de tecidos da capivara nº 7 (A-E), separadas antes da digestão enzimática, somente de duas alíquotas os fragmentos de DNA foram amplificados pela PCR nas regiões 5´ e 3´ do *locus SAG2* e na análise de restrição mostraram padrões misto ou de digestão parcial. Estas amostras foram então submetidas à reação de seqüenciamento e foi comprovado que a capivara estava infectada com o tipo misto.

Em relação às amostras primárias da capivara 38, de todas as cinco alíquotas foram detectados *T. gondii* pela *nPCR* e todas apresentaram padrões de digestão do tipo misto ou digestão parcial. Foram também realizadas análises de seqüenciamento dos produtos da PCR (Figura 6).

Das cinco alíquotas de tecidos da capivara 38, a alíquota “A” apresentou genótipo misto, as alíquotas “B”, “D” e “E” apresentaram genótipo I e a alíquota “C” apresentou genótipo III. Portanto pela análise de seqüenciamento confirmou-se que o padrão observado não era devido à digestão parcial, mas ao genótipo misto (tipo I e tipo III).

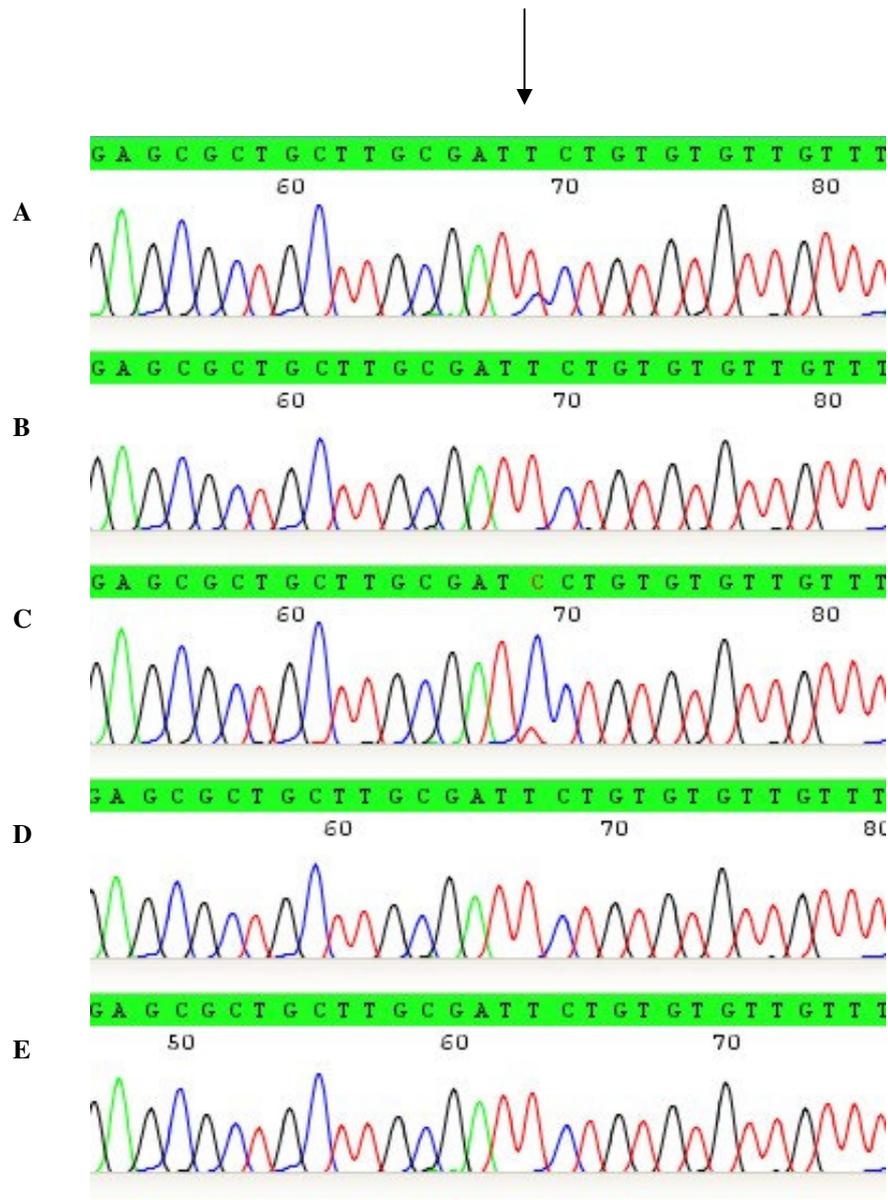


Figura 6 - Análise de seqüências de DNA de produtos da *n*PCR do fragmento 5' do *locus SAG2*, para a genotipagem de *Toxoplasma gondii* de amostras primárias da capivara 38. A seta indica a localização do sítio polimórfico. (A) alíquota A: o programa reconheceu a base Timidina no sítio de polimorfismo, mas apresenta também um pico com a base Citosina. (B), (D) e (E) alíquotas B, D e E: genótipo I, sem sítio de restrição para a enzima *MBOI* (GATT). (C) alíquota C: genótipo tipo III, com sítio de restrição para a enzima *MBOI* (GATC)

5.3.4 Genótipos de *T. gondii* em capivaras do Estado de São Paulo

Foram identificados pela análise de restrição, genótipos tipo I e tipo III, sendo 20 isolados identificados como tipo I (55,5%) e 14 como tipo III (38,9%) e dois isolados apresentaram genótipos mistos, tipos I e tipo III (5,6%). Não foi identificado nenhum isolado com genótipo II.

A proporção dos genótipos encontrados entre os isolados está ilustrada no gráfico 4.

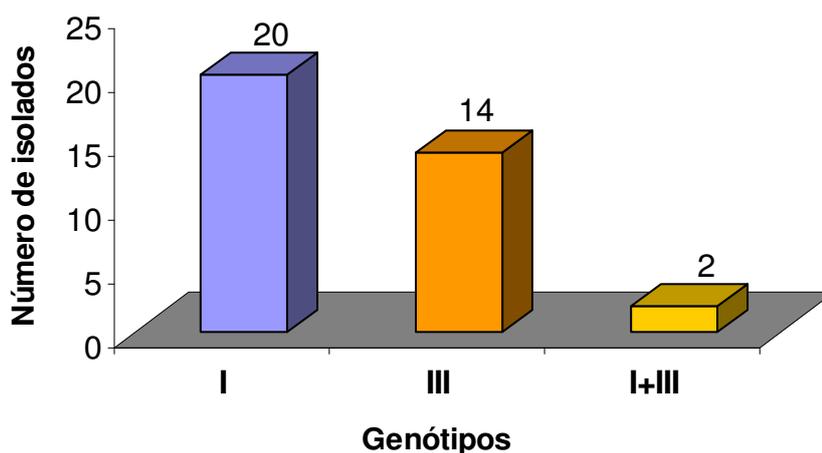


Gráfico 4 - Distribuição dos genótipos, determinados pela PCR-RFLP do *locus SAG2*, das amostras de *Toxoplasma gondii* de capivaras infectadas naturalmente. São Paulo, 2006

Apresentaram somente genótipos tipo I, amostras procedentes de apenas um município (Ribeirão Preto), sendo que três municípios apresentaram tanto o tipo I como tipo III (Andradina, Cordeirópolis, Cosmorama) e amostras provenientes de São Paulo e Valparaíso apresentaram genótipos I, III e misto (tipo I e tipo III).

A localização dos municípios de origem dos isolados e a distribuição dos respectivos genótipos estão ilustrados na figura 7.

