

Contaminação ambiental por oocistos de *Toxoplasma gondii* e
toxoplasmose de veiculação hídrica sob a perspectiva da
vulnerabilidade de aquíferos

Flávia Pereira Vieira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

2015

Contaminação ambiental por oocistos de *Toxoplasma gondii* e
toxoplasmose de veiculação hídrica sob a perspectiva da
vulnerabilidade de aquíferos

Flávia Pereira Vieira

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Biociências em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira

Coorientador: Dr. Chunlei Su

Coorientadora: Dra. Dolores Hill

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
Campos dos Goytacazes, RJ

2015

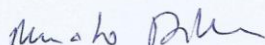
Contaminação ambiental por oocistos de *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose de veiculação hídrica sob a perspectiva da vulnerabilidade de aquíferos

Flávia Pereira Vieira

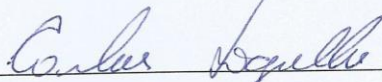
Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências em Biotecnologia.

Aprovada em 17 de novembro de 2015.

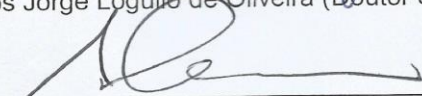
Comissão Examinadora:



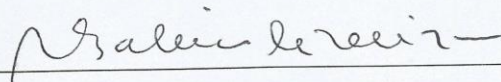
Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências Biológicas) – UENF



Carlos Jorge Logullo de Oliveira (Doutor em Química Biológica) – UENF



Gerson Cardoso da Silva Júnior (Doutor em Hidrogeologia) – UFRJ



Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira (Doutora em Bioquímica e Imunologia) - UFRJ
Polo Macaé (Orientadora)

Dedico este trabalho aos meus pais, Osiel e Dilma que mesmo com todas as dificuldades e limitações, não pouparam esforços para me educar e oferecer as condições necessárias para que eu sempre tivesse o melhor.

E aos meus irmãos Gisele e Neto por serem a minha força nos momentos de incerteza e desamino.

*“Quando tudo nos parece dar errado
Acontecem coisas boas
Que não teriam acontecido
Se tudo tivesse dado certo”.*

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Agradecer é valorizar a credibilidade do outro em nós, por estar contribuindo com o nosso crescimento, nas diferentes fases de nossas vidas. Crescer é doloroso. E comigo não seria diferente. Na trajetória de elaboração desta tese, houve momentos em que o sofrimento foi mais intenso, emergiram sentimentos de incerteza e insegurança, sendo necessária uma introspecção e reflexão. Em outros momentos manifestaram-se prazer e satisfação. Ao escrever estes agradecimentos tenho a oportunidade de rapidamente lembrar todo o processo pelo o qual passei e externar o reconhecimento de que esta tese não resulta apenas de um esforço individual, mas nasce de significativas contribuições.

Assim, começo agradecendo à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela infraestrutura e oportunidade de realização do curso. Ao longo destes quase 12 anos de UENF só tenho a agradecer por todos os momentos vividos nesta universidade, pelas amizades e pelos conhecimentos adquiridos. Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante todos estes anos. Muito obrigada pela confiança sempre depositada em mim, pelo conhecimento transmitido e pelos inúmeros ensinamentos. Muito obrigada por tudo, sempre lhe serei grata.

Aos amigos de laboratório Alba, Bianca, Liliani, Livia, Rebeka, Rhônia, Ricardo e Maycon. Agradeço, pelo convívio diário, alegrias e tristezas compartilhadas e pelo agradável ambiente de trabalho. Especialmente, agradeço à Bianca e Livia por compartilharem comigo todos os sucessos e insucessos sendo sempre apoio certo. Tenham a certeza que a minha caminhada seria muito mais difícil sem vocês ao meu lado; ao Maycon e à Liliani pela amizade, pelas longas conversas e por toda ajuda dispensada neste trabalho, especialmente com o processamento das amostras e com o bioensaio em camundongos, saiba que sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido; à Bianca, Liliani e Rebeka pelo cuidado

com as minhas amostras e por todo esforço e boa vontade que tiveram para que eu as recebesse nos Estados Unidos.

À amiga Juliana Azevedo por todas as conversas, conselhos, pela paciência em me ouvir por tantas vezes e por ter a palavra certa na hora certa. Serei eternamente grata a você Juju por fazer-me ir além daquilo que julguei que seria capaz. Esta tese também é sua.

À amiga e professora Alba Lucínia Peixoto Rangel por toda ajuda dispensada durante a elaboração desta tese, por todas as conversas e por todos os sensatos conselhos me dado durante este processo. Muito obrigada.

Ao professor Chunlei Su por ter me recebido tão gentilmente em seu laboratório, pela paciência e sabedoria com a qual transmite seus valiosos conhecimentos. Gostaria de agradecer também aos seus estudantes Keats Shwab, Pooja Saraf Dogra e Aldo Rivera-Sánchez.

Aos amigos Priscila Silva Franco, Luiz Daniel de Barros, Bruna Yassuhara, Shirley Mesquista e Lauren Michaels pela companhia, convivência e aprendizado. Vocês foram minha família em Knoxville.

À professora Dolores Hill por ter me recebido tão carinhosamente em seu laboratório, pela confiança deposita em mim, e por me fazer sentir tão à vontade em seu laboratório desde o primeiro dia. Aos técnicos Daiane Cooper, Valsin Fournet e Detiger Dunams por toda ajuda dispensada sempre que necessária e à Karissa Tauber e à Isamar Touro Silva pela companhia agradável no laboratório.

Ao Dr. Dubey e aos seus estudantes, Yurong Yang, Yuqing Ying, Rafael Calero, Shiv Verma por me receberem no laboratório. E especialmente à Ana Beatriz Cassinelli, pela companhia, amizade e por ser minha família em Maryland.

A todo pessoal do LBR, especialmente ao técnico Fernando Lopes, por toda ajuda dispensada e por sempre estar disposto a me ajudar.

A toda a equipe da Assessoria de Transporte da UENF (ASTRAN), especialmente Jorge Gióia, Ailton, Edwirges, Fernanda, Luís Carlos, bem como, todos os outros motoristas que realizaram saídas de campo comigo. Obrigada por terem entendido as minhas necessidades e urgências e sempre terem feito o possível para me atender. Saibam que parte importante do sucesso deste trabalho na coleta de amostras deve-se ao empenho de vocês.

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia e ao Pró-reitor de pós-graduação da UENF, por toda ajuda com a implementação da Bolsa de doutorado Sandwich.

Aos indivíduos que participaram deste estudo que abriram as portas de suas casas e nos receberam tão carinhosamente, sem a contribuição de vocês este trabalho não existiria.

À minha família e aos amigos pela paciência e amizade ao longo destes anos. Agradeço especialmente, aos meus irmãos Gisele e Neto pela amizade, pelas divertidas e agradáveis conversas, por todos os momentos familiares que vocês me proporcionaram, enfim, por tudo que vocês representam em minha vida, ao meu cunhado José Victor por sempre está disposto a ajudar e principalmente ao melhor presente de 2015, o nosso pequeno Heitor, que mesmo tão pequeno transmite tanto amor e paz e me fez perceber que como certas coisas são tão pequenas diante da grandiosidade da dádiva que é a vida.

À Marcela Santana Bastos Boechat por ter revisado esta tese com tanto critério e atenção.

Aos membros da banca Dr. Renato Augusto DaMatta, Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira e Gerson Cardoso da Silva Júnior por prontamente aceitarem da banca examinadora desta tese.

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida. Obrigada por me enviar anjos em forma de amigos.

Índice

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Histórico	4
3.2. O protozoário <i>Toxoplasma gondii</i>	5
3.3. Ciclo de vida do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i>	7
3.4. Transmissão e epidemiologia da toxoplasmose.....	10
3.5. Diagnóstico da toxoplasmose.....	13
3.6. Características genéticas do parasito <i>Toxoplasma gondii</i>	15
3.7. Toxoplasmose em frangos (<i>Gallus domesticus</i>) vivendo livremente.....	18
3.8. Grau de vulnerabilidade de aquíferos por porosidade intergranular e a sua relação com a prevalência da toxoplasmose.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Caracterização da área de estudo e amostragem.....	23
4.2. Indivíduos	25
4.3. Detecção de anticorpos IgG e IgM anti- <i>Toxoplasma gondii</i> no soro dos indivíduos por ELISA.....	26
4.4. Detecção de anticorpos IgG anti-TgERP <i>Toxoplasma</i> no soro dos indivíduos por ELISA	26
4.5. Aves peridomiciliares.....	26

4.6. Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> nos soros das aves peridomiciliares	27
4.7. Digestão péptica dos tecidos.....	28
4.8. Bioensaios em camundongos	29
4.9. Extração de DNA.....	30
4.10. PCR-RFLP para genotipificação	30
4.11. Análises estatísticas.....	33
5.0. RESULTADOS.....	35
5.1. Prevalência da toxoplasmose em humanos por meio de sorologia convencional em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos	35
5.2. Prevalência da toxoplasmose em humanos por meio da detecção de anticorpos IgG anti-TgERP em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos.	37
5.3. Soroprevalência de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em aves peridomiciliares.....	40
5.4. Obtenção de isolados viáveis de <i>Toxoplasma gondii</i> por bioensaio em camundongos	42
5.5. Caracterização genotípica dos isolados do parasito <i>Toxoplasma gondii</i> ..	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9. APÊNDICE	69
10. ANEXOS	73

RESUMO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular com ampla distribuição geográfica e alta prevalência sorológica mundial. Estima-se que um terço da população humana mundial esteja cronicamente infectada por *T. gondii*. Em Campos dos Goytacazes a toxoplasmose é endêmica e atinge principalmente a população de menor poder aquisitivo. A ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas e a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados de *T. gondii* consistem nas vias mais importantes de transmissão da toxoplasmose humana em termos epidemiológicos. No entanto, não é possível determinar a via de infecção (ooocistos ou cistos teciduais) por meio de testes sorológicos convencionais. Nesse sentido, este trabalho visa avaliar a contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* em Campos dos Goytacazes, por meio da utilização de método sorológico específico para esporozoítos do parasito (TgERP) e da caracterização genética de isolados de aves peridomiciliares em associação com o grau de vulnerabilidade de aquífero da região. A soroprevalência da toxoplasmose estimada na população de estudo pelo ELISA convencional foi de 65,9% e de 62,9% no ELISA específico para oocistos (ELISA TgERP). Estes resultados dimensionam a importância da transmissão por oocistos de *T. gondii* nessa região. Foram obtidos 23 isolados de *T. gondii* das aves pelo bioensaio em camundongos. A caracterização genotípica de *T. gondii* pela PCR/RFLP permitiu a identificação de 11 genótipos, sendo dois isolados novos, ainda não descritos. Prevalência mais elevada da toxoplasmose humana e animal foi observada nas áreas de alta e extrema vulnerabilidade de aquíferos. A correlação entre a vulnerabilidade de aquíferos e a prevalência da toxoplasmose animal e humana estimada pelo ELISA convencional e pelo ELISA anti- antígeno de esporozoítos aponta para a possibilidade de re-infecções e revela-se estratégia de valor para estudo de relação da infecção humana e animal *versus* contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, sorologia, hidrogeologia e geomedicina

ABSTRACT

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii*, is one of the most common parasitic infections of humans and other warm-blooded animals. It has been found worldwide, and nearly one-third of humanity has been exposed to the parasite. In Campos dos Goytacazes toxoplasmosis is endemic and affects mainly the lower income population. The ingestion of tissue cysts found in raw or undercooked meat and water intake or food contaminated with oocysts of *T. gondii* consist of the most important routes of transmission of human toxoplasmosis in epidemiological suits. However, there are no tests which can differentiate between oocyst (the stage excreted in cat feces) ingestion and tissue cyst (the stage found in meat) ingestion as the infection route. In this study, we evaluated the environmental contamination by *T. gondii* oocysts in Campos dos Goytacazes, through the use of specific serological method for sporozoites of the parasite (TgERP) and genetic characterization of isolates of free range-chickens in association with the degree of vulnerability of the aquifer the region. The seroprevalence of toxoplasmosis estimated in the population studied by conventional ELISA was 65.9 % and 62.9 % in the specific ELISA oocysts (ELISA TgERP) demonstrating the importance of transmission of *T. gondii* oocysts that region. Twenty three isolates were obtained from *T. gondii* chickens by bioassay in mice. Genotypic characterization of *T gondii* by PCR/ RFLP analysis allowed the identification of 11 genotypes, two new isolates not been described. Higher prevalence of human and animal toxoplasmosis was observed in the areas of high and extreme vulnerability of aquifers. The correlation between the vulnerability of aquifers and the prevalence of animal and human toxoplasmosis estimated by conventional ELISA and ELISA for anti- sporozoite antigen is new points to the possibility of re- infections and proves value strategy to study relationship of infection human and animal versus contamination with oocysts of *T. gondii*.