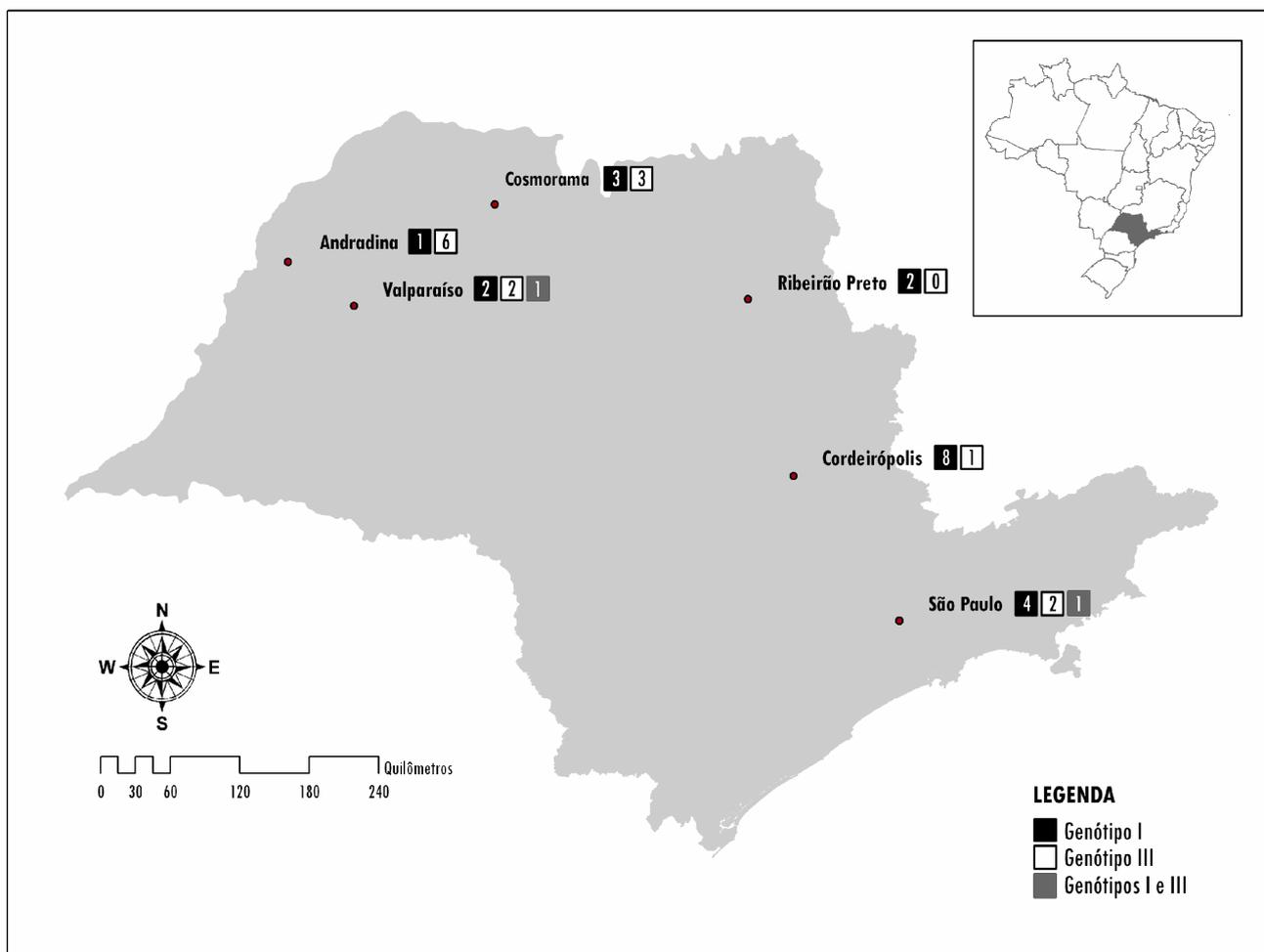


Figura 7 – Mapa do Estado de São Paulo indicando a localização de seis municípios e o número correspondente de isolados de *Toxoplasma gondii* de capivaras naturalmente infectadas, segundo o genótipo no SAG2. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – VPS – FMVZ – USP

Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das capivaras não apresentaram diferença estatisticamente significativa, quando comparados entre os isolados tipificados como I e III ($p=0,56$).

Das capivaras infectadas com genótipo I de *T. gondii* 50% apresentaram títulos entre 25 e 400 (mediana=200), os animais que tiveram genótipos com tipo III, 50% tiveram títulos entre 25 e 200 (mediana=100) e as de genótipo misto, entre 25 e 100 (mediana=50) (Gráfico 5).

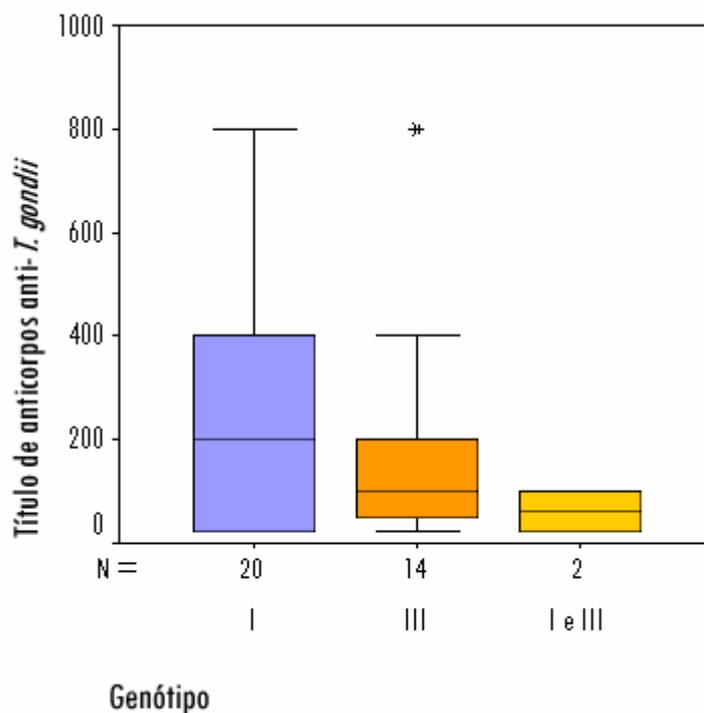


Gráfico 5 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de capivaras, segundo o genótipos encontrados (I, III e I+III) - São Paulo - 2006

Dentre as capivaras provenientes de criadouro (n=23), foram obtidos isolamentos de 20, sendo oito (40%) do genótipo I, 11 (55%) do genótipo III e em uma (5%), dos genótipos I e III concomitantemente. Dentre as capivaras de vida livre (17), obteve-se isolamento de 16, sendo 12 (75%) do genótipo I, três (18,7%) do genótipo III e em uma (6,3%), dos genótipos I e III.

Nos animais de vida livre, a proporção de isolados do tipo I foi significativamente maior ($p=0,049$) que nos animais de criadouros. De forma análoga, comparando-se as proporções de isolados do genótipo III, segundo o tipo de criação, observou-se que nos animais provenientes de criadouro, esta proporção é significativamente maior ($p = 0,041$).

A distribuição dos genótipos, segundo os municípios de origem dos isolados e a sobrevivência dos camundongos encontra-se na tabela 9.

Tabela 9 – Genótipos de *Toxoplasma gondii* de isolados de capivaras naturalmente infectadas, determinados pela PCR-RFLP do *locus SAG2*, segundo o município de procedência no Estado de São Paulo e a mortalidade em camundongos - São Paulo - 2006

| Município | Nº da capivara | Bioensaio em camundongos [§] | | | Genótipo | |
|-----------------|------------------|---------------------------------------|-----------------------|--------------|----------|------------------|
| | | % de óbitos | Sobrevida (dias P.I.) | Média (dias) | Isolado | Amostra primária |
| Andradina* | 44 | 100 | 14-19 | 17,3 | III | III |
| | 45 | 0 | sobreviveram | 0 | III | ND |
| | 46 | 100 | 9-19 | 14,8 | I | I |
| | 47 | 0 | sobreviveram | 0 | III | III |
| | 49 | 0 | sobreviveram | 0 | III | III |
| | 51 | 0 | sobreviveram | 0 | III | III |
| | 53 | 0 | sobreviveu | 0 | III | ND |
| Cordeirópolis** | 11 | 100 | 17-25 | 20,8 | I | I |
| | 12 | 100 | 14-16 | 14,4 | I | I |
| | 13 | 100 | 21-27 | 23,8 | III | ND |
| | 14 | 33 | 26 | 26,0 | I | ND |
| | 15 | 100 | 15-21 | 17,3 | I | I |
| | 16 | 33 | 22 | 22,0 | I | ND |
| | 17 | 100 | 12-14 | 13,0 | I | I |
| | 18 | 60 | 21-30 | 25,3 | I | ND |
| | 19 | 75 | 15-20 | 16,7 | I | ND |
| Cosmorama* | 57 | 0 | sobreviveu | 0,0 | III | ND |
| | 58 | 0 | sobreviveram | 0,0 | III | III |
| | 62 | 40 | 21-22 | 21,5 | I | ND |
| | 65 | 0 | sobreviveram | 0,0 | III | ND |
| | 67 | 60 | 18-31 | 22,3 | I | I |
| | 68 | 100 | 10-20 | 16,4 | I | I |
| Ribeirão Preto* | 20 ^{§§} | 90 | 11-14 | 11,7 | I | I |
| | 32 ^{§§} | 88 | 13-26 | 19,0 | I | I |
| São Paulo** | 1 | 100 | 14-16 | 14,8 | I | ND |
| | 5 | 100 | 14-16 | 15,4 | I | I |
| | 6 | 100 | 13-21 | 15,4 | III | III |
| | 7 | 75 | 11-12 | 11,7 | I+III | I+III |
| | 33 ^{§§} | 100 | 27 | 27,0 | I | ND |
| | 42 | 100 | 18-18 | 14,2 | I | I |
| | 43 | 100 | 16-22 | 20,0 | III | ND |
| Valparaíso* | 36 | 100 | 12-20 | 16,0 | I | ND |
| | 37 | 75 | 20-26 | 22,7 | III | III |
| | 38 | 100 | 14-19 | 15,6 | I | I+III |
| | 39 | 100 | 16-18 | 16,8 | I | I |
| | 40 | 20 | 18 | 18,0 | III | III |

*Criadouro

**Vida livre

§ cinco camundongos inoculados por grupo

§§ Dez camundongos inoculados por grupo

P.I.=Pós-inoculação

ND: não detectado pela PCR

Do total dos camundongos infectados, 65,4% (102/156) infectaram-se por isolados do tipo I, 31,4% (49/156) do tipo III e 2,6% (4/156) apresentaram tipo I e tipo III.

Dos camundongos infectados com genótipo I, 86,3% (88/102) morreram entre os dias oito e 31 e 44,9% (22/49) dos infectados com genótipo III tiveram óbitos entre os dias 13 e 27. A frequência de óbitos em camundongos com genótipo I (86%) foi maior do que o tipo III (44,9%) ($p < 0,001$).