Key words: *Toxoplasma gondii*, sorology, hydrogeology and geomedicine

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo completo do protozoário *Toxoplasma gondii*. Extraído e modificado de (HUNTER; SIBLEY, 2012; FERGUSON, 2002). 10
- Figura 2:** Mapa simplificado da soroprevalência global da infecção por *Toxoplasma gondii*. Código de cores: vermelho escuro: > 60%; vermelho: 40 - 60%; amarelo: 20 - 40%; azul: 10 - 20%; verde: < 10%; cinza: dados não disponíveis. Extraído de MAENZ, et al., 2014. 13
- Figura 3:** Distribuição geográfica dos genótipos de *Toxoplasma gondii*. Os pontos pretos indicam os locais de onde foram obtidos isolados de *T. gondii* e genotipados usando o método de PCR -RFLP. Os números em torno das bordas do gráfico de torta mostram os genótipos ToxoDB PCR- RFLP. O tamanho do gráfico de pizza correlaciona-se com o número total de isolados (n), e as cores indicam os diferentes genótipos. Extraído de SHWAB, et al., 2014..... 18
- Figura 4:** Mapa de vulnerabilidade de aquíferos do Município de Campos dos Goytacazes gerado de acordo com a metodologia DRASTIC (Laboratório de Engenharia Civil - UENF). As áreas amostradas no estudo estão destacadas no mapa: área 2: elipse em vermelho; área 3: círculo em preto; área 4: círculo em rosa; área 5: círculo em azul; área 6: círculo em verde e área 7 círculo em preto pontilhado.....24
- Figura 5:** Curvas de comparação da soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* por ELISA convencional e TgERP, de acordo com idade, avaliada em 557 indivíduos.39
- Figura 6:** Grau de reconhecimento antigênico no ELISA TgERP em relação a faixa etária da população de estudo (n= 254). Um valor de densidade óptica (OD) maior do que 1 foi estabelecido arbitrariamente (ver material e método).....40
- Figura 7:** Prevalência da toxoplasmose em aves peridomiciliares considerando o grau de vulnerabilidade de aquíferos da região. As cores na figura representam a soroprevalência em função ao grau de vulnerabilidade e correspondem as cores mostradas no mapa da Figura 4: verde para moderada, laranja claro para alta e laranja escuro para extrema vulnerabilidade.....42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos indivíduos sujeitos da pesquisa por área, grau de vulnerabilidade e faixa etária.....	25
Tabela 2: Distribuição das aves avaliadas no estudo por área e grau de vulnerabilidade.	27
Tabela 3: Resumo dos primers para marcadores da multilocus PCR-RFLP.	31
Tabela 4: Amostras de referência de <i>Toxoplasma gondii</i> utilizadas como controles positivos na reação multilocus PCR-RFLP.....	33
Tabela 5: Prevalência da toxoplasmose por meio de sorologia convencional em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos. Os valores com significância estatística estão em negrito.	36
Tabela 6: Comparação qualitativa dos resultados da sorologia para toxoplasmose do ELISA convencional e TgERP em soro humano.	37
Tabela 7: Prevalência da toxoplasmose por meio de ELISA utilizando antígeno específico de esporozoítio (TgERP) em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos. Os valores com significância estatística estão em negrito.	38
Tabela 8: Soroprevalência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em soro de aves peridomiciliares em Campos dos Goytacazes.	41
Tabela 9: Soroprevalência da toxoplasmose em soro de frangos em relação ao grau de vulnerabilidade de aquíferos. Os valores com significância estatística encontram-se em negrito.....	41
Tabela 10: Frequências absoluta e relativa dos títulos de anticorpos das aves com sorologia positiva no MAT que tiveram seus órgãos (cérebro e coração) inoculados em camundongos.....	43
Tabela 11: Caracterização genética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> para os 11 marcadores.	44

Tabela 12: Distribuição dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> nas cinco áreas de estudo.	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Afl	<i>Anabaena flos-aquae</i>
Ava	<i>Anabaena variabilis</i>
BcoD	<i>Bacteroides coprocola</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BsiE	<i>Bacillus species</i>
BsmA	<i>Bacillus stearothermophilus</i> A664
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
CONEP	Comissão Nacional de Ética e Pesquisa
Dde	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático de fase sólida
Hae	<i>Haemophilus aegypticus</i>
HCl	Ácido clorídrico
Hha	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
Hinf	<i>Haemophilus influenzae</i> Rf
HpyCH4	<i>Helicobacter pylori</i> CH4
IC	Intervalo de confiança
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E

IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
Kb	Quilobase
MAT	Teste de aglutinação modificado
Mb	Megabase
Mbo	<i>Moraxella bovis</i>
Min	Minuto (s)
Mse	<i>Micrococcus species</i>
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monobásico anidro
NaN₃	Azida sódica
Nci	<i>Neisseria cinerea</i>
Nla	<i>Neisseria lactamica</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
P.I	Pós-inoculação
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição
Rsa	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>

Sau	<i>Staphylococcus aureus</i>
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TgERP	Proteína de <i>Toxoplasma gondii</i> relacionada à embriogênese
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
v/v	Volume/volume

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é causada pelo parasito *Toxoplasma gondii*, um coccídio intracelular obrigatório, pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa (Levine, 1970), classe Sporozoasida (Leukart, 1879), subclasse Coccidiasina (Leukart, 1879), ordem Eimeriorina (Leger, 1911), família Toxoplasmatidae (Bioca, 1956), gênero *Toxoplasma* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909) e espécie (única) *gondii* (ALEXANDER; HUNTER, 1998; DUBEY, 2010a). Este protozoário é amplamente distribuído, podendo ser encontrado em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, nos mais diversos climas em diferentes continentes. Acredita-se, que um terço da população humana mundial apresenta-se infectada por este parasito. Em Campos dos Goytacazes a toxoplasmose é endêmica, apresentando prevalência de 57,2% de infectados. Considerando apenas a população de baixo poder aquisitivo, que recebe pouca atenção médica e sanitária, o nível de prevalência desta infecção atinge 84,8% (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Estudos prévios mostram que o ambiente desta região, principalmente solo (DA SILVA, et al., 2003) e água (NASCIMENTO, 2004), contém oocistos do parasita em níveis significativos.

A água é considerada importante veículo na transmissão da toxoplasmose humana e animal, visto que oocistos de *T. gondii* podem persistir por longos períodos de tempo no ambiente (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998) e são altamente resistentes a vários procedimentos de inativação (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Em levantamento epidemiológico realizado para toxoplasmose em Campos dos Goytacazes, a ingestão de água consistiu no principal fator de risco associado à baixa condição sócio-econômica. A ingestão de água de poço e de água não filtrada se constituiu em fator de risco para as populações de maior prevalência, sendo que 100% dos indivíduos que relataram ingerir água de rios, lagos e lagoas apresentaram-se como soropositivos para a toxoplasmose (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

A detecção de oocistos de *T. gondii* em amostras ambientais (solo, água e alimentos) é tecnicamente difícil, pois não há nenhum método rápido para a detecção dos mesmos em amostras ambientais. A maioria dos estudos, que obtiveram sucesso em isolar oocistos de *T. gondii* em água foi realizada em condições laboratoriais (água contaminada com elevado número de oocistos), que estão longe de serem aquelas encontradas em amostras ambientais (DUMÈTRE;

DARDÉ, 2007; KOURENTI et al., 2003; VILLENA et al., 2004). Na maioria das vezes, o nível de contaminação ambiental por oocisto de *T. gondii*, é inferido pela avaliação da prevalência da toxoplasmose em frangos vivendo livremente. Isso se deve ao fato destes animais serem considerados excelentes indicadores de contaminação do solo por oocistos de *T. gondii*, devido a seus hábitos alimentares. Assim, a prevalência da infecção por *T. gondii* em frangos está diretamente relacionada ao nível de contaminação ambiental do local. A detecção da infecção toxoplásmica humana causada pela ingestão de oocistos de *T. gondii* também é limitada, visto que os testes sorológicos atualmente disponíveis não permitem identificar a via de infecção (oocistos ou cistos teciduais) (HILL et al., 2011).

Nesse sentido, a identificação de testes sorológicos específicos para oocistos de *T. gondii* e a utilização de novas metodologias que permitam determinar respectivamente, a prevalência da infecção por meio da ingestão de oocistos e o nível de contaminação ambiental são cada vez mais necessários, especialmente em áreas endêmicas. Em face dessa necessidade e da alta endemicidade da toxoplasmose, novas perspectivas sobre o impacto da contaminação ambiental na transmissão hídrica da toxoplasmose para seres humanos surgiram. Neste sentido, este estudo busca a investigar a prevalência da toxoplasmose humana e animal em Campos dos Goytacazes, considerando a associação entre parâmetros hidrogeológicos, tais como a vulnerabilidade do aquífero na região, uma abordagem recente (VIEIRA, 2010), aliado a utilização de um teste sorológico específico para oocistos de *T. gondii*.

A utilização destas metodologias permite dimensionar a real importância da veiculação de oocistos de *T. gondii* em meios aquáticos e poderá ser reproduzida em outras áreas, contribuindo assim, para o desenvolvimento de estratégias que visem reduzir o risco da infecção por *T. gondii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Dimensionar a contribuição epidemiológica de cada um dos principais modos de infecção de *T. gondii* (oocistos *versus* cistos), por meio da utilização de método sorológico específico para esporozoítos (contidos nos oocistos) do parasito e da caracterização genética de isolados de aves peridomiciliares.

2.2. Objetivos específicos

- I. Estimar a soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* na população de Campos dos Goytacazes por meio de ELISA convencional e de ELISA utilizando antígeno recombinante específico de esporozoíto (TgERP);
- II. Isolar *T. gondii* de amostras oriundas de aves naturalmente infectadas com o protozoário por meio de bioensaio em camundongos;
- III. Caracterizar geneticamente os isolados por meio da técnica de multiplex multilocus PCR-RFLP.
- IV. Comprovar a associação entre a prevalência de indivíduos positivos no ELISA convencional, ELISA utilizando antígeno recombinante específico de esporozoíto (TgERP) e os isolados de aves peridomiciliares com a vulnerabilidade de aquíferos da região.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

Toxoplasma gondii foi descoberto simultaneamente em 1908 por Alfonso Splendore, no Brasil, ao observar um parasita sob formas livres e intracelulares, em diversos tecidos de coelho (SPLENDORE, 2009) e, por Nicolle e Manceaux, (2009) no Instituto Pasteur na Tunísia, ao isolarem um parasita de células mononucleares do fígado e do baço de um roedor norte africano, o *Ctenodactylus gundi*. Esses autores, inicialmente chamaram essa espécie de *Leishmania gondii*, por pensarem que o parasita isolado pertencia ao gênero *Leishmania* (NICOLLE; MANCEAUX, 2009). Após análise mais detalhada da morfologia do parasita, Nicolle sugeriu o nome *Toxoplasma* (do grego *toxon* - arco e *plasma* - vida) para o novo gênero e *gondii* devido a um erro de ortografia do hospedeiro original, *Ctenodactylus gundi* (FERGUSON, 2009; NICOLLE; MANCEAUX, 2009).

O primeiro caso de toxoplasmose reconhecido em seres humanos foi descrito em 1923 por Josef Janku na Tchecoslováquia. Ele descreveu a presença de cistos teciduais de *T. gondii* na retina de uma criança falecida aos 11 meses de idade com hidrocefalia e cegueira cuja necropsia em cortes do globo ocular direito evidenciou presença do parasita na retina (JANKŮ, 1923; JANKŮ, 1959) *apud* (WEISS; DUBEY, 2009). Pouco depois, em 1927, Torres no Rio de Janeiro descrevia a presença do microrganismo em cortes histológicos de musculatura cardíaca e esquelética e do cérebro de um recém-nascido, falecido com 29 dias de vida, iniciando especulações acerca da possibilidade da ocorrência da doença congênita (TORRES, 1927) *apud* (WEISS; DUBEY, 2009). Mas, o papel deste parasita como um patógeno humano só foi definitivamente elucidado em 1937 com a publicação do estudo conduzido por Wolf e Cowen ao descreverem um caso fatal de encefalite (WOLF; COWEN, 1937) *apud* (WEISS; DUBEY, 2009). A publicação deste trabalho estimulou novas pesquisas em torno da caracterização da toxoplasmose humana e, após cinco anos Sabin descreveu os aspectos clínicos e parasitológicos da toxoplasmose congênita (SABIN, 1942) *apud* (WEISS; DUBEY, 2009).

Sabin e Feldman (1948) desenvolveram o teste sorológico específico, o teste do corante de Sabin e Feldman ou “dye test”, possibilitando numerosas pesquisas a respeito dos aspectos epidemiológicos e clínicos da toxoplasmose (SABIN;

FELDMAN, 1948). Atualmente, “o dye test” é considerado o teste padrão ouro para a toxoplasmose. No final dos anos 40 e início dos anos 50 a infecção por *T. gondii* foi relacionada a doenças inflamatórias no olho (FRENKEL; JACOBS, 1958; WILDER, 1952). Essa descoberta levou à proposta de que muitos casos de retinocoroidite em adultos era devido à infecção por *T. gondii* (FELDMAN, 1953).

Apesar da caracterização da doença no homem e nos animais, as principais vias de contaminação por *T. gondii* permaneciam desconhecidas, já que a transmissão congênita ocorria muito raramente para explicar a disseminação da doença. Weiman e Chandler (1954) sugeriram que a transmissão poderia ocorrer por ingestão de carne crua ou mal cozida. Entretanto, esta hipótese não era suficientemente abrangente para explicar a infecção e sua transmissão em indivíduos estritamente vegetarianos e animais herbívoros (JACOBS, 1963). Este fato pode ser esclarecido quando formas resistentes (ocistos) de *T. gondii* foram encontradas em fezes de gato. Em 1970 o ciclo de vida de *T. gondii* foi elucidado com a descoberta da fase sexual do parasita no epitélio do intestino delgado do gato (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a). Esta descoberta foi fundamental para que se pudesse avançar em pesquisas epidemiológicas sobre o modo de transmissão da infecção ao homem (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970b).

O reconhecimento de *T. gondii* como um patógeno humano oportunista ficou evidente durante a década de 70, com o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e com a utilização de drogas imunossupressoras por indivíduos transplantados e no tratamento de certas doenças neoplásicas (COHEN, 1970; RUSKIN; REMINGTON, 1976).

Nos últimos anos foram produzidos trabalhos cada vez mais detalhados, sobre todos os aspectos da biologia do parasita e sua inter-relação com a célula hospedeira. Houve avanços na compreensão da resposta imune do hospedeiro a *T. gondii* e na biologia molecular do parasita.

3.2. O protozoário *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, de distribuição mundial, podendo ser encontrado em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, nos mais diversos climas e em diferentes continentes (DUBEY; BEATTIE, 1988). Este parasito é único entre os patógenos eucarióticos já descritos

devido a sua extraordinária capacidade de infectar uma enorme variedade de espécies de mamíferos e aves, invadindo os mais variados tipos celulares no organismo destes hospedeiros. Apesar da sua notória capacidade de infectar os mais diversos tipos de células eucarióticas e de sua ampla distribuição mundial, todos os isolados descritos até o momento pertencem a uma única espécie do gênero *Toxoplasma* (LEVINE, 1988).

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa representado por inúmeros protozoários patogênicos de relevância médica e veterinária, que apresentam como característica uma estrutura denominada complexo apical, importante, entre outras estruturas, para o mecanismo de adesão, invasão e desenvolvimento na célula hospedeira (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011). Este parasito, além de apresentar diversas estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, também apresenta características próprias do filo, como anéis polares, micronemas, róptrias e grânulos densos. O parasito apresenta três formas de vida:

1. Taquizoítos (do grego, *tachos* - rápido) - forma de proliferação rápida do parasito, produzida pelo ciclo assexuado em hospedeiros intermediários. Os taquizoítos estão presentes em grande número nas infecções agudas no interior das células infectadas, sendo responsáveis pela sintomatologia da toxoplasmose. O taquizoíto apresenta-se em forma de meia lua ou arco, com uma extremidade afilada e outra arredondada, medindo aproximadamente, 2 a 6 μm de largura e 2 a 8 μm de comprimento (SHEFFIELD; MELTON, 1970). Esta é a forma menos resistente do parasito, sendo facilmente destruída pelas condições ambientais adversas, pelo suco gástrico, pela desidratação ou variações osmóticas (NEVES, 1895).

2. Bradizoítos (do grego, *brady* - lento) - forma de proliferação lenta, medindo, aproximadamente, 5 - 8,5 x 1 - 3 μm (MEHLHORN; FRENKEL, 1980). Os bradizoítos estão presentes nas infecções congênitas e crônicas dentro dos cistos teciduais e, sua formação se dá no curso da resposta imune do hospedeiro ao taquizoíto (BARRAGAN; SIBLEY, 2003). Os cistos medem de 10 a 100 μm , podendo chegar a 300 μm com centenas de bradizoítos no seu interior. Os cistos são resistentes a mudanças de temperatura, permanecendo viáveis por semanas, mesmo quando refrigerados a temperaturas de 1 a 4°C e também sobrevivem ao congelamento a temperaturas de -1 a -8°C por um período de até uma semana,

(DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Entretanto, os cistos podem ser destruídos após congelamento a - 20°C ou aquecimento acima de 65°C, (KOTULA et al., 1991).

3. Esporozoítos (presentes nos oocistos) - forma mais resistente deste parasito, podendo sobreviver por longos períodos no meio ambiente, atuando como o principal contaminante ambiental (SLIFKO; SMITH; ROSE, 2000). Os oocistos não esporulados apresentam-se na forma subesférica para esférica e medem 10 a 12 µm de diâmetro. Os oocistos esporulados apresentam formas entre esféricas e elípticas com diâmetro de 11 a 13 µm (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998) contendo dois esporocistos elipisóides. Os esporocistos medem de 9 a 6 µm e possuem quatro esporozoítos no interior de cada esporocisto, (CHRISTIE; PAPPAS; DUBEY, 1978; FERGUSON et al., 1979), que medem de 6 a 8 µm de comprimento por 2 µm de largura. Os oocistos não esporulados perdem sua capacidade de esporular após congelamento por 24 horas a - 21°C ou sete dias a - 6°C e também quando aquecidos a 50°C por 10 min (DUBEY; MILLER; FRENKEL., 1970b; FRENKEL; DUBEY, 1973). A refrigeração a 4°C por 6 a 11 semanas não é suficiente para prevenir o desenvolvimento de oocistos infectivos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Os oocistos esporulados podem manter-se infectivos em água por pelo menos 54 meses a 4°C e, em solos experimentalmente infectados por 18 meses sob várias temperaturas (FRENKEL; RUIZ; CHINCHILLA, 1975). O congelamento pode não ser suficiente para destruir oocistos esporulados, e estes podem sobreviver por 28 dias após congelamento constante a -21°C (FRENKEL; DUBEY, 1973). Os oocistos são resistentes também a agentes químicos, como ácido sulfúrico a 2% ou dicromato de potássio 2,5% por vários anos a 4°C.

3.3. Ciclo de vida do protozoário *Toxoplasma gondii*

T. gondii apresenta um ciclo de vida complexo, heteroxeno facultativo que envolve vários estágios de desenvolvimento, uma gama de hospedeiros e ambientes. Durante o seu desenvolvimento há numerosas transições, tais como a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos, a conversão entre micro e macrogametas dentro do intestino de um hospedeiro definitivo, e a formação de esporozoítos dentro de um oocisto. Embora muitos vertebrados possam servir como hospedeiros intermediários (estágio haplóide), o desenvolvimento sexual é restrito

ao epitélio intestinal de felídeos, que eliminam no ambiente oocistos diplóides (DUBEY, 1977).

A fase sexuada se inicia pela ingestão por felídeos de bradizoítos, taquizoítos ou esporozoítos. O ciclo completo será descrito considerando a ingestão por felídeos de bradizoítos presentes nos cistos teciduais que é considerada a forma mais comum de infecção nos felídeos.

Após a ingestão de cistos teciduais por felídeos, a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas presentes no estômago e no intestino delgado e, os bradizoítos são liberados. Alguns bradizoítos penetram na lâmina própria do intestino e se multiplicam como taquizoítos, outros permanecem nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento de numerosas gerações de *T. gondii*, dando origem aos merozoítos (HUNTER; SIBLEY, 2012) (Figura 1). Cinco tipos assexuados (A - E) morfologicamente distintos de *T. gondii* se desenvolvem em células intestinais, antes do início do ciclo sexual (DUBEY; FRENKEL, 1972; SPEER; DUBEY, 2005).

A fase sexual se inicia dois dias após a ingestão de cistos teciduais por felídeos. A origem dos gamontes (células sexuais) não é conhecida, acredita-se que merozoítos liberados dos esquizontes tipos D e E iniciam a formação dos gametas, com alguns destes merozoítos se diferenciando em gametas femininos (macrogametas) ou masculinos (microgametas). A fusão dos gametas femininos com os gametas masculinos dá origem ao zigoto, que é envolto em uma rígida membrana cística e eliminado como um oocisto não esporulado, junto com as fezes dos felídeos. Estes oocistos liberados não são diretamente infectivos aos animais ou ao homem (SPEER; CLARK; DUBEY, 1998). O desenvolvimento da infectividade ocorre entre 1 - 21 dias sob temperatura adequada (11 - 25 °C) e condições favoráveis de aerobiose e de umidade (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a).

Na fase assexuada, o taquizoíto, forma de multiplicação rápida do parasito, tanto em células do hospedeiro intermediário, quanto em células epiteliais intestinais do hospedeiro definitivo, penetra nas células nucleadas do hospedeiro, forma um vacúolo parasitóforo e se multiplica exponencialmente por endodiogenia, (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996). A entrada de *T. gondii* na célula do hospedeiro é um processo ativo, envolvendo filamentos de actina e miosina do parasito e certas

proteínas transmembrânicas que se ligam a estes filamentos (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Este estágio proliferativo caracteriza a fase aguda da infecção.

A propagação dos taquizoítos ocorre pelo rompimento das células infectadas e invasão de células adjacentes ou pela via hematogênica, contaminando principalmente o sistema nervoso central, musculatura esquelética e cardíaca. A proliferação dos taquizoítos diminui com o estabelecimento da resposta imune do hospedeiro, contudo aqueles que escapam, evoluem para a forma de bradizoíto e, juntamente com proteínas do hospedeiro, formam os cistos teciduais, os quais são incapazes de induzir a inflamação (LYONS; MCLEOD; ROBERTS, 2002; WEISS; KIM, 2000). Há um equilíbrio dinâmico entre o parasito e o hospedeiro, instalando-se assim a infecção crônica ou latente. Os cistos teciduais alojam-se, basicamente, no sistema nervoso central, musculaturas esquelética e cardíaca e retina (SWIERZY et al., 2014). Sob determinadas condições, os bradizoítos, contidos nos cistos teciduais, podem retornar às formas proliferativas – taquizoítos reiniciando o ciclo de parasitemia.