Dos camundongos que foram a óbito e isolou-se tipo I, foram observados cistos nos cérebros já no 11^o dia P.I. e daqueles com genótipo III, cistos foram encontrados nos camundongos mortos a partir do 14^o dia P.I.

A distribuição dos genótipos entre os camundongos infectados que sobreviveram e os que vieram a óbito durante o período experimental podem ser visualizados no gráfico 6.

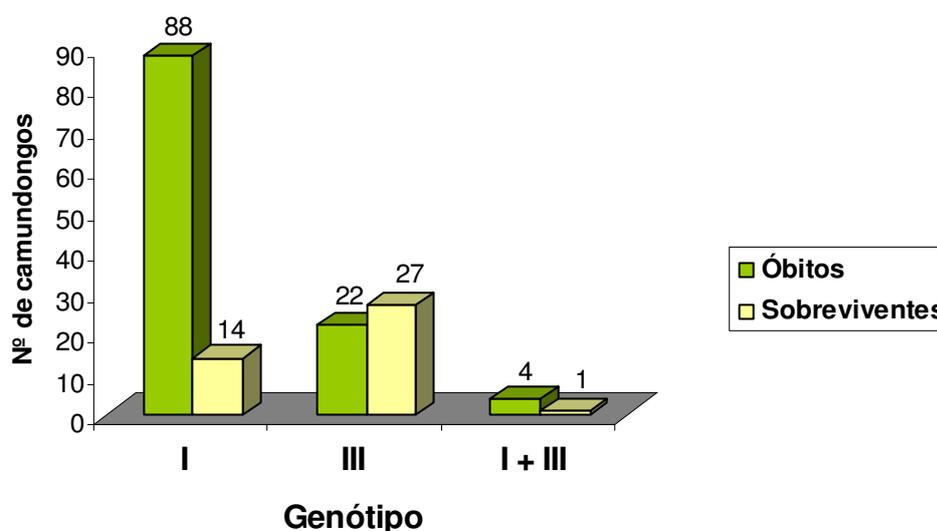


Gráfico 6 - Distribuição dos genótipos de *Toxoplasma gondii* de isolados de capivaras naturalmente infectadas do Estado de São Paulo, segundo a condição de sobrevivência dos camundongos infectados durante o período experimental - São Paulo - 2006

Todos os grupos de genótipos tipo I apresentaram um ou mais camundongos que foram a óbito por toxoplasmose, isto é, nenhum grupo com esse genótipo apresentou 100% de camundongos sobreviventes. Por outro lado, 67%

dos isolados tipo III tiveram 100% dos camundongos sobreviventes. Houve diferença do número de grupos com óbitos de camundongos no genótipo I (100%) em relação ao genótipo III (43%) ($p < 0,001$).

A média de sobrevivência e o intervalo de confiança (95%) dos camundongos dos grupos dos quais isolou-se tipo I foi de 23 dias (IC 95% = 20 a 45 dias). Para os grupos com isolado tipo III foi de 42 dias (IC 95% = 36 a 48 dias) e para os grupos mistos I e III, foi de 24 dias (IC 95% = 3 a 44 dias). O tempo de sobrevivência dos camundongos dos grupos que apresentaram isolados tipo III foi maior que o dos camundongos dos grupos nos quais se isolou o tipo I ($p < 0,001$).

No gráfico 7 estão representadas as proporções de camundongos sobreviventes infectados com os genótipos tipo I e tipo III.

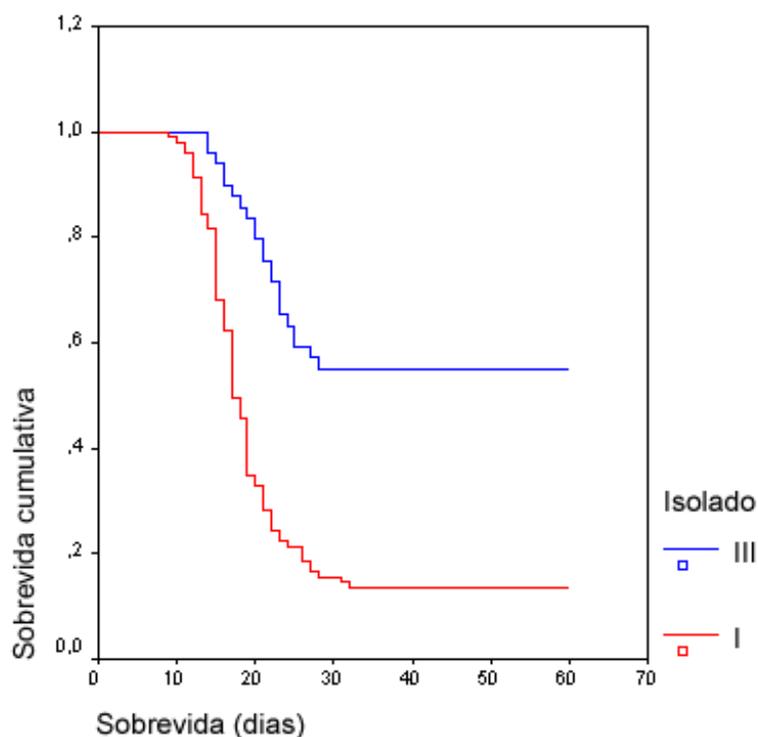


Gráfico 7 - Proporção de camundongos sobreviventes infectados com os genótipos I e III de *Toxoplasma gondii*, a partir do dia da inoculação até o término do experimento (60 dias) - São Paulo - 2006

No Apêndice A estão ilustrados todos os dados sobre as capivaras e os resultados obtidos na sorologia, isolamento e genotipagem.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* apresentou-se alta (75%) entre as capivaras. Cañón-Franco et al. (2003), também com capivaras do mesmo estado, encontraram freqüência de 69,8%, semelhante aos valores ora observados. No estudo desenvolvido por Cañón-Franco et al. (2003) as cidades de origem dos animais (Campinas, Monte Alegre do Sul, Paulínia, Pirassununga, São João da Boa Vista e São Paulo) estão localizadas mais próximas umas das outras (de 23 a 219 km), enquanto no presente estudo os municípios de origem das capivaras (Andradina, Cordeirópolis, Cosmorama, Ribeirão Preto, Valparaíso e São Paulo) estão distantes um do outro de 80 a 737 km, abrangendo boa parte do estado. O fato de capivaras soropositivas estarem sendo encontradas em grande parte dos municípios amostrados em ambos estudos indica ampla distribuição do agente no Estado de São Paulo.

Em relação a faixa etária não foi observada diferença estatística entre adultos e jovens, diferentemente do que geralmente ocorre em outras espécies de animais silvestres, domésticos e mesmo no homem, cuja prevalência aumenta com a idade (DUBEY; BEATTIE, 1988; OKSANEN et al., 1997). Este resultado pode indicar que a infecção nesses animais deva ocorrer quando esses são ainda bastante jovens ou que esteja ocorrendo transmissão transplacentária.

Não foi observada diferença estatística na ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* entre machos e fêmeas, observação comum em outros estudos com animais domésticos (DUBEY; BEATTIE, 1988; PENA et al., 2006).

Os criadouros de capivaras, para obterem o licenciamento pelo IBAMA, devem manter condições semelhantes às existentes nos habitats naturais. Entre os animais de vida livre e criadouros, a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii*, bem como o número de isolados obtidos foi similar entre os diferentes ambientes, indicando que o sistema utilizado para a criação é favorável à manutenção do *T. gondii* nessas populações.

A alta freqüência de anticorpos anti-*T. gondii* e a ocorrência homogênea entre todos os aspectos analisados (faixa etária, sexo, tipo de criação), pode estar

associada ao modo de vida das capivaras. Estas vivem em grupos e estão sujeitas às mesmas fontes de infecção. Estão sempre próximas de coleções hídricas, capões de matas em áreas baixas e forrageiras, condições estas propícias para a sobrevivência de oocistos de *T. gondii*. Segundo Dubey e Beattie (1988), os oocistos podem sobreviver por longos períodos na água.

Com o crescimento das cidades, o ser humano tem invadido áreas de matas para a construção de moradias e, assim, além de conviver mais próximo dos animais silvestres, como a capivara, levam consigo os animais domésticos, como o gato, colaborando para que o ciclo de transmissão do *T. gondii* se feche.

Em levantamento sorológico realizado em roedores da Guiana Francesa, foi encontrada alta prevalência (60%) nas pacas que, à semelhança das capivaras, no Estado de São Paulo, também vivem em solos úmidos e terrenos de baixa elevação. Em contraste, no outro roedor estudado, a cutia, a prevalência foi baixa (4%), porém este animal tem preferência por habitats mais secos e elevados (THOISY et al., 2003).

Outro fator que pode explicar a alta ocorrência de anticorpos seria a probabilidade de haver transmissão transplacentária nas capivaras, com os filhotes já infectados ao nascer. Esta via de transmissão já foi comprovada experimentalmente em outras espécies de roedores, como o camundongo e o rato. Fêmeas prenhes de camundongos, quando infectadas, a ocorrência de transmissão de *T. gondii* aos fetos foi verificada por Beverley (1959) em até nove gerações, mesmo sem reinfecção. Também foi demonstrada alta frequência de transmissão vertical em camundongos, tanto doméstico como silvestre, experimentalmente infectados (OWEN; TREES, 1998).