Ainda hoje, são desconhecidos os fatores que induzem esta mudança nos bradizoítos a reiniciar o ciclo assexuado (WHITE; RADKE; RADKE, 2014). Em outros membros dos *Coccidia*, somente os esporozoítos, provenientes do ciclo sexuado, possuem essa capacidade (DUBEY; MILLER; FRANKEL, 1970b). Todavia, esta capacidade de interconversão de *T. gondii*, alarga as fontes de infecção para o homem, dando a este protozoário notável importância em problemas da saúde humana.

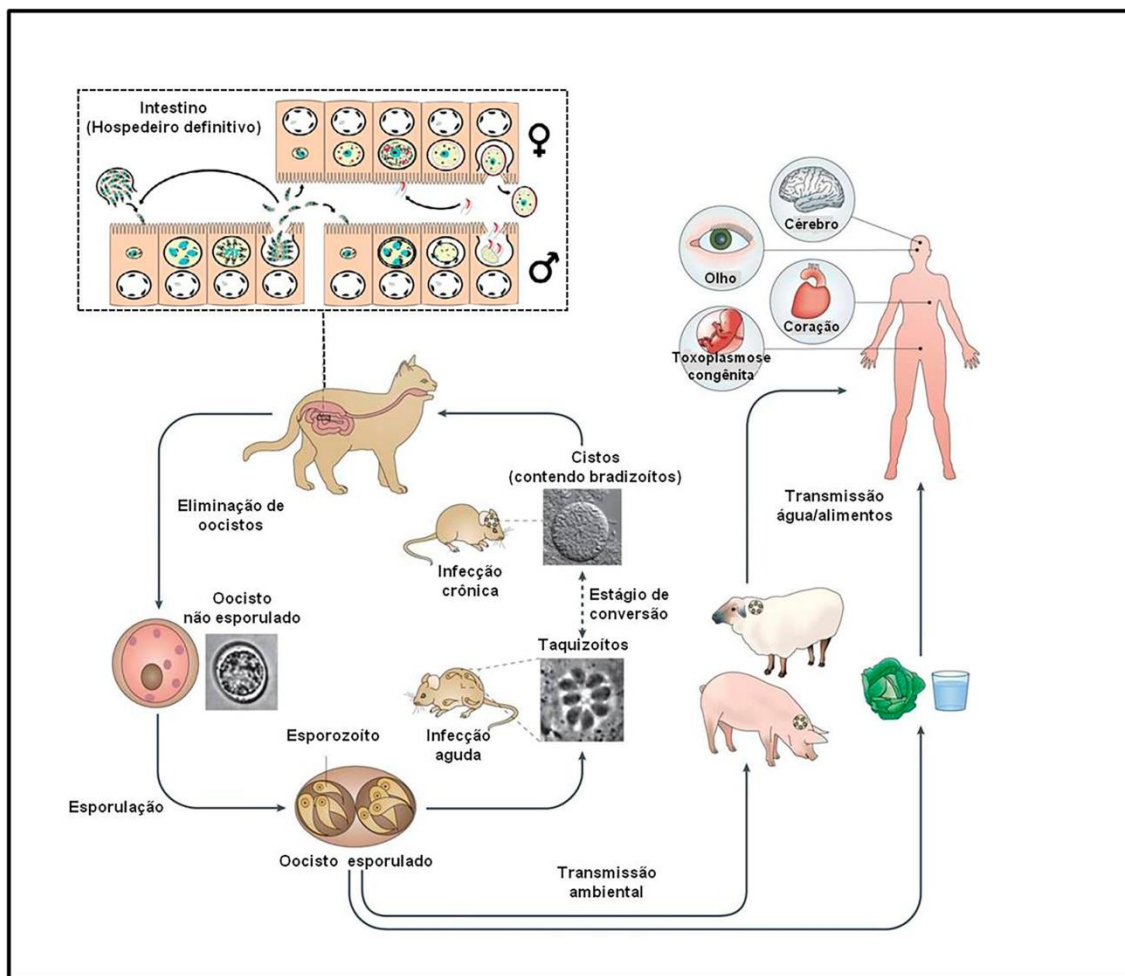


Figura 1: Ciclo completo do protozoário *Toxoplasma gondii*. Extraído e modificado de (HUNTER; SIBLEY, 2012; FERGUSON, 2002).

3.4. Transmissão e epidemiologia da toxoplasmose

No curso da sua evolução, *T. gondii* desenvolveu ampla variedade de vias potenciais de transmissão da infecção para seres humanos e outros hospedeiros intermediários. A maioria das infecções humanas com este parasito é adquirida após o nascimento. A infecção causada por *T. gondii* pode ser adquirida basicamente por três vias de importância epidemiológica: por meio da ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas (WEINMAN; CHANDLER, 1954), consumo de água (DE MOURA et al., 2006) ou alimentos (KNIEL et al., 2002) contaminados com oocistos e infecção transplacentária (DESMONTS; COUVREUR, 1974).

A ingestão de cistos teciduais, contidos em carnes cruas ou mal cozidas é uma importante via de transmissão da toxoplasmose, visto que os cistos são

relativamente resistentes a mudanças de temperatura. Os bradizóitos de *T. gondii* são mais resistentes à digestão enzimática do que os taquizoítos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; JACOBS; REMINGTON; MELTON, 1960). Assim, a ingestão de cistos teciduais viáveis por um hospedeiro não imune, normalmente irá resultar em infecção.

A infecção por meio de oocistos esporulados presentes em água e ou alimentos contaminados, constitui outra via importante de transmissão da toxoplasmose para seres humanos e animais utilizados para consumo humano. Os oocistos esporulados de *T. gondii* são muito resistentes às condições ambientais. Eles são altamente impermeáveis e, portanto, também são muito resistentes aos desinfetantes (KUTICIC; WIKERHAUSER, 1996). No ambiente, são difundidos através da água, vento, adubo e ou por vermes terrestres e artrópodes. Estes oocistos podem contaminar a superfície da água, solo, frutas e vegetais.

Os taquizoítos desempenham papel principal na transmissão vertical ou congênita da toxoplasmose. A gestante transmite a infecção para o feto quando se infecta durante a gestação, por meio da passagem de taquizoítos pela barreira placentária. O parasito pode causar diversos danos ao feto com diferentes graus de gravidade dependendo da virulência da cepa, da capacidade de resposta imune da mãe e idade gestacional (AJZENBERG et al., 2002). Os taquizoítos são sensíveis a enzimas proteolíticas e normalmente são destruídos por digestão gástrica. No entanto, crianças que são mais suscetíveis à toxoplasmose do que adultos e têm menor concentração de enzimas proteolíticas no seu trato gastrintestinal (TENTER, 2009). Além disso, taquizoítos podem, ocasionalmente, sobreviver por um curto período de tempo (até 2h) em solução ácida de pepsina (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Também foi sugerido que, em raras ocasiões, taquizoítos podem penetrar o tecido da mucosa e, assim, obter acesso à circulação sanguínea ou linfática do hospedeiro e chegar ao estômago (RIEMANN et al., 1975; SACKS; ROBERTO; BROOKS, 1982).

Estudos epidemiológicos demonstram que a infecção causada por *T. gondii* é amplamente difundida, atingindo aproximadamente 25 a 30% da população humana mundial (SCHLUTER et al., 2014), Figura 2. A soroprevalência da toxoplasmose varia grandemente de uma região para outra, de país para país e até mesmo dentro de um mesmo país (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009; TENTER;

HECKEROTH; WEISS, 2000). Estas diferenças na prevalência da toxoplasmose decorrem principalmente, da localização geográfica, das condições ambientais, dos hábitos culturais (especialmente em relação à alimentação) e do grau de desenvolvimento do país e da infra-estrutura hídrica e sanitária. Uma baixa soroprevalência é observada no Sudeste Asiático, América do Norte (DUBEY; JONES, 2008a) e no Norte da Europa (10 - 30%). Prevalências entre 30 a 50% são observadas na parte Sul e Central da Europa, enquanto altas prevalências são observadas na América Latina e nos países do continente africano (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Independente da região observa-se que a soroprevalência aumenta com idade devido ao risco de infecção ao longo da vida.

No Brasil, cerca de 60% da população adulta apresenta-se infectada por este parasito (GUIMARAES et al., 1993). Com base na análise de questionários epidemiológicos observa-se que em cada região a prevalência está relacionada a distintos fatores de risco (DUBEY et al., 2012). Em algumas áreas no Brasil essa prevalência varia de 50% a 80% na população; sendo que os valores mais elevados são encontrados em algumas áreas do norte e estados do sul do país (ORÉFICE; BONFIOLI, 2000). Em estudo realizado em uma microregião do estado do Mato Grosso, 97,4% dos indivíduos analisados apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose (SANTOS et al., 2009).

Em levantamento epidemiológico realizado para toxoplasmose em Campos dos Goytacazes, (norte do Estado do Rio de Janeiro), observou-se que a endemicidade era alta, atingindo 57,2% de uma amostragem populacional de 1436 indivíduos. A prevalência variou entre grupos de baixo, médio-baixo e médio-alto poder aquisitivo em 83%, 62% e 23%, respectivamente (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). A ingestão de água de poço e de água não filtrada constituiu em fator de risco associado à baixa condição sócio-econômica para as populações de maior prevalência, sendo que 100% dos indivíduos que relataram ingerir água de rios, lagos e lagoas apresentaram-se como soropositivos para a toxoplasmose (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

De maneira geral, os fatores que pré-dispõem para a infecção com *T. gondii* não são completamente conhecidos, e precisam ser melhores estudados.

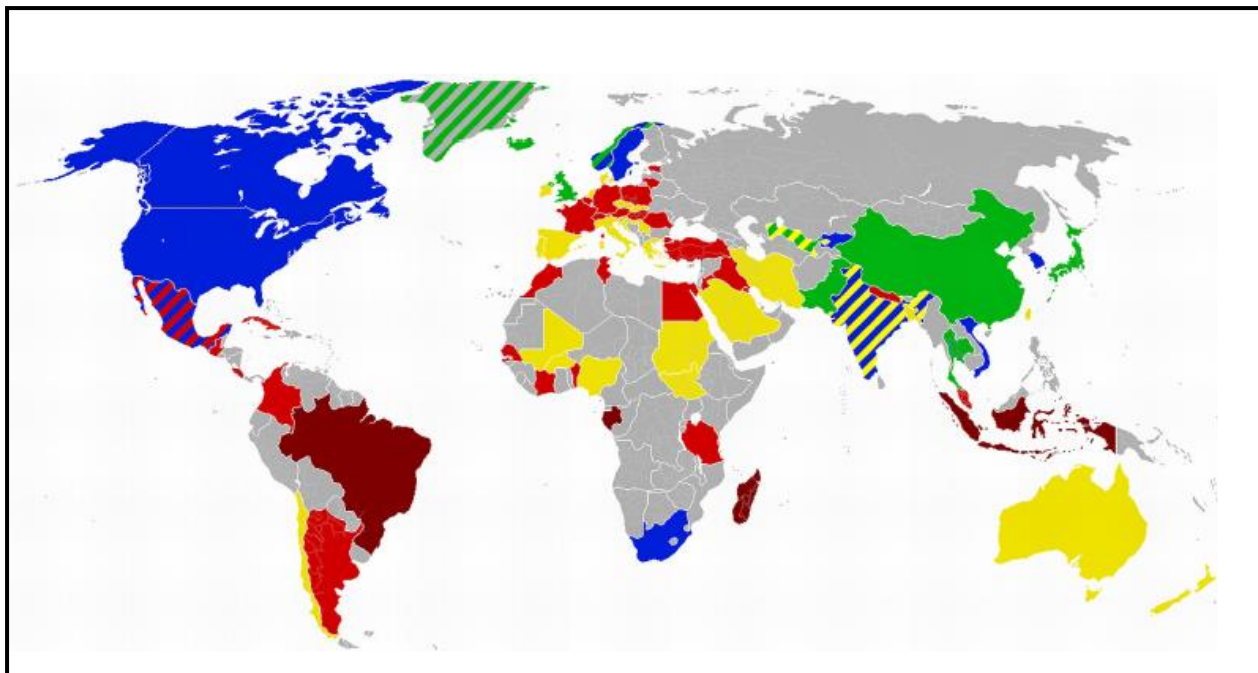


Figura 2: Mapa simplificado da soroprevalência global da infecção por *Toxoplasma gondii*. Código de cores: vermelho escuro: > 60%; vermelho: 40 - 60%; amarelo: 20 - 40%; azul: 10 - 20%; verde: < 10%; cinza: dados não disponíveis. Extraído de MAENZ, et al., 2014.

3.5. Diagnóstico da toxoplasmose

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado por meio do isolamento do parasito, por técnicas moleculares e pela sorologia. Os métodos parasitológicos, em geral são empregados quando há interesse acadêmico e ou quando outros métodos diagnósticos como métodos sorológicos não são conclusivos. O isolamento do parasito é realizado por meio da inoculação intraperitoneal do material suspeito, como líquido amniótico, sangue, fluidos corporais, placenta, ou cultivo celular em animais de laboratório ou ainda cultivo celular *in vitro* (DUBEY; LIDSAY; SPEER., 1998).

Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a qPCR (PCR quantitativo em tempo real), são métodos altamente sensíveis e específicos, que tem melhorado o diagnóstico da doença na fase aguda em hospedeiros imunocomprometidos, além de serem considerados, nos últimos anos, métodos de referência para o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose (MURAT et al., 2013).

Como grande parte das infecções por *T. gondii* são subclínicas o diagnóstico é usualmente baseado no critério imunológico. Vários testes sorológicos são utilizados para detectar anticorpos IgG antígeno-específico, tais como: teste de Sabin - Feldman “dye test” (atualmente utilizado em poucos laboratórios), imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA) e aglutinação direta (SEPULVEDA-ARIAS et al., 2014).

Convencionalmente, os estudos se baseiam na detecção de anticorpos específicos IgG, IgM (MURAT et al., 2013) e IgA, associando-se à pesquisa de anticorpos IgG de avidéz (BESSIERES et al., 1992). Embora seja considerado um bom indicador da fase aguda da infecção, a detecção de IgE específica não é utilizada na rotina diagnóstica (VILLENA et al., 1999). Anticorpos IgG surgem em 1 a 2 semanas, tem pico em 1 ou 2 meses e caem a níveis que persistem por toda vida (MONTROYA, 2002). Anticorpos IgM surgem a partir do quinto dia de infecção podendo diminuir em poucas semanas ou meses, ou persistir por por muitos anos, não significando necessariamente infecção recente (BOBIC; SIBALIC; DJURKOVIC-DJAKOVIC, 1991). O teste sorológico mais indicado para detectar a fase aguda da infecção é o teste de avidéz de IgG, o qual é baseado no fenômeno da avidéz do anticorpo IgG ao antígeno. Em quadros infecciosos com até três a quatro meses de evolução, a IgG apresenta uma baixa avidéz, enquanto que, em infecções com mais de quatro meses de evolução, os anticorpos IgG apresentam alta avidéz (AUER et al., 2000).

Vários estudos têm sido desenvolvidos para melhorar a sensibilidade e especificidade do ELISA para pesquisas de anticorpos anti-*T. gondii*. Alguns autores têm proposto a utilização de antígenos mais específicos, como antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos de proteínas expressas na superfície de *T. gondii*, e até mesmo a utilização de combinações antigênicas (ELYASI et al., 2010). Vários kits comerciais atualmente existentes no mercado utilizam SAG1, uma proteína abundante na superfície de taquizoítos de *T. gondii* (REMINGTON; THULLIEZ; MONTROYA, 2004). Entretanto, a combinação e composição exata desses peptídeos para a utilização em imunoenaios é uma questão que ainda deve ser aprimorada.

Uma das questões mais importante na epidemiologia da toxoplasmose é identificar a provável fonte de transmissão da infecção para humanos. Essa questão

não pode ser acessada por métodos sorológicos convencionais. Recentemente, teste sorológico, que utiliza uma proteína específica de esporozoíto (*Toxoplasma gondii* embryogenesis-related protein, TgERP), foi desenvolvido (HILL et al., 2011). Por meio deste teste (ELISA TgERP) é possível detectar anticorpos específicos de esporozoítos, e assim estimar qual a provável via de infecção da toxoplasmose humana, ingestão de oocistos ou cistos teciduais.

3.6. Características genéticas do parasito *Toxoplasma gondii*

T. gondii apresenta genoma nuclear marcadamente estável de 87 Mb (megabase), consistindo de 14 cromossomos; DNA circular extracromossomal dentro de uma organela (apicoplasto) com propriedades plastídeo-símile de 35 Kb (quilobase) e genoma mitocondrial de 6 Kb.

O genoma nuclear é haplóide para a maioria dos estágios do ciclo do parasito, exceto para uma fase diplóide breve no intestino de felídeos antes da meiose. Os 14 cromossomos são designados por números romanos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, IX, X, XI e XII) e, os tamanhos variam de aproximadamente 1,8 Mb a > 10 Mb. Os primeiros estudos mostraram que o parasito *T. gondii* apresentava um genoma nuclear bastante conservado, apesar do seu amplo espectro de hospedeiros (AJIOKA; FITZPATRICK; REITTER, 2001; KHAN et al., 2005; SU et al., 2002).

Inicialmente, a análise genômica de diferentes isolados deste parasito investigada por meio de PCR-RFLP e/ou de marcadores isoenzimáticos mostrou que, apesar de sua grande distribuição mundial, ampla gama de hospedeiros, e da presença da fase sexual no seu ciclo biológico, *T. gondii* apresentava baixa variação genética, revelando estrutura populacional clonal.

A clonalidade foi inferida devido ao isolamento repetitivo do mesmo isolado em amostras não relacionadas, e pela ausência de vários genótipos recombinantes. Howe e Sibley (1995) classificaram os isolados humanos e animais de *T. gondii* em três linhagens clonais, denominadas tipo I, II e III. Entretanto, estes estudos foram realizados em amostras procedentes da Europa e da América do Norte e quando as pesquisas começaram a se estender para países de outros continentes, observou-se alta porcentagem de genótipos recombinantes diferentes, sugerindo que a população deste protozoário seria altamente diversa nessas regiões. Embora os

primeiros estudos tenham revelado estrutura populacional fortemente clonal na América do Norte e na Europa, a descrição genética de novos isolados revelou que as linhagens na América do Norte pareciam ser mais diversas do que previamente observado. A partir destas observações uma quarta linhagem clonal, referida como tipo 12, foi descrita na América do Norte, onde é comumente encontrada em animais (KHAN et al., 2011).

A linhagem Tipo 12 está associada com a manifestação da toxoplasmose em lontras marinhas no oeste dos Estados Unidos e Canadá (MILLER et al., 2004; SUNDAR et al., 2008). Esse genótipo também foi isolado de carnívoros terrestres na costa da Califórnia (MILLER et al., 2008), de animais selvagens no Canadá (DUBEY et al., 2008b) e de animais domésticos, incluindo carneiros utilizados para consumo humano (DUBEY et al., 2008c) e suínos (DUBEY et al., 2008d), nos Estados Unidos. Todas as quatro linhagens clonais apresentam genótipos altamente semelhantes, altos níveis de desequilíbrio de ligação e baixa ou quase rara recombinação.

Em contraste com o padrão clonal observado na América do Norte e Europa, um padrão totalmente distinto é visto na América do Sul, que é povoada por diferentes linhagens que mostram acentuadamente maior diversidade e divergência entre os grupos (SU, et al., 2012; SHWAB, et al., 2014). Esses padrões opostos sugerem que *T. gondii* se propaga em grande parte clonalmente na América do Norte e na Europa, mas apresenta maior evidência de recombinação sexual na América do Sul.

A análise genômica de diferentes isolados de *T. gondii* no Brasil mostrou que nesta região o parasito apresenta uma estrutura populacional diversa daquela encontrada na América do Norte e Europa. Acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética das cepas brasileiras de *T. gondii* (FERREIRA ADE et al., 2006).

Ao longo dos últimos anos, isolados de *T. gondii* foram obtidos de uma grande diversidade de animais de diferentes áreas geográficas no Brasil (DUBEY et al., 2012). Até o momento, 363 isolados e 175 genótipos foram identificados no Brasil utilizando os 11 marcadores PCR-RFLP (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, SAG2 alt, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico) (SU et al., 2010). Dos 363 isolados, 106

foram isolados únicos, o que confirma a grande diversidade genética de *T. gondii* no Brasil (Figura 3).

Pena et al (2008) caracterizaram geneticamente amostras de DNA provenientes de isolados de *T. gondii* obtidos de gatos de São Paulo. A genotipagem foi realizada por meio da PCR-RFLP, utilizando os 11 marcadores propostos por Su em 2006 (SU; ZHANG; DUBEY, 2006) além do marcador CS3, utilizado para verificar a associação deste marcador com a virulência em camundongos. Os autores mostraram alta diversidade genética entre as amostras analisadas.

Dados de genotipagem, do estudo citado acima combinados com resultados obtidos em outros estudos realizados no Brasil, perfazendo um total de 125 isolados, permitiram a identificação de 48 genótipos, 26 desses genótipos tiveram um único isolado e, 4 com vários isolados identificados a partir de diferentes hospedeiros e locais, sendo considerado como linhagens clonais comuns no Brasil. Essas linhagens foram designadas tipo BrI, BrII, BRIII e BrIV. Estes resultados indicam que a população de *T. gondii* no Brasil é altamente diversa, na qual a troca genética frequente tem gerado uma série de recombinantes e algumas linhagens clonais bem sucedidas expandiram-se para grandes áreas geográficas. Análise da taxa de mortalidade em camundongos infectados indica que tipo BRI é altamente virulenta, tipo BRIII é não virulenta, enquanto BrII e linhagens BRIV têm virulências intermediárias (PENA et al., 2008).

Em contraste ao observado na América do Norte e Europa, onde a linhagem clonal tipo II é predominante, no Brasil apenas cinco isolados do tipo II foram identificados dentre os 363 isolados brasileiros de *T. gondii* (DUBEY et al., 2012). Os três genótipos mais comuns encontrados no Brasil são o BRI, BRII e BRIII. Em geral, observa-se a falta de um genótipo dominante de *T. gondii* no Brasil, muitos dos genótipos identificados foram únicos. Esses resultados indicam que os dados existentes identificaram apenas uma pequena porção da diversidade global de *T. gondii* em animais no Brasil (PENA et al., 2008).