Em estudos com infecção experimental em ratos, a transmissão vertical de *T. gondii* ocorreu quando a fêmea se infectou durante a prenhez, mas não nas gerações subseqüentes (DUBEY et al., 1997). Marshall et al. (2004) estudaram a frequência de transmissão vertical de *T. gondii* na população de camundongos silvestres infectados naturalmente no Reino Unido, e verificaram que 75% das fêmeas prenhes eram positivas, sendo detectado, através de PCR, o agente em pelo menos um dos fetos, indicando transmissão transplacentária.

No presente estudo alta porcentagem (90%) de isolados foi obtida, independente dos títulos de anticorpos. Não é comum que valores tão altos de isolamentos sejam obtidos. Utilizando técnica semelhante, índices de 25%, 66,2% e 41,7% foram obtidos, respectivamente de suínos (SANTOS et al., 2005), gatos (PENA et al., 2006) e cães (DUBEY et al., 2007b) do Estado de São Paulo (no prelo)¹. A alta taxa de recuperação de *T. gondii* pode indicar uma grande concentração de cistos e boa distribuição destes nos tecidos da capivara.

Dubey, Morales e Lehmann (2004) obtiveram isolamento de *T. gondii* de coração de 70% dos ursos pretos (*Ursus americanus*) dos EUA soropositivos, porém os autores utilizaram o gato para a realização do bioensaio, sendo, portanto, a quantidade de tecido oferecida, muito maior do que a utilizada em bioensaio com camundongos.

Apesar de não terem sido inoculados tecidos de cada um dos órgãos separadamente a grupos de camundongos, pode-se afirmar que os órgãos eleitos no presente estudo (cérebro, coração e língua) encontravam-se, provavelmente, com alta concentração de cistos, tendo em vista o grande número de isolamentos obtidos e podem ser recomendados em futuros estudos com capivaras.

Dentre os 36 isolados obtidos, 17 grupos apresentaram um ou mais camundongos não infectados, e dentre estes, três grupos apresentaram somente um camundongo infectado dos cinco inoculados, indicando que mesmo em amostras consideradas adequadas para o isolamento, o número de camundongos e tecidos utilizados é fundamental para a recuperação do *T. gondii*.

Com o objetivo de analisar os genótipos dos isolados de capivaras utilizou-se o método de PCR-RFLP baseado nos estudos de genotipagem multilocus anteriormente desenvolvidos. Nesses estudos foi observado que a população de *T. gondii* era altamente clonal (HOWE; SIBLEY, 1995) e que o sistema de tipagem baseado em PCR-RFLP no *locus SAG2* podia ser recomendado, devido à capacidade de distinção das três linhagens arquétipos (tipos I, II e III). Neste estudo, dos 36 isolados genotipados, 20 amostras foram identificadas como tipo I (55,5%),

¹ 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, 2007b (no prelo).

14 amostras como tipo III (38,9%) e duas (5,6%) como mistas (tipo I e III). Não foi encontrado tipo II entre os isolados.

Nas capivaras de vida livre, a proporção de isolados tipo I foi significativamente maior ($p=0,049$) que nos animais de criadouros. De forma análoga, comparando-se as proporções de isolados do genótipo III, segundo o tipo de criação, observou-se que nos animais provenientes de criadouro, esta proporção foi significativamente maior ($p = 0,041$). Uma vez que os isolados tipo I pelo *SAG2* vêm sendo considerados os mais patogênicos em humanos (HOWE; SIBLEY, 1995; FUENTES et al., 2001; VALLOCHI et al., 2005; DE MOURA et al., 2006) o tipo de criação desses animais pode estar favorecendo o maior contato com esse tipo de isolado. Os animais de vida livre do presente estudo foram procedentes de parques e áreas públicas, enquanto os de criadouros vivem afastados da população, mas próximos de outros animais domésticos e silvestres.

Além disso, foi observado que alguns isolados tipo III foram virulentos para camundongos, isto é, mataram todos os animais do grupo e também foram observados isolados tipo I com virulência intermediária, levando parte dos camundongos à óbito.

Recentemente, contudo, vários pesquisadores têm enfatizado sobre as limitações da genotipagem de amostras de *T. gondii* baseada em apenas um *locus*, uma vez que esta técnica impossibilita a identificação de genótipos atípicos ou recombinantes. A existência destas linhagens entre os isolados brasileiros já foi descrita em animais e humanos (FERREIRA et al., 2006; KHAN et al., 2006; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007a,b²) que também relataram que os genótipos encontrados não correspondiam aos fenótipos de virulência anteriormente estabelecidos por Howe e Sibley (1995).

Em estudos iniciados em 2002, com galinhas caipiras, naturalmente infectadas, procedentes de diferentes estados e regiões brasileiros, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rondônia (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003a,d; DUBEY et al., 2006b) e gatos de São Paulo (PENA et al., 2006) e Paraná (DUBEY et al., 2004c), perfil semelhante ao encontrado nos isolados do presente estudo foi

² 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, 2007b (no prelo).

observado, utilizando a mesma metodologia. Nesses estudos o fenótipo de virulência em camundongos e o não encontro do arquétipo II, mostram um comportamento diverso daquele anteriormente descrito com amostras do hemisfério norte.

Assim, recentemente, pesquisadores vêm utilizando um número maior de marcadores e com maior grau de distinção dos diferentes genótipos, inclusive capazes de detectar amostras mistas. Utilizando 11 marcadores, Dubey et al. (2007a) estudaram isolados de galinhas, oriundos dos extremos norte (Pará) e sul (Rio Grande do Sul) do Brasil. Observaram grande diversidade genética da população de *T. gondii* entre os isolados com 18 diferentes genótipos entre os 34 obtidos dessas localidades, sendo 15 do Pará e 19 do Rio Grande do Sul. Também observaram que as populações eram distintas entre os diferentes estados, esta é uma informação muito importante, apontando para a grande diversidade genotípica das amostras de *T. gondii* no Brasil, apesar do número de isolados analisados ser relativamente pequeno. Somente quatro isolados do Rio Grande do Sul apresentaram o mesmo repertório de alelos para todos os marcadores utilizados (três tipo III e um tipo I) e todos os outros isolados, de ambas localidades, foram considerados atípicos.

Isolados obtidos de cães de São Paulo, utilizando os mesmos 11 marcadores do estudo anterior (DUBEY et al., 2007b) revelaram a ocorrência de diferentes genótipos na maior parte das amostras, confirmando achados prévios de que a população de *T. gondii* do Brasil é altamente diversa e vem se repetindo em diferentes regiões e espécies animais estudados (no prelo)³. Provavelmente a diversidade entre fenótipo e genótipo obtida no presente estudo, se analisada com maior número de marcadores genéticos também apresentará um padrão atípico, motivo pelo qual amostras tipo III pelo *SAG2* têm levado os camundongos à óbito e camundongos nos quais o tipo I foi isolado, sobreviveram à infecção. Esta probabilidade é reforçada por se tratar de amostras de animais silvestres, uma vez que isolados de lontras dos EUA apresentaram alta porcentagem de genótipo atípico, denominado x, mesma região onde o encontro de amostras atípicas é relativamente raro em animais domésticos e em humanos (MILLER et al., 2004; CONRAD et al., 2005).

³ 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, 2007b (no prelo).

É importante salientar que os estudos sobre virulência de amostras são mais adequadamente interpretados quando realizados utilizando o isolamento primário, minimizando as chances de alteração de virulência devido a subpassagens em camundongos ou cultivo celular. Neste estudo todas as amostras que tiveram o fenótipo avaliado eram amostras obtidas diretamente do ambiente natural.

Nas amostras das capivaras foram encontrados dois isolados com genótipo misto. Uma corresponde à amostra de uma capivara de vida livre de São Paulo e outra de criadouro de Valparaíso. Na amostra de São Paulo, dos quatro camundongos inoculados e infectados, três morreram e pela PCR-RFLP (SAG2) todos apresentaram genótipo I e do camundongo sobrevivente a amostra de cérebro analisada apresentou *T. gondii* tipo III. Também foi observado em isolado de galinha caipira do Rio de Janeiro com infecção mista o mesmo comportamento (DUBEY et al., 2003a). Tanto *in vitro* como *in vivo*, foi demonstrado que os parasitos pertencentes às amostras tipo I migram mais efetivamente nos tecidos (cultivo celular ou animal de laboratório) quando comparado com as amostras tipo II ou III (BARRAGAN; SIBLEY, 2002), indicando um aspecto de maior patogenicidade desse arquétipo e que infecções mistas podem originar diferentes padrões de infecção em um hospedeiro.

Dubey et al. (2005d) analisando amostras de galinhas caipiras de Grenada e Pena et al. (2006) amostras de gatos de São Paulo, encontraram também isolados tipo misto. Foram, porém, detectados através da ocorrência de digestão incompleta, após restrição com a enzima *Sau3AI*, do produto de PCR da região 5' do *locus* SAG2, das amostras de camundongos. Para determinar a presença de genótipo misto, os produtos da PCR foram diretamente seqüenciados. A seqüência dos cromatogramas mostraram a presença de picos de bases Citosina e Timina no sítio polimórfico, confirmando a presença de ambos alelos. Foi detectado no mesmo camundongo *T. gondii* viável de dois genótipos (I e III), originando, assim, infecção mista no camundongo, diferentemente do ocorrido no presente estudo.