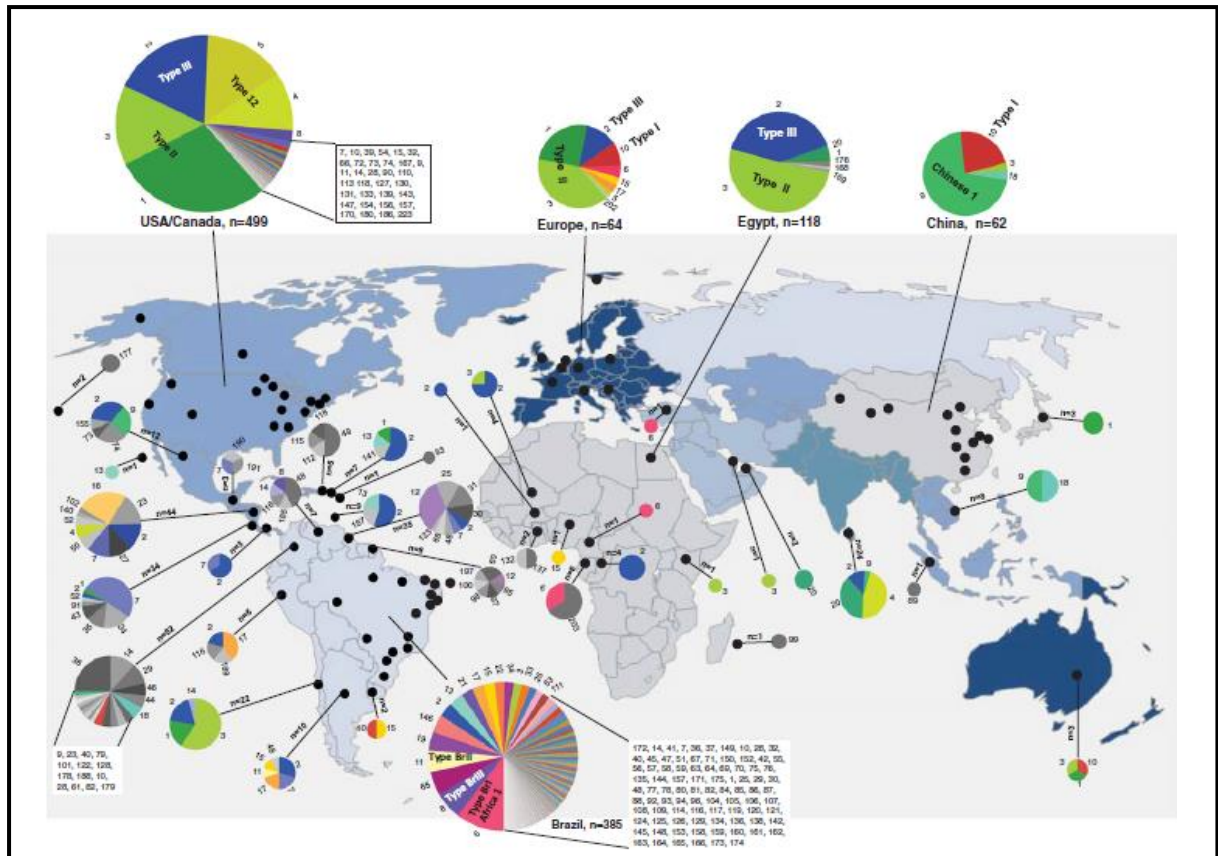


Figura 3: Distribuição geográfica dos genótipos de *Toxoplasma gondii*. Os pontos pretos indicam os locais de onde foram obtidos isolados de *T. gondii* e genotipados usando o método de PCR -RFLP. Os números em torno das bordas do gráfico de torta mostram os genótipos ToxoDB PCR- RFLP. O tamanho do gráfico de pizza correlaciona-se com o número total de isolados (n), e as cores indicam os diferentes genótipos. Extraído de SHWAB, et al., 2014.

3.7. Toxoplasmose em frangos (*Gallus domesticus*) vivendo livremente

A detecção direta de oocistos de *T. gondii* no solo é difícil. Portanto, animais que vivem livremente como gatos, cachorros e frangos podem ser considerados bons indicadores de contaminação por toxoplasmose em áreas urbanas densamente povoadas, já que eles são expostos sem qualquer proteção a todas as formas infectivas do parasita.

As galinhas que vivem livremente desempenham um papel importante na epidemiologia de *T. gondii* no ambiente, talvez mais que os roedores, porque elas são clinicamente resistentes à infecção por *T. gondii* e vivem mais do que os roedores (DUBEY, 2010a). Além disso, gatos alimentados com tecidos de galinha

naturalmente infectada podem eliminar milhões de oocistos (DUBEY et al., 2002), e a ingestão de carne de frangos infectados pode ser uma fonte de infecção para a toxoplasmose em seres humanos e outros animais.

Frangos vivendo livremente são considerados excelentes indicadores de contaminação do solo por oocistos de *T. gondii*, devido a seus hábitos alimentares. Por isso, a determinação da prevalência da infecção por *T. gondii* em frangos é muito importante, uma vez que a prevalência está diretamente relacionada ao nível de contaminação ambiental do local.

Inquéritos sorológicos realizados em todo mundo mostram que a soroprevalência da toxoplasmose em galinhas caipiras, determinada por meio de MAT, variam de 2 a 100% dependendo da região (DUBEY, 2010b). No Brasil, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em frangos é alta, variando de 38,0% a 65,1% (BELTRAME et al., 2012; DA SILVA, et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2009; DUBEY et al., 2006; DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2012; DUBEY et al., 2003a; DUBEY et al., 2007).

Em estudo realizado na mediação do município de Campos dos Goytacazes foi possível estimar a contaminação do solo através da investigação da presença de *T. gondii* em frangos, vivendo livremente em peridomicílios na cidade (DA SILVA, et al., 2003). Este estudo mostrou que 65% das aves testadas através de MAT apresentaram anticorpos anti *T. gondii* e, parasitas foram isolados de 61 das 83 aves investigadas sendo, 34 (70%) dos isolados tipo I e 13 (27%) tipo III, e um isolado misto (tipo I e tipo II) (DUBEY et al., 2003b).

A análise posterior destes isolados incluindo outros marcadores que não haviam sido analisados anteriormente mostrou que são geneticamente e biologicamente diferentes dos encontrados nos Estados Unidos e Europa (DUBEY et al., 2008e), mostrando que o nível de contaminação do solo desta região, é de fato, bastante elevado.

3.8. Grau de vulnerabilidade de aquíferos por porosidade intergranular e a sua relação com a prevalência da toxoplasmose

A água é considerada importante veículo na disseminação de oocistos de *T. gondii*, visto que estes podem persistir por longos períodos de tempo no ambiente (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998) e são altamente resistentes a vários

procedimentos de inativação (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970a; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Estudos sobre contaminação ambiental e alta endemicidade da toxoplasmose humana em Campos dos Goytacazes abriram novas perspectivas sobre o impacto da contaminação ambiental na transmissão hídrica da toxoplasmose para seres humanos. Este fato estimulou à investigação da prevalência da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes considerando a vulnerabilidade do aquífero na região, uma abordagem recente na literatura (VIEIRA, 2010).

A determinação dos índices de vulnerabilidade fornece subsídios para o reconhecimento de áreas mais sensíveis à contaminação, e conseqüentemente a sua prevenção, possibilitando a manutenção da qualidade dessas águas subterrâneas para gerações atuais e futuras. Utilizando-se mapas de vulnerabilidade pode-se delimitar quais áreas devem ser focadas de maneira mais intensiva em um estudo de monitoramento, podendo também definir quais áreas devem ser protegidas para garantir a integridade do aquífero em termos de contaminação.

Aquífero é uma formação geológica subterrânea que funciona como reservatório de água, sendo alimentado pelas águas das chuvas que se infiltram no subsolo. Para se constituir em aquífero, uma rocha ou sedimento tem que ter porosidade suficiente para armazenar água, e os poros ou espaços vazios têm que ter dimensões suficientes para permitir que a água possa passar de um lugar a outro, sob a ação de um diferencial de pressão hidrostática (DOERFLIFER; JEANNIN; ZWAHLEN, 1999). Quanto ao tipo de rocha armazenadora, os aquíferos podem ser classificados como aquíferos porosidade primária, aquíferos fraturados e aquíferos cársticos.

Os aquíferos porosos apresentam espaços vazios de pequenas dimensões (poros), por onde a água circula; estão associados com rochas do tipo sedimentares consolidadas, solos arenosos e sedimentos não consolidados; representando o grupo de aquíferos mais importantes, devido ao grande volume de água que armazenam e também por serem encontrados em muitas áreas.

Os aquíferos fraturados são caracterizados por possuírem fraturas abertas que acumulam água. Estas fraturas representam o resultado de alguma deformação sofrida por uma rocha quando esta é submetida a esforços tensionais de natureza diversa. Os aquíferos fraturados estão associados com rochas do tipo ígneas,

metamórficas e sedimentares.

Já os aquíferos cársticos são formados em rochas carbonáticas. As fraturas presentes neste tipo de aquífero podem atingir dimensões maiores, devido à dissolução do carbonato pela água. Assim, podem formar grandes rios subterrâneos. O município de Campos dos Goytacazes é caracterizado por duas categorias de aquíferos: o aquífero fraturado e o poroso. (SEMADS/GTZ, 2001).

O termo vulnerabilidade de aquíferos foi inicialmente utilizado por Le Grand (LE GRAND, 1964), nos EUA, e Albinet e Margat, na França, (ALBINET; MARGAT, 1970) *apud* (DOERFLIFER; JEANNIN; ZWAHLEN, 1999) e, mais amplamente na década de 80 por vários outros autores (ALLER et al., 1987; FOSTER, 1987; FOSTER; HIRATA, 1988). Desde então, várias definições de vulnerabilidade de aquíferos são encontradas na literatura.

De acordo com conclusões e recomendações da Conferência Internacional sobre vulnerabilidade dos solos e águas subterrâneas aos poluentes, realizada nos Países Baixos em 1987, o termo vulnerabilidade foi definido como “(...) a sensibilidade da qualidade das águas subterrâneas a uma carga poluente, função apenas das características intrínsecas do aquífero”. No âmbito da abordagem pelo método de EPIK, a vulnerabilidade intrínseca é definida como a sensibilidade das águas subterrâneas à contaminação por atividades humanas, função apenas das características geológicas e hidrogeológicas inerentes do aquífero (DOERFLIFER; JEANNIN; ZWAHLEN, 1999).

Em função das condições hidrogeológicas descreve-se o grau de vulnerabilidade e, através de mapas informam-se os perigos de contaminação de água subterrânea (HIRATA, 2000). Existem diversos métodos de categorização de vulnerabilidade, e estes se baseiam na caracterização de diferentes parâmetros. Dentre as metodologias de caracterização de vulnerabilidade destaca-se a metodologia DRASTIC que foi utilizada na confecção do mapa de vulnerabilidade usado neste estudo.

O método DRASTIC (ALLER et al., 1987) corresponde à soma ponderada de valores atribuídos aos seguintes parâmetros ou indicadores hidrogeológicos: (1) D - Profundidade do Topo do Aquífero; (2) R - Recarga do Aquífero; (3) A - Material do Aquífero; (4) S - Tipo de Solo; (5) T – Topografia; (6) I - Influência da Zona não saturada; (7) C - Condutividade Hidráulica do Aquífero. A cada parâmetro é atribuído

um índice (entre 1 e 10), que depois é multiplicado por um peso (entre 1 e 5). O índice final obtém-se somando o resultado dos produtos de cada índice pelo respectivo peso. O índice final varia entre 23 e 230. Quanto mais elevado o índice, maior é a vulnerabilidade.

A prevalência dos oocistos de *T. gondii* no ambiente é difícil de ser avaliada. Um trabalho utilizando microesferas que mimetizam as propriedades, física e química dos oocistos de *T. gondii* mostrou que a natureza hidrofílica e a carga negativa desses oocistos em água doce permitem que os mesmos, uma vez eliminados no meio ambiente, percolem através do solo, sendo carreados naturalmente pela água da chuva, alcançando assim, os mananciais (SHAPIRO et al., 2009).

Nesse sentido, estudos que busquem alternativas que permitam essa avaliação são de extrema importância e devem levar em consideração as características específicas dos oocistos e dos aquíferos. Em uma abordagem inédita, a prevalência da toxoplasmose humana e animal foi avaliada em relação ao grau de vulnerabilidade de aquífero da região e, mostrou ser uma estratégia bastante promissora (VIEIRA, 2010).

Segundo Eisendle-Flöckner, a integração do estudo da contaminação de aquíferos por contaminantes biológicos como nematódeos e outros parasitos levando em consideração as características hidrogeológicas dos aquíferos pode ser uma estratégia de estudo interessante e que deve ser considerada (EISENDLE-FLÖCKNER; HILBERG, 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da área de estudo e amostragem

O estudo foi realizado no município de Campos dos Goytacazes, localizado a 21°45'15"N e 41°19'28"W, na região norte do estado do Rio Janeiro, à aproximadamente 287 km da capital. A cidade tem clima quente e úmido com temperatura média anual de 22,7°C e altitude de 13 metros. Campos dos Goytacazes é o maior município do interior do Estado, com uma área de 4.032 Km² e uma população de 477.208 habitantes (IBGE, 2013).

Este estudo resulta de colaboração entre a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e a Secretaria Municipal de Educação da Prefeitura Municipal de Campos dos Goytacazes. Durante o período de junho a agosto de 2013 foram realizadas visitas em escolas e residências do município para coleta de amostras de sangue periférico dos estudantes, pais e/ou responsáveis dos mesmos, funcionários das escolas e residentes. A população de estudo foi constituída por 557 indivíduos, dos quais 112 eram do sexo masculino e 445 eram do sexo feminino, com faixa etária variando de 4 a 75 anos de idade.

A partir do mapa de vulnerabilidade de aquíferos do município (Figura 4) e do trabalho previamente realizado (VIEIRA, 2010), seis áreas foram selecionadas para coleta de sangue periférico dos indivíduos: A2 (extrema vulnerabilidade de aquíferos), A3 (moderada vulnerabilidade de aquíferos), A4 (alta vulnerabilidade de aquíferos), A5 (alta vulnerabilidade de aquíferos), A6 (moderada vulnerabilidade de aquíferos) e A7 (alta vulnerabilidade de aquíferos). A área 2 compreende as localidades de Mundeus, Zumbi, Lagoa do Campelo e Brejo Grande. Na área 3 está o Distrito de Travessão e adjacências. Já a área 6 compreende as localidades de Ibitioca, Lagoa de Cima e Dores de Macabu. Na área 7 estão as localidades de Farol de São Thomé, Santo Amaro e Baixa Grande. Enquanto, na área 4 e 5 está localizada a região central/urbana do município de Campos, representando, respectivamente, a margem direita e esquerda do Rio Paraíba do Sul.

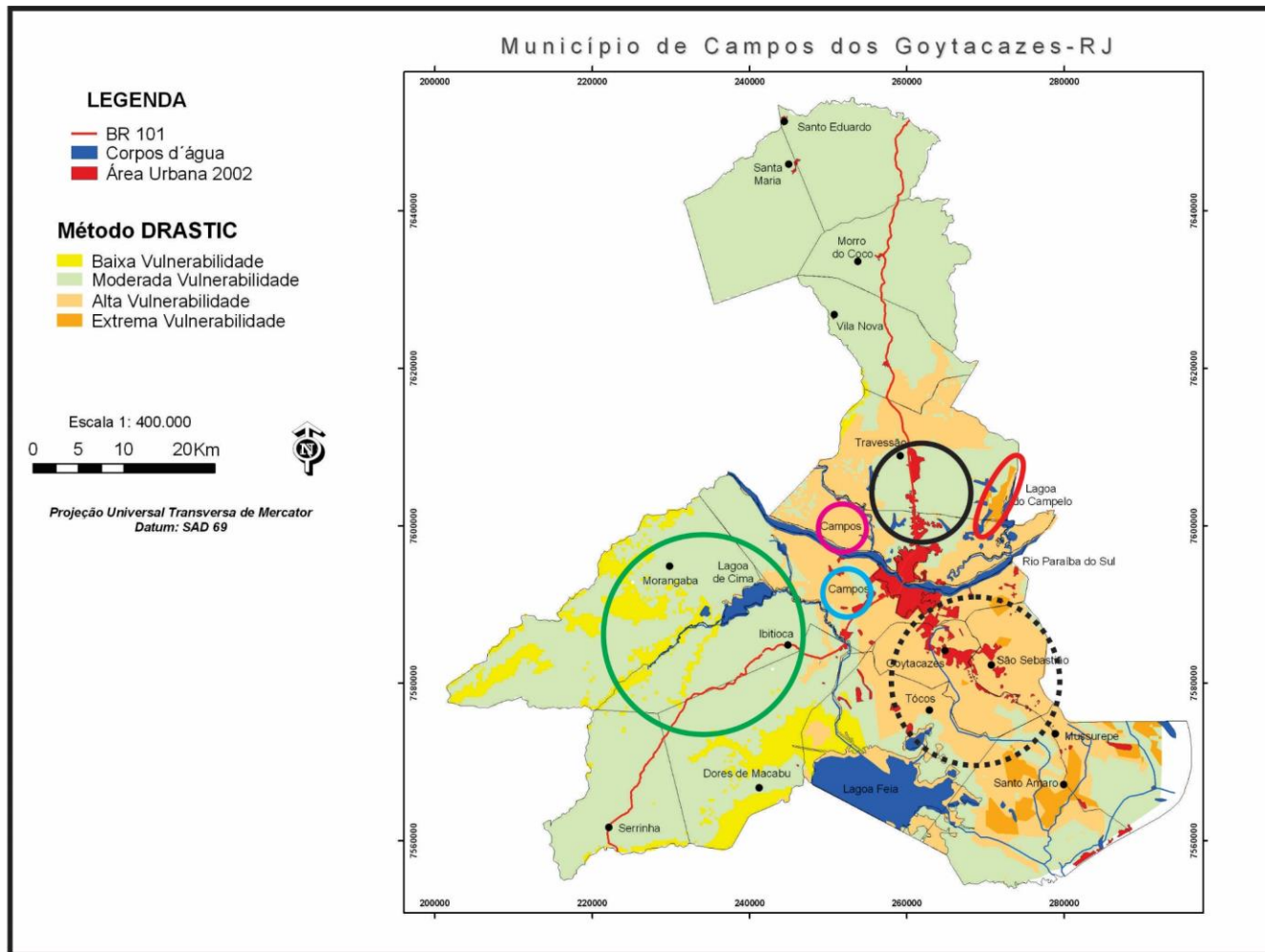


Figura 4: Mapa de vulnerabilidade de aquíferos do Município de Campos dos Goytacazes gerado de acordo com a metodologia DRASTIC (Laboratório de Engenharia Civil - UENF). As áreas amostradas no estudo estão destacadas no mapa: área 2: elipse em vermelho; área 3: círculo em preto; área 4: círculo em rosa; área 5: círculo em azul; área 6: círculo em verde e área 7 círculo em preto pontilhado.

4.2. Indivíduos

Durante o período de junho a novembro de 2013 amostras de sangue de 557 indivíduos, residentes no município de Campos dos Goytacazes pertencentes a uma das seis áreas citadas (Tabela 1), foram coletadas após consentimento informado e identificadas por códigos alfanuméricos com intuito de resguardar os direitos de privacidade dos mesmos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE foi assinado por todos os participantes. Quanto às crianças, os pais ou responsáveis assinaram o termo concordando com a participação das mesmas (APÊNDICE). Todos foram esclarecidos quanto ao objetivo do estudo e a garantia ao anonimato, sendo respeitado o direito da não participação no trabalho e de recusa em participar sem que haja ônus para o mesmo.

Este projeto foi analisado pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP). O sangue dos indivíduos foi coletado por venopunção por meio do sistema de tubos ao vácuo na ausência de anticoagulante. As amostras de sangue coletadas foram processadas para obtenção de soros, os quais foram mantidos a – 20°C até o momento das análises sorológicas.

Tabela 1: Distribuição dos indivíduos sujeitos da pesquisa por área, grau de vulnerabilidade e faixa etária.

Área amostrada	Grau de vulnerabilidade de aquíferos	Número de indivíduos amostrados (557)	Faixa etária (anos)
A2	Extrema	15	13 - 71
A3	Moderada	77	08 - 68
A4	Alta	40	13 - 75
A5	Alta	36	10 - 69
A6	Moderada	196	06 - 74
A7	Alta	193	04 - 68

4.3. Detecção de anticorpos IgG e IgM anti- *Toxoplasma gondii* no soro dos indivíduos por ELISA

Amostras de soros de todos os indivíduos sujeitos da pesquisa foram analisadas quanto a presença de anticorpos IgG e IgM específicos no reconhecimento de *T. gondii*. As análises foram feitas pela técnica de ELISA com a utilização do Kit diagnóstico Abbott ARCHITECT Toxo IgG and IgM, seguindo normas do fabricante.

4.4. Detecção de anticorpos IgG anti-TgERP *Toxoplasma* no soro dos indivíduos por ELISA

O teste de ELISA com antígeno TgERP foi realizado essencialmente como descrito por Hill (HILL et al., 2011). Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, NY, EUA) foram sensibilizadas com 100 ul do antígeno TgERP diluído a 2 ug/mL em tampão carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9,6) e incubada a 4°C *overnight*. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (Tris, 50 mM, NaCl, 150 mM, 5% de leite desnatado e 1% de triton X-100, pH 7.4). Em seguida, as placas foram incubadas com 100 ul/poço dos soros diluídos a 1:500 em tampão de lavagem, durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após mais um ciclo de três lavagens, as placas foram incubadas com 100 ul/poço de imunoglobulinas de coelho anti- IgG humana conjugada à peroxidase (KPL®), diluído a 1:1000 em tampão de lavagem. As placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, lavadas novamente três vezes em solução de lavagem. Por último, a reação foi revelada com 100 ul/poço de solução de tetrametilbenzidina - TMB (SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Vmax ELISA reader), usando-se filtro de 405 nm de comprimento de luz. O ponto de corte (*cut - off*) do teste foi calculado pela média das amostras negativas acrescida de três vezes o desvio padrão dessas amostras.

4.5. Aves peridomiciliares

Amostras de soro de 159 aves da espécie *Gallus domesticus* vivendo livremente nas cinco regiões (A2, A4, A5, A6 e A7) foram avaliadas quanto à infecção pelo parasito *T. gondii*. A amostragem foi realizada no período de maio a

novembro de 2013. O quantitativo de aves e sua origem são mostrados na tabela 2. Uma alíquota de sangue destas aves foi coletada e os soros foram mantidos em freezer a - 20°C até o momento das análises sorológicas para a toxoplasmose por meio do teste de aglutinação modificado (MAT). Amostras de sangue foram coletadas da veia branquial, com auxílio de agulhas (13 x 0,45 G) e seringas descartáveis de 3 mL.

Cada ave recebeu uma anilha de identificação que foi anexada a um de seus pés a fim de que todas as aves fossem identificadas. As aves que apresentaram anticorpos anti- *T. gondii* foram submetidas à eutanásia e seus órgãos analisados quanto à presença de *T. gondii* por meio de bioensaio em camundongos. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA – UENF), sob o parecer de nº. 97/2010 (ANEXO).

Tabela 2: Distribuição das aves avaliadas no estudo por área e grau de vulnerabilidade.

Área amostrada	Grau de vulnerabilidade de aquíferos	Número de galinhas amostradas
A2	Extrema	40
A4	Alta	16
A5	Alta	34
A6	Moderada	64
A7	Alta	5
TOTAL		159

4.6. Detecção de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* nos soros das aves peridomiciliares

Para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* os soros das aves foram examinados por meio do teste de aglutinação modificado (MAT) (DESMONTS; REMINGTON, 1980; DUBEY; DESMONTS, 1987). A diluição dos soros foi feita em

microplaca (96 poços), usando tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, 0,01M (NaCl; NaH₂PO₄; Na₂HPO₄). Em seguida, 100 µL de antígeno estoque (taquizoítos inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5 mL de tampão borato pH 8,95 (NaCl; H₃BO₃; NaN₃; albumina sérica bovina para solução de uso a 0,4%), 35 µL de 2-Mercaptoetanol e 50 µL de Azul de Evans (2 mg/mL). Essa mistura foi então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25 µL de reagentes por poço. Após diluição seriada dos soros, 25 µL/ poço, foram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (v/v). A placa foi selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada *overnight* em estufa a 37°C. A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa foi considerada como resultado negativo; um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido foi considerado como positivo. Os animais com títulos maiores ou iguais a 25 foram considerados positivos. O antígeno para a realização do teste sorológico foi fornecido pelo Dr. Jitender Prakash Dubey do Laboratório de Doenças Parasitárias Animais do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, sendo enviado por via aérea.

4.7. Digestão péptica dos tecidos

Os animais que apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose no MAT foram submetidos à eutanásia por meio de deslocamento cervical. Posteriormente, foram dissecadas para retirada do cérebro e coração. O cérebro e o coração foram processados e digeridos com pepsina de acordo com o protocolo abaixo descrito por (DUBEY, 1998b).

O tecido conectivo, gordura e pele foram retirados com auxílio de tesoura. Os dois órgãos (cérebro e coração) de cada ave foram processados em conjunto no liquidificador em baixa velocidade por 30 segundos com 70 mL de solução salina. O material processado foi transferido para um tubo de 250 mL. O liquidificador foi lavado com 30 mL de PBS perfazendo-se um volume total de 100 mL do homogenato. O homogenato e a solução de pepsina (2,6 g de pepsina, 5,0 g de NaCl, 7,0 mL de HCl e completa-se o volume para 500 mL, pH 1,1 – 1,2) foram aquecidos separadamente no banho Maria até atingir a temperatura de 37°C. Em seguida, foram adicionados 100 mL da solução de pepsina pré-aquecida ao homogenato. Os tubos permaneceram em banho Maria por 60 min.