Na capivara proveniente de Valparaíso, na qual isolados tipo I e III no SAG2 foram observados, todos os cinco camundongos infectados morreram e os isolados de pulmão apresentaram genótipo I e nenhuma amostra apresentou padrão de digestão parcial, entretanto a infecção mista foi detectada na análise da amostra primária da capivara. Quando as alíquotas apresentaram padrões de digestão

parcial, estas foram sequenciadas e confirmou-se a presença de genótipo misto. A observação das seqüências de DNA nos cromatogramas permitiu que as amostras primárias da capivara fossem reconhecidas como mista, o que não seria possível se fossem analisadas somente as seqüências de nucleotídeos. Genótipos mistos também foram detectados diretamente de amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose (FUENTES et al., 2001, ASPINALL et al., 2003).

A eficácia da identificação de infecções mistas por múltiplos genótipos depende de muitos fatores e os mais importantes seriam a taxa relativa de multiplicação de diferentes genótipos e o número de passagens da amostra (AJZENBERG et al., 2002b; 2004; BOOTHROYD; GRIGG, 2002; VILLENA et al., 2004). O tipo I multiplicaria mais rápido, encobrendo os outros genótipos, como pode acontecer quando se realiza passagem progressiva das amostras em camundongos ou cultivo celular.

A densidade de *T. gondii* em tecidos de animais assintomáticos é baixa, tornando-se difícil detectar o parasita diretamente desses. Detecção de genótipos mistos diretamente de amostras clínicas de pacientes com toxoplasmose têm sido possível (FUENTES et al., 2001; ASPINALL et al., 2003; GALLEGO et al., 2006) e nesses estudos a análise por seqüenciamento com o objetivo de se verificar se o padrão observado na RFLP tratava-se de digestão incompleta ou infecção mista tem sido realizado.

No presente trabalho obteve-se ótima amplificação dos fragmentos de DNA, através de PCR simples, de todos os isolados de camundongos, porém, das amostras primárias foi necessária a realização de *nested*PCR. Foram analisadas amostras primárias correspondentes aos isolados obtidos de camundongos, das quais foram processadas duas alíquotas de tecidos de cada capivara. Das 35 amostras de tecidos das capivaras, obteve-se a amplificação em ambas as regiões de 22 amostras. Em nove, obteve-se amplificação das regiões 5´ e 3´ de apenas uma alíquota, provavelmente pela distribuição não homogênea do parasita na amostra, refletindo o que ocorre no bioensaio, quando somente alguns camundongos se infectam ao receber inóculo do mesmo animal. Estes resultados enfatizam a importância da bioprova que, além de permitir a observação do fenótipo da amostra, foi mais eficiente na identificação de isolados de *T. gondii*. Pena et al. (2006) obtiveram porcentagem maior de detecção de DNA de *T. gondii* de amostras

primárias de gatos, o que poderia ser devido ao tamanho destes, bem menores do que as capivaras, favorecendo o encontro de cistos nos tecidos analisados.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

O cérebro, coração e língua mostraram ser bons tecidos para a recuperação de *T. gondii* quando se utiliza o bioensaio em camundongos para o isolamento do parasita.

Através da PCR-RFLP no *locus SAG2*, concluiu-se que os genótipos I e III estão distribuídos na população de capivaras no Estado de São Paulo.

A infecção mista ocorre na população de capivaras no Estado de São Paulo.

Tanto os isolados com genótipos I como o III apresentaram óbitos dos camundongos, sendo a linhagem I mais patogênica.

A análise direta dos tecidos da capivara pela *nested*PCR auxiliou na identificação de infecções mistas.

A análise de seqüenciamento de DNA deve ser realizada para a diferenciação dos casos de digestão parcial e infecção mista quando se utiliza a PCR-RFLP.

A análise direta dos homogeneizados de tecidos de capivaras na *nested*PCR permite uma boa detecção de *T. gondii*, além de ser uma prova rápida e dispensa o uso de camundongos.

Referências

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles communes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organization Panamericana de la Salud. 1986.

AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics, shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2001.

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

AJZENBERG, D.; BANULS, A. L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M. L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 27-38, 2002a.

AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÉRES, M-H.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M. L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 5, p. 684-689, 2002b.

ALHO, C. J. R.; CAMPOS, M. S. C.; GONÇALVES, H. C. Ecologia de capivara (*Hydrochaeris Hydrochaeris*, Rodentia) do Pantanal: I. Habitats, densidades e tamanho de grupo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 47, p. 87-97, 1987.

AMENDOEIRA, M. R. R.; SOBRAL, C. A. Q.; TEVA, A.; DE LIMA, J. N.; KLEIN, C. H. Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 671-676, 2003.

ARAUJO, F. G.; WILLIAMS, D. M.; GRUMET, F. C.; REMINGTON, J. S. Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 5, p. 1528, 1976.

ASHBURN, D. History and general epidemiology. In: HO-YEN, D. O.; JOSS, A. W. L. (Ed.). **Human toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, 1992. p. 1-25.

ASPINALL, T. V.; GUY, E. C.; ROBERTS, K. E.; JOYNSON, D. H.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales: public health implications. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.

- ASPINALL, T. V.; MARLEE, D.; HYDE, J. E.; SIMS, P. F. G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 9, p.1193-1199, 2002.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K (Ed.). **Short protocols molecular biology**. 4th. 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.; ADDIS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 426-430, 2003.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002.
- BERSANO, J. G.; VILLALOBOS, E. M. C.; PINHEIRO, E. O. S.; CASTRO, V.; PAULIN, L. M.; MIYASHIRO, S.; CUNHA, E. M. S.; PITUCO, E. M.; D'STEFANO, E.; OLIVEIRA, S. M.; GENOVEZ, M. E. Estudo sanitário preliminar de um grupo de capivaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) capturadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e criadas em cativeiro. In: WORKSHOP DO PLANO DE MANEJO DE CAPIVARAS NO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., 2002, São Paulo. **Anais do 1º Workshop**, 2002. p. 40-43.
- BERSANO, J. G.; VILLALOBOS, E. M. C.; GENOVEZ, M. E.; GRASSO, L. P.; CASTRO, V.; PALTRONIERI, C. Ocorrência de anticorpos para enfermidades reprodutivas em animais silvestres no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, p. 47, 2000. Supplement.
- BEVERLEY, J. K. A. Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. London: **Nature**, v. 183, p. 1348-1349, 1959.
- BLACKSTON, C. R.; DUBEY, J. P.; DOTSON, E.; SU, C.; THULLIEZ, P.; SIBLEY, D.; LEHMANN, T. High-resolution typing of *Toxoplasma gondii* using microsatellite loci. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1472-1475, 2001.
- 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.
- BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 3-9, 1998.
- BRANDÃO, G. P.; FERREIRA, A. M.; MELO, M. N.; VITOR, R. W. A. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from inas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, p. 143-149, 2006.

- BURRIDGE, M. J.; BIGLER, W. J.; FORRESTER, D. J.; HENNEMANN, J. M. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 9, p. 964-967, 1979.
- CAÑON-FRANCO, W. A.; YAI, L. E. O.; JOPPERT, A. M.; SOUZA, C. E.; D'AURIA, S. R. N.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the rodent capybara (*Hydrochoeris hydrochoeris*) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 850, 2003.
- CARME, B.; AZNAR, C.; MOTARD, A.; DEMAR, M.; DE THOISY, B. Serologic survey of *Toxoplasma gondii* in noncarnivorous free-ranging neotropical mammals in French Guiana. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2002.
- CASAS, M. C.; DUSZYNSKI, D. W.; ZALLES, L. M. Three new Eimerians in capybara (*Hydrochaeris Hydrochaeris*) populations from eastern Bolivia and southern Venezuela. **Journal of Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 247-251, 1995.
- CAVALCANTE, A. C. R. **Epidemiologia e caracterização do *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceau, 1909) em caprinos no Ceará**. 2004. 145 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- CLARK, D. P.; RUSSEL, L. D. **Molecular biology: made simple and fun**. Illinois: Cache River Press, 1997. p. 235-268.
- COLE, R. A.; LINDSAY, D. S.; HOWE, D. K.; RODERICK, C. L.; DUBEY, J. P.; THOMAS, N. J.; BAETEN, L. A. Biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **The journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-530, 2000.
- CONRAD, P. A.; MILLER, M. A.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MAZET, J.; DABRITZ, H.; JESSUP, D. A.; GULLAND, E.; GRIGG, M. E. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1155-1168, 2005.
- COSTA, C. A.; CATTO, J. B. Helminthos parasitos de capivaras (*Hydrochoeris Hydrochaeris*) na sub-região de Nhecolândia, Pantanal Sul-Matogrossense. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 51, n. 1, p. 39-48, 1994.
- COSTA, J. M.; DARDÉ, M. L.; ASSOULINE, B.; VIDAUD, M.; BRETAGNE, S. Microsatellite in the beta-tubulin gene of *Toxoplasma gondii* as a new genetic marker for use in direct screening of amniotic fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2542-2545, 1997.
- CRISTINA, N.; DARDÉ, M. L.; BOUDIN, C.; TAVERNIER, G.; PESTRE-ALEXANDRE, M.; AMBROISE-THOMAS, P. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains, combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. **Parasitology Research**, v. 81, n. 1, p. 32-37, 1995.

CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. **Parasitology Research**, v. 77, n. 2, p. 266-268, 1991.

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

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

DA SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; DE LIMA V. Y.; D'ARC MORETTI, L.; PINHEIRO, J. P.; TANAKA, E. M.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 23-27, 2005.

DARDÉ, M. L. Biodiversity in *Toxoplasma gondii*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 219, n. 1, p. 27-41, 1996.

DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates: biological and epidemiological implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 786-794, 1992.

DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, n. 6, p. 551-558, 1988.

DARDÉ, M. L.; VILLENA, I.; PINON, J. M.; BEGUINOT, I. Severe toxoplasmosis caused by a *Toxoplasma gondii* strain with a new isoenzyme type acquired in French Guyana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 324, 1998.

DE MOURA, L.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; WADA, M. Y.; JONES, J. L.; TUBOL, S. H.; CARMO, E. H.; RAMALHO, W. M.; CAMARGO, N. J.; TREVISAN, R.; GRAÇA, R. M. T.; SILVA, A. J.; MOURA, I.; DUBEY, J. P.; GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326-329, 2006.

DEFEO, M. L.; DUBEY, J. P.; MATHER, T. N.; RHODES III, R. C. Epidemiologic investigation of seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cats and rodents. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 2, p. 1714-1717, 2002.

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

DREESEN, D. W. *Toxoplasma gondii* in wildlife. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 274-276, 1990.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 3-4, p.181-223, 1986.

- DUBEY, J. P. A waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, 2004.
- DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592-602, 1997.
- DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 6, p. 910-913, 1988.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 75-77, 1998a.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, E. J. L.; SIMPSON, D. J. H. (Ed.). **Zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, 1998b. p. 579-597.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1988. p. 1-40.
- DUBEY, J. P.; BHAIYAT, M. I.; DE ALLIE, C.; MACPHERSON, C. N. L.; SHARMA, R. N.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; MISKA, K. B.; HILL, D. E.; LEHMANN, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 557-560, 2005a.
- DUBEY, J. P.; BHAIYAT, M. I.; MACPHERSON, C. N. L.; DE ALLIE, C.; CHIKWETO, A.; KWOK, O. C. H.; SHARMA, R. N. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 5, p. 1107-1108, 2006a.
- DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337-339, 1987.
- DUBEY, J. P.; EDELHOFER, R.; MARCET, P.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 299-306, 2005b.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, v. 4, p. 537-546, 1976.
- DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; VIANNA, M. C. 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, 2006b.
- DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARIN, J. E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C. B.; HILL, D.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and

- biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, 2005c.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M. A.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 99-105, 2002.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003a.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; HILALI, M.; EL-GHAYSH, A.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 89-95, 2003b.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T.; DAVIS, M. F.; MORISHITA, T. Y. *Toxoplasma gondii* isolates from free-ranging chickens from the United States. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 5, p.1060-1062, 2003c.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DE YOUNG, R. W.; DAHL, E.; EBERHARD, M. L.; NACE, E. K.; WON, K.; BISHOP, H.; PUNKOSDY, G.; SREEKUMAR, C.; VANNA, M. C. B.; SHEN, S. K.; KWOK, C. H.; SUMNERS, J.A.; DEMARAIS, S.; HUMPHREYS, J. G.; LEHMANN, T. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p.67-71, 2004a.
- DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; JONES, J. L.; HIGHTOWER, A. W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M. C. B.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; GAMBLE, H. R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1082-1093, 2005d.
- DUBEY, J. P.; HOOVER, E. A.; WALLS, K. W. Effects of age and sex the acquisition of immunity to toxoplasmosis in cats. **The Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p.184-186, 1977.
- DUBEY, J. P.; KARHEMERE, S.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; DIABATE, A.; DABIRE, K. R.; VIANNA, M. C.; KWOK, O. C.; LEHMANN, T. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 69-72, 2005e.
- DUBEY, J. P.; LENHART, A.; CASTILHO, C. E.; ALVAREZ, L.; MARCET, P.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in chickens from Venezuela: isolation, tissue distribution, and molecular characterization. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1332-1334, 2005f.

- DUBEY, J. P.; LEVY, M. Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; DAH, E.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1015-1018, 2004b.
- DUBEY, J. P.; LOPEZ, B.; ALVAREZ, M.; MENDOZA, C.; LEHMANN, T. Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Guatemala. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 955-957, 2005g.
- DUBEY, J. P.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1335-1339, 2005.
- DUBEY, J. P.; MORALES, E. S.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 411-413, 2004.
- DUBEY, J. P.; MURREL, K. D.; FAYER, R. Persistence of encysted *T. gondii* in tissues of pigs fed oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.10, p.1941-3, 1984.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDENCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* from free range chickens from Paraná, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229-234, 2003d.
- DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; KAWABATA, H. H.; VIANNA, M. C. B.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 721-726, 2004c.
- DUBEY, J. P.; PARNELL, P. G.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. A. B.; DE YOUNG, R. E.; DAHL, E.; LEHMANN, T. Biologic and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from striped skunk (*Mephitis mephitis*), Canada goose (*Branta canadensis*), black-winged lory (*Eos cyanogenia*), and cats (*Felis catus*). **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 5, p. 1171-1174, 2004d.
- DUBEY, J. P.; PATITUCCI, A. N.; SU, C.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-ranging chickens from Chile, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n.1-2, p. 76-82, 2006g.
- DUBEY, J. P.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; EKANAYAKE, D. K.; SREEKUMAR, C.; LEHMANN, T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens from Sri Lanka. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1480-1482, 2005h.
- DUBEY, J. P.; SALANT, H.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; VIANNA, M. C.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; SPIRA, D.; HAMBURGER, J.; LEHMANN, T. V. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 317-322, 2004e.

- DUBEY, J. P.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; THULLIEZ, P. Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. **Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 9-14, 1997.
- DUBEY, J. P.; STORANDT, S. T.; KWOK, O. C.; THULLIEZ, P.; KAZACOS, K. R. *Toxoplasma gondii* antibodies in naturally exposed wild coyotes, red foxes, and gray foxes and serologic diagnosis of toxoplasmosis in red foxes fed *T. gondii* oocysts and tissue cysts. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 240-243, 1999.
- DUBEY, J. P.; SU, C.; CORTÉS, J. A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J. E.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; LORA, F.; JIMENEZ, J.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 41-47, 2006c.
- DUBEY, J. P.; SU, C.; OLIVEIRA, J.; MORALES, J. A.; BOLAÑOS, R. V.; SUNDAR, N.; KWOK, O. C. H.; SHEN, S. K. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-ranging chickens from Costa Rica, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 29-36, 2006d.
- DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N. C.; LUNA, L. A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J. B.; KWOK, O. V. H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* Isolates in free-ranging chickens from Nicaragua, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1-2, p. 47-53, 2006e.
- DUBEY, J. P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S. M.; MINERVINO, A. H. H.; FARIAS, N. A.R.; RUAS, J. L.; DOS 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 state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 182-188, 2007a.
- DUBEY, J. P.; TOWLE, A. **Toxoplasmosis in sheep**. St Albans, UK: Commonwealth Institute of Parasitology, 1986. p. 11.
- DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal Parasitology**, v. 89, n. 5, p. 1063-1064, 2003e.
- DUBEY, J. P.; VIANNA, M. C. B.; SOUSA, S.; CANADA, N.; MEIRELES, S.; CORREIA DA COSTA, J. M.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T.; DARDÉ, M. L.; THULLIEZ, P. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-ranging chickens from Portugal. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 184-186, 2006f.
- ESCOBAR, A.; GONZÁLEZ-JIMENEZ, E. Estudio de la competencia alimenticia de los herbívoros mayores del llano inundable con especial al chigüire (*Hydrochoerus Hydrochaeris*). **Agronomia Tropical**, n. 26, p. 215-227, 1976.

FARREL, R.L.; DOCTON, F.L.; CHAMBERLAIN, D.M. Toxoplasmosis I. toxoplasma isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.13, n.46, p.181-5, 1952.

FERRAZ, K. M. P. M. B.; LECHEVALIER, M.; DO COUTO, H. T. Z.; VERDADE, L. M. Damage caused by capybaras in a corn field. **Scientia Agrícola**, v. 60, n. 1, p. 191-194, 2003.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A.; CARNEIRO, A. C. A. V.; BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N. Genetic variability of brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeated anchored-PCR (SSR-PCR). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, p. 131-142, 2004.

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, p. 23-31, 2006.

FOWLER, M. E. (Ed.) **Zoo & wild animal medicine**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1986.

FRANTI, C. E.; RIEMANN, H. P.; BEHYMER, D. E.; SUTHER, D.; HOWARTH, J. A.; RUPPANNER, R. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild and domestic animals in northern California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 9, p. 901-906, 1976.

FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 233-248, 1990.

FRENKEL, J. K.; HASSANEIN, K. M.; HASSANEIN, R. S.; BROWN, E.; THULLIEZ, P.; QUINTERO-NUNEZ, R. Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 5, p. 458-468, 1995.

FUENTES, I.; RUBIO, J. M.; RAMÍREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1566-1570, 2001.

GALLEGO, C.; SAAVEDRA-MATIZ, C.; GÓMEZ-MARIN, J. E. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). **Acta Tropica**, v. 97, n. 2, p. 161-167, 2006.

GATTÁS, V. L.; NUNES, E. M.; SOARES, A. L. B.; PIRES, M. A.; PINTO, P. L. S.; ANDRADE JR., H. F. Acute toxoplasmosis outbreak at Campus of the University of São Paulo related to food or water oocyst contamination. In, INTERNATIONAL CONFERENCE ON EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 2000, Atlanta, Georgia, USA. p. 135.

GENNARI, S. M.; CAÑON-FRANCO, W. A.; YAI, L. E. O.; DE SOUZA, S. L. P.; SANTOS, L. C.; FARIAS, N. A. R.; RUAS, J.; ROSSI, F. W.; GOMES, A. A. B.

- Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies from wild canids Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 337-340, 2004.
- GOMES, A. C.; COUTINHO, S. G.; PAIM, G. V.; OLIVEIRA, S. M. O.; GALANTI, E. A. B.; NUNES, M. P.; CAPINZAIKI, A. N.; YAMAMOTO, Y. I.; ROTTER, P. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 2, p. 105-115, 1990.
- GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y. BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two ancestries. **Science**, v. 294, p. 161-165, 2001a.
- GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 398-400, 2001.
- GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical estains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 284, n. 5, p. 633-639, 2001b.
- GRIGG, M. E.; SUZUKI, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. **Microbes and Infections**, v. 5, p. 685-690, 2003.
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.
- HILL, R. E.; ZIMMERMAN, J. J.; WILLS, R. W.; PATTON, S.; CLARK, W. Seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in free-ranging mammals in Iowa. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 4, p. 811-815, 1998.
- HOFFMANN, R. P.; FORTES, E.; GUTIERRES, V. C.; EBERHARD, A. S. Ocorrência de helmintos em capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre**, v. 14, p. 71-75, 1986.
- HONNOLD, S. P.; BRAUN, R.; SCOTT, D. P.; SREEKUMAR, C.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in a 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.
- HOWE, D. K.; SUMMERS, B. C.; SIBLEY, D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5193-5198, 1996.

- INNES, E. A. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p.131-138, 1997.
- 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.
- KAUFMAN, H. E.; REMINGTON, J. S.; JACOBS, L. Toxoplasmosis : the nature of virulence. **American Journal of Ophthalmology**, v. 46, n. 5, p. 255-261, 1958.
- KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A. L.; RIZZO, L. V.; BELFOR JR., T. R.; VITOR, R. W.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L. D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.
- KHAN, A.; TAYLOR, S.; CHUNLEI, S.; AARON, J. M.; BOYLE, J.; COLE, R.; GLOVER, D.; TANG, K.; OAULSEN, I. T.; BERRIMAN, M.; BOOTHROYD, J. C.; PFEFFERKORN, DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; ROOS, D. S.; WOOTTON, J. C.; SIBLEY, L. D. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 2980-2992, 2005.
- KREUDER, K.; MILLER, M. A.; JESSUP, D. A.; LOWENSTINE, L. J.; HARRIS, M. D.; AMES, J. A.; CARPENTER, T. E.; CONRAD, P. A.; MAZET, J. K. Recent patterns of mortalidade in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Wildlife Diseases**, n. 39, n. 3, p. 495-509, 2003.
- LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.
- LEHMANN, T.; GRAHAN, 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.
- LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAN, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, p. 37-58, 1980.
- LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. **Veterinary Parasitology**, v.103, n. 4, p. 309-313, 2002.

- LITERÁK, I.; RYCHLÍK, I.; SVOBODOVÁ, V.; POSPÍŠIL, Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of Czech *Toxoplasma gondii* strains. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1367-1374, 1998.
- LÜDER, C. G. K.; GROSS, U. Toxoplasmosis: from clinics to basic science. **Parasitology Today**, v. 14, n. 2, p. 43-45, 1998.
- LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 211-222, 1992.
- MACDONALD, D. W. Dwindling resources and the social behavior of capybaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) (Mammalia). **Journal of Zoology**, v. 194, p. 371-391, 1981.
- MARSHALL, P. A.; HUGHES, J. M.; WILLIAMS, R. H.; SMITH, J. E.; MURPHY, R. G. Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. **Parasitology**, n. 128, p. 39-42, 2004.
- MAYNARD SMITH, J.; SMITH, N. H.; O'ROURKE, M.; SPRATT, B. G. How clonal are bacteria. **Proceedings on the National Academic Sciences**, v. 90, p. 4384-4388, 1993.
- MILLER, M. A.; GRIGG, M. E.; KREUDER, C.; JAMES, E. R.; MELLI, A. C.; CROSBIC, P. R.; JESSUP, D. A.; BOOTHROYD, J. C.; BROWNSTEIN, D.; CONRAD, P. A. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is cause of mortality. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 275-284, 2004.
- MONDRAGON, R.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; SIBLEY, L. D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 639-641, 1998.
- MOREIRA, J. R.; MACDONALD, D. W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazonia. In: VALLADARES-PADUA, C.; BODMER, R. E.; CULLEN JR., L. (Ed.). **Manejo e conservação de vida silvestre no Brasil**. Belém do PA.: Sociedade Civil Mamirauá, 1997. p. 186-213.
- MOREIRA, J. R.; MACDONALD, D. W. The population ecology of capybaras (*Hydrochaeris Hydrochaeris*) and their management for conservation in Brazilian Amazonia. In: MAYO, S.; ZAPPI, D. C. (Ed.). **Biodiversity and environment; brazilian themes for the future**. Londres: The Linnean Society of London & The Royal Botanic Gardens, 1993. p. 26-27.
- MORSY, T. A.; SABRY, A. H.; HABIB, K. S.; ARAFA, M. A.; BAHRAWY, A. F.; DAKHIL, M. M. Antibodies against toxoplasma in commensal rodents trapped in Riyadh region, Saudi Arabia. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 279-284, 1994.
- MUÑOZ, K.; CHÁVEZ, A. *Trypanosoma evansi* isolated from capybara (*Hydrochaeris Hydrochaeris*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 945-946, 2001.

NASCIMENTO, A. A.; BONUTI, M. R.; TEBALDI, J. H.; MAPELI, E. B.; ARANTES, J. G. Natural infectious with filarioidea nematodes in *Hydrochoerus Hydrochaeris* in the floodplain of Mato Grosso do sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n.2, p. 105-108, 2000.

OJASTI, J. **Estudio biológico del chigüire o capibara**. Caracas: Ed. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuárias, 1973. 257 p.

OJASTI, J. Human exploitation of capybara. In: ROBINSON, J. G.; REDFORD, K. H. (Ed.). **Neotropical wildlife use and conservation**. Chicago: The university of Chicago press, 1991. p. 236-252.

OKSANEN, A.; ASBAKK, K.; NIEMINEN, M.; NORBERG, H.; NÄREAHO, A. Antibodies against *Toxoplasma gondii* in fennoscandian reindeer – association with the degree of domestication. **Parasitology International**, v. 46, n. 4, p. 255-261, 1997.

OLIVEIRA, F. C. R.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 621-626, 2001.

OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 382-384, 1999.

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

PARMLEY, S. F.; GROSS, U.; SUCHARCZUK, A.; WINDECK, T.; SGARLATO, G. D.; REMINGTON, J. S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 2, p. 293-301, 1994.

PENA, H. F.J.; 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, J. N.; MCEVAN, D.; FINLEY, E. The structure of the skin of the capybara. *Acta Científica Venezolana*, v. 31, p. 361-364, 1980.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K. *Toxoplasma gondii* in Costa Rican cats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 6, p. 1150-1160, 1980.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interations with tha infected host. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 476-481, 2005.

SALATA, E.; YOSHIDA, E. L. A.; PEREIRA, E. A.; CORRÊA, F. M. A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 20-22, 1985.

- SANTOS, C. B. A.; CARVALHO, A. C. F. B.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; YAI, L. E. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from fattening pigs from São Paulo State, Brazil **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 3-4, p. 209-217, 2005.
- SCHALLER, G. B. Mammals and their biomass on a brazilian ranch. **Arquivos de Zoologia**, v. 31, n. 1, p. 1-36, 1983.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, London, v. 359, n. 1, p. 82-85, 1992.
- SIBLEY, L. D.; HOWE, D. K.; WAN, K. L.; KHAN, S.; ASLETT, M. A.; AJIOKA, J. W. *Toxoplasma* as a model genetic system. In: SMITH, D. F.; PARSONS, M. (Ed.). **Molecular Biology of Parasitic Protozoa**. Oxford: Oxford University Press. 1995. p. 55-74.
- SILVA, A. V.; MENDONÇA, A. O.; PEZERICO, S. B.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 60, n. 1/2, p. 65-68, 2005.
- SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; DE LIMA, V. Y.; D'ARC MORETTI, L.; PINHEIRO, J. P.; TANAKA, E. M.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains isolated from dogs with neurological signs. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 23-27, 2005.
- SILVA, J. C. R. **Soroprevalência e fatores de risco associados à presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em felídeos neotropicais do Brasil mantidos em cativeiro**. 2001. 61 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.
- SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in wild mammals of Missouri and east central Kansas: biologic and ecologic considerations of transmission. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 1, p. 15-21, 1995.
- SMITH, K. E.; ZIMMERMAN, J. J.; PATTON, S.; BERAN, G. W.; HILL, H. The epidemiology of toxoplasmosis on Iowa swine farms with an emphasis on the roles of free-living mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 42, p. 119-221, 1992.
- SOUSA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; COOREIA DA COSTA, J. M.; DARDÉ, M. L.; THULLIEZ, P.; DUBEY, J. P. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 133-136, 2005.
- SOUZA, S. L. P.; MARVULO, M. F. V.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; JACOMO, A. T. A.; SILVEIRA, L.; FERRO, C.; RAGOZO, A. M. A.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M.; SILVA, J. C. R. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mamíferos silvestres do Parque Nacional de Emas, GO. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTISIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto. p. 311.

SREEKUMAR, C.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; LEHMANN, T.; RAMAN, M.; BHALERAO, D. P.; VIANNA, M. C. B.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3-4, p. 187-194, 2003.

SU, C.; EVANS, D.; COLE, R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003.

SU, C.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10753-10758, 2002.

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.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 137-142, 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.

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

THOISY, B.; DEMAR, M.; AZNAR, C.; CARME, B. Ecologic correlates of *Toxoplasma gondii* exposure in free-ranging neotropical mammals. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 2, p. 456-459, 2003.

TIBAYRENC, M. Toward an integrated genetic epidemiology of parasitic protozoa and other pathogens. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 449-477, 1999.

TINTI, M.; POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; BARCA, S.; SPANO, F. Analysis of the *SAG5* locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, n. 33, n. 14, p. 1605-1616, 2003.

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT JR., R.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDÉ, M. L.; PINON, J. M.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 160-162, 2004.

WALLACE, G. D.; ZIGAS, V.; GAJDUSEK, D. C. Toxoplasmosis and cats in New Guinea. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, p. 8-13, 1974.

WEBSTER, J. P. Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, n. 108, p. 407-411, 1994.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 853-862, 1994.

WYSS, A. R.; FLYNN, J. J.; NORELL, M. A.; SWISHER, C. C.; CHARRIER, R.; NOVACEK, M. J.; MCKENNA, M. C. South America's earliest rodent and recognition of a new interval of mammalian evolution. **Nature**, v.365, p. 434-437, 1993.

YAI, L. E. O.; CAÑON-FRANCO, W. A.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E. L.; CAMARGO, M. C. G. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the south American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 870-871, 2003.

ZHANG, S. Y.; WEI, M. X.; ZHOU, Z. Y.; YU, J. Y.; SHI, X. Q. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the sera of rare wildlife in the Shangai zoological garden, People's Republic of China. **Parasitology international**, v. 49, p. 171-174, 2000.

ZHANG, SHU-YI; JIANG, S. F.; HE, Y. Y.; PAN, C. E.; ZHU, M.; WEI, M. X. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in field mice, *Microtus fortis*, from Yuanjiang, Hunan Province, People's Republic of China. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 437-438, 2004.

Apêndice

APÊNDICE A – Relação das capivaras, com as respectivas procedências, sexo, idade e os resultados obtidos (Sorologia, Isolamento e genotipagem). São Paulo, 2006

(Continua)

| Município | Nº da capivara | Sexo | Idade | Título de Anticorpos | Bioensaio em camundongos | Isolamento de <i>T. gondii</i> | Genótipo | |
|---------------|----------------|-------|--------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|----------|------------------|
| | | | | | | | Isolado | Amostra primária |
| | 44 | Fêmea | Adulto | 200 | Sim | Sim | III | III |
| | 45 | Macho | Adulto | 50 | Sim | Sim | III | NA |
| | 46 | Fêmea | Adulto | 800 | Sim | Sim | I | I |
| | 47 | Macho | Adulto | 100 | Sim | Sim | III | III |
| | 48 | Fêmea | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| Andradina | 49 | Fêmea | Adulto | 25 | Sim | Sim | III | III |
| | 50 | Macho | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 51 | Fêmea | Adulto | 200 | Sim | Sim | III | III |
| | 52 | Fêmea | Adulto | 25 | Sim | NI | NR | NR |
| | 53 | Fêmea | Adulto | 50 | Sim | Sim | III | NA |
| | 11 | Macho | Adulto | 200 | Sim | Sim | I | I |
| | 12 | Macho | Adulto | 400 | Sim | Sim | I | I |
| | 13 | Macho | Adulto | 100 | Sim | Sim | III | NA |
| | 14 | Macho | Adulto | 200 | Sim | Sim | I | NA |
| Cordeirópolis | 15 | Fêmea | Adulto | 400 | Sim | Sim | I | I |
| | 16 | Macho | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | NA |
| | 17 | Fêmea | Adulto | 100 | Sim | Sim | I | I |
| | 18 | Fêmea | Adulto | 200 | Sim | Sim | I | NA |
| | 19 | Macho | Adulto | 400 | Sim | Sim | I | NA |

(Continuação)

| Município | Nº da capivara | Sexo | Idade | Título de Anticorpos | Bioensaio em camundongos | Isolamento de <i>T. gondii</i> | Genótipo | |
|-----------|----------------|-------|--------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|----------|------------------|
| | | | | | | | Isolado | Amostra primária |
| | | | | | | | | |
| | 54 | Fêmea | Jovem | 25 | NR | NR | NR | NR |
| | 55 | Fêmea | Adulto | 800 | Sim | NI | NR | NR |
| | 56 | Fêmea | Jovem | 50 | NR | NR | NR | NR |
| | 57 | Fêmea | Jovem | 800 | Sim | Sim | III | NA |
| | 58 | Fêmea | Adulto | 400 | Sim | Sim | III | III |
| | 59 | Fêmea | Jovem | 100 | NR | NR | NR | NR |
| Cosmorama | 60 | Fêmea | Jovem | 100 | NR | NR | NR | NR |
| | 61 | Fêmea | Jovem | 100 | NR | NR | NR | NR |
| | 62 | Macho | Jovem | 400 | Sim | Sim | I | NA |
| | 63 | Fêmea | Adulto | 100 | NR | NR | NR | NR |
| | 64 | Macho | Jovem | 100 | NR | NR | NR | NR |
| | 65 | Fêmea | Jovem | 200 | Sim | Sim | III | NA |
| | 66 | Macho | Adulto | 50 | NR | NR | NR | NR |
| | 67 | Fêmea | Jovem | 200 | Sim | Sim | I | I |
| | 68 | Fêmea | Adulto | 200 | Sim | Sim | I | I |
| | 20 | Fêmea | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | I |
| | 21 | Macho | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 22 | Macho | Jovem | 25 | Sim | NI | NR | NR |
| | 23 | Macho | Jovem | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 24 | Fêmea | Jovem | negativo | NR | NR | NR | NR |

(Continuação)

| Município | Nº da capivara | Sexo | Idade | Título de Anticorpos | Bioensaio em camundongos | Isolamento de <i>T. gondii</i> | Genótipo | |
|----------------|----------------|-------|--------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|----------|------------------|
| | | | | | | | Isolado | Amostra primária |
| | 25 | Fêmea | Jovem | negativo | NR | NR | NR | NR |
| Ribeirão Preto | 26 | Fêmea | Jovem | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 27 | Fêmea | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 28 | Fêmea | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 29 | Fêmea | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 30 | Macho | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 31 | Macho | Jovem | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 32 | Macho | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | I |
| | 1 | Fêmea | Jovem | 100 | Sim | Sim | I | NA |
| | 2 | Fêmea | Jovem | 100 | NR | NR | NR | NR |
| | 3 | Fêmea | Jovem | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 4 | Macho | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 5 | Macho | Adulto | 800 | Sim | Sim | I | I |
| | 6 | Fêmea | Jovem | 200 | Sim | Sim | III | III |
| São Paulo | 7 | Macho | Jovem | 100 | Sim | Sim | I + III | I + III |
| | 8 | Macho | Jovem | 100 | NR | NR | NR | NR |
| | 9 | Macho | Jovem | 200 | NR | NR | NR | NR |
| | 10 | Macho | Jovem | 200 | Sim | NI | NR | NR |
| | 33 | Macho | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | NA |
| | 41 | Macho | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |

(Conclusão)

| Município | Nº da capivara | Sexo | Idade | Título de Anticorpos | Bioensaio em camundongos | Isolamento de <i>T. gondii</i> | Genótipo | |
|------------|----------------|-------|--------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|----------|------------------|
| | | | | | | | Isolado | Amostra primária |
| | | | | | | | | |
| | 42 | Macho | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | I |
| | 43 | Macho | Adulto | 50 | Sim | Sim | III | NA |
| | 34 | Fêmea | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 35 | Fêmea | Adulto | negativo | NR | NR | NR | NR |
| | 36 | Fêmea | Adulto | 100 | Sim | Sim | I | NA |
| Valparaíso | 37 | Fêmea | Adulto | 50 | Sim | Sim | III | III |
| | 38 | Macho | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | I + III |
| | 39 | Fêmea | Adulto | 25 | Sim | Sim | I | I |
| | 40 | Macho | Adulto | 50 | Sim | Sim | III | III |

NR - Não realizado

NI - Não houve isolamento

NA - Não houve amplificação de DNA de *T. gondii*