Após este período o homogenato foi filtrado por meio de duas camadas de gazes em tubos de polipropileno de 50 mL e centrifugado a 1200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 20 mL de PBS. A neutralização da solução ácida de pepsina foi feita adicionando-se 15 mL de solução de bicarbonato 1,2%, pH 8,3.

O homogenato foi centrifugado a 1200 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 5 a 10 mL de PBS, contendo 1000U de gentamicina, na proporção de 200 µl/100 mL. Em seguida, 1 mL do homogenato foi inoculado em camundongos. Cada preparação proveniente de uma ave foi inoculada em grupos de 5 camundongos, identificados individualmente e alojados na mesma caixa.

4.8. Bioensaios em camundongos

Camundongos suíços fêmeas entre quatro a seis semanas de idade foram utilizados neste estudo com o objetivo de isolar o parasito *T. gondii*. Os camundongos foram inoculados no dorso por via subcutânea e observados diariamente para verificação de manifestação da infecção por *T. gondii*. Os camundongos inoculados que vieram a óbito foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* no cérebro e nos pulmões. Os animais que sobreviveram até seis semanas pós-inoculação (PI) foram examinados quanto à presença de anticorpos anti-*T. gondii*, por meio do MAT, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997). Para isso, a colheita do sangue foi realizada pelo plexo orbital após os camundongos serem contidos fisicamente e anestesiados.

Os camundongos sobreviventes foram mantidos no ensaio por até dois meses PI, quando então foram submetidos à eutanásia e examinados para a presença de cistos teciduais de *T. gondii* no cérebro.

O cérebro e/ou pulmões de todos os camundongos que apresentaram sintomas da infecção por toxoplasmose ou sorologia positiva foram retirados e examinados. Uma parte dos órgãos foi observada ao microscópio ótico para a pesquisa de formas do parasita, outra parte criopreservada e o restante armazenado separadamente em tubos e congelados a - 70°C até o processamento das amostras para a extração do DNA. A criopreservação foi realizada segundo o protocolo descrito por Dubey (2010a).

4.9. Extração de DNA

O DNA de *T. gondii* foi extraído dos tecidos dos camundongos infectados (cérebro e pulmão) por meio do kit de extração comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* Qiagen®, segundo recomendações do fabricante.

4.10. PCR-RFLP para genotipificação

Os genótipos dos isolados de *T. gondii* foram determinados utilizando-se multiplex multilocus PCR-RFLP (SU et al., 2010; SU et al., 2006). Foram utilizados onze marcadores: SAG1, SAG2 5' - 3', alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico para determinar os genótipos dos isolados (Tabela 3). A PCR-RFLP envolve duas amplificações. Na primeira amplificação, cada reação foi realizada adicionando-se ao *mix* de PCR 1,5 µl de cada amostra de DNA e das cepas controles de *T. gondii*, 25 µM de cada um dos iniciadores. Foram utilizados na mesma reação 22 iniciadores externos dos onze marcadores descritos na tabela 3. As amplificações consistiram de um ciclo inicial de desnaturação de 4 minutos a 95°C, uma segunda etapa com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Na segunda PCR (Nested-PCR), para cada marcador foi realizado uma reação. As amplificações e concentrações de todos os componentes foram as mesmas descritas na primeira PCR. Os produtos amplificados da primeira PCR (1,5 µl) foram adicionados a reação e foram utilizados os iniciadores internos como descritos na tabela 3. Os fragmentos amplificados da nested-PCR foram digeridos por enzimas de restrição apropriadas para os diferentes marcadores com temperatura e tempo adequado para cada enzima e de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 3). Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose a 2,5% e 3% de acordo com cada marcador (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo dos primers para marcadores da multilocus PCR-RFLP.

Marcadores	Multiplex PCR primers (primers externos)*	Nested PCR primers (primers internos)	Nested PCR (bp)	Enzimas de restrição, Tampão NEB, temperatura de incubação e tempo	Referência
SAG1	F: GTTCTAACACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau 96I + HaeII (dupla digestão), NEB4, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(GRIGG et al., 2001).
5'-SAG2	Não necessário. O fragmento de DNA para 5'-SAG2 é coberto pelo primer externo do alt. SAG2.	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI, NEB4, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(HOWE et al., 1997; SU et al., 2006).
3'-SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTGA CTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI, NEB4, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(HOWE et al., 1997).
alt. SAG2	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTGACCCAGCGGGAGCAC	546	HinfI + TaqI, NEB3, BSA, 37°C 30 min, 65°C 30min. 2,5% gel.	(KHAN et al., 2005; SU et al., 2006).
SAG3	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTGCGGTGTTCACTCA R: CACAAGGACCGAGAAGGA	225	NciI, NEB4, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(GRIGG et al., 2001).
BTUB	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI + TaqI (dupla digestão), NEB4, BSA, 60°C 1h. 2,5% gel.	(KHAN et al., 2005; SU et al., 2006).
GRA6	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI, NEB2, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(KHAN et al., 2005; SU et al., 2006).
C22-8	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmAI (ou BCoDI) + MboII (dupla digestão), NEB2, BSA, 37°C 30 min,	(KHAN et al., 2005; SU et al.,

				55°C 30min. 2,5% gel.	2006).
C29-2	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATAACAT	F: AGTTCTGCAGAGAGTGTGCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV + RsaI (dupla digestão), NEB1, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(KHAN et al., 2005; SU et al., 2006)
L358	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTCCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII + NlaIII (dupla digestão), NEB4, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(KHAN et al., 2005; SU et al., 2006).
PK1	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI + RsaI (dupla digestão) NEB4, BSA, 37°C 1h. 2,5% gel.	(KHAN et al., 2005; SU et al., 2006).
Apico	F: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCTTGATA	640	AflII + DdeI (dupla digestão), NEB2, BSA, 37°C 1h. 3% gel.	(SU et al., 2006).

* F: forward primer; R: reverse primer.

Para cada reação cepas GT1 (tipo I), PTG (tipo II), CTG (Tipo III), TgCgCa1 (cougar), MAS, TgCatBr5, TgCatBr64, TgToucan foram utilizadas como controles positivos, e água ultrapura como controle negativo (Tabela 4). Os genótipos obtidos a partir do corte com enzimas de restrição foram identificados e comparados com os existentes no banco de dados ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>).

Tabela 4: Amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controles positivos na reação multilocus PCR-RFLP.

Genótipos de referência	Marcadores genéticos										
	SAG1* (5'+3')	SAG2†	alt. SAG2‡	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	Apico
GT1 (tipo I)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
PTG (tipo II)	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
CTG tipo (III)	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
TgCgCa1(cougar)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I
TgCatBr64	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I
TgToucan (TgRsCr1)	u-1	I	II	III	I	III	u-2	I	I	III	I

* No locus SAG1, o tipo II e III são indistinguíveis.

‡ Novo marcador SAG2 baseado na terminação 5' da sequência do gene, mas diferentes do marcador 5'-SAG2 (SU et al., 2006).

† Marcador SAG2 baseado na terminação 5' e 3' da sequência do gene (HOWE et al., 1997).

u-1 e u-2 são novos alelos que são diferentes dos alelos clonais, Tipo I, II e III.

4.11. Análises estatísticas

As informações referentes aos indivíduos, tais como sexo, idade, localização e grau de vulnerabilidade de aquíferos foram avaliados em relação à sorologia no programa Epi Info™ 7 (versão 7.1.4), do CDC. Os desvios-padrão, a distribuição de frequências e as médias destas variáveis foram calculadas utilizando o programa. O teste estatístico utilizado foi o qui-quadrado ou teste Exato de Fisher, com significância estatística definida com um nível de 5%, ou seja, $p \leq 0,05$. A distribuição

das aves segundo a soroprevalência, a região e a vulnerabilidade de aquíferos foi comparada pelo teste qui-quadrado para tendência linear, com nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico Epiinfo 7.

5.0. RESULTADOS

5.1. Prevalência da toxoplasmose em humanos por meio de sorologia convencional em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos

Dos 367 indivíduos avaliados neste estudo (65,9%) apresentaram sorologia positiva e 190 (34,1%) apresentaram sorologia negativa para a toxoplasmose. Entre os indivíduos do sexo masculino 70 foram reagentes à toxoplasmose (62,5%) enquanto 297 (66,7%) dos indivíduos do sexo feminino apresentam sorologia positiva para a toxoplasmose. Porém, não foram observadas diferenças estatísticas com relação ao fator sexo ($p= 0,4$). Observou-se que a prevalência foi diretamente proporcional à idade, ou seja, o aumento da soropositividade acompanhou o aumento de idade ($p < 0,0001$), o que pode ser observado na tabela 5. A média de idade dos indivíduos infectados foi de 32,9 anos com desvio-padrão de 15,7, enquanto que a média de idade dos indivíduos negativos foi de 20,7 e desvio-padrão de 12,2.

Tabela 5: Prevalência da toxoplasmose por meio de sorologia convencional em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos. Os valores com significância estatística estão em negrito.

Variáveis		Total	Positivos		Valor p	OR	IC 95%
			n	%			
Sexo	Feminino	445	297	66,7	0,4	0,83	0,54 - 1,27
	Masculino	112	70	62,5			
Idade (anos)	0 - 9	41	12	29,3	<0,0001	7,10	3,24 - 15,5
	10 - 19	155	71	45,8			
	20 - 29	102	74	72,5			
	30 - 39	126	94	74,6			
	40 - 49	61	51	83,6			
	50 - 59	42	38	90,5			
	≥60	22	21	95,5			
Localização	Urbana	77	38	49,4	0,001	2,43	1,45 - 4,08
	Suburbana	273	192	70,3			
	Rural	207	137	66,2			
Vulnerabilidade	Moderada	273	181	66,3	0,2	0,916	0,64 - 1,31
	Alta	269	173	64,3			
	Extrema	15	13	86,7			

Nota: OR - Odds ratio; IC 95% - Intervalo de confiança de 95%.

A infecção por *T. gondii* também foi avaliada quanto à localização da residência e a vulnerabilidade de aquífero na região onde se encontrava a residência do indivíduo. Embora, os indivíduos infectados por *T. gondii* estejam distribuídos por toda a extensão do município, a prevalência foi maior em áreas consideradas como suburbana (70,3%) e com extrema vulnerabilidade de aquíferos (86,7%) (Tabela 5).

5.2. Prevalência da toxoplasmose em humanos por meio da detecção de anticorpos IgG anti-TgERP em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos.

O soro dos 557 indivíduos foi avaliado quanto à presença de anticorpos anti-TgERP por ELISA. Dos 367 indivíduos que apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose no teste de ELISA convencional, 231 (62,9%) apresentaram também sorologia positiva no ELISA TgERP. O anticorpo anti-TgERP foi detectado em 25 indivíduos como sorologia negativa para toxoplasmose no ELISA convencional (Tabela 6). A sorologia destes 25 indivíduos foi reavaliada por ELISA convencional doze meses após a primeira coleta e a sorologia permaneceu inalterada, ou seja, continuou negativa para o teste de ELISA convencional.

Tabela 6: Comparação qualitativa dos resultados da sorologia para toxoplasmose do ELISA convencional e TgERP em soro humano.

	ELISA Convencional (+)	ELISA Convencional (-)	TOTAL
ELISA TgERP (+)	231	25	256
ELISA TgERP (-)	136	165	301
TOTAL	367	190	557

Ao avaliar a infecção por *T. gondii* por meio da detecção de anticorpos IgG anti-TgERP em soro humano por ELISA em relação ao sexo, observou que 224 indivíduos do sexo feminino foram reagentes à toxoplasmose (50,3%) enquanto 30 (26,8%) dos indivíduos do sexo masculino apresentaram sorologia positiva para a toxoplasmose. Esta diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 7). A infecção por *T. gondii* também foi avaliada quanto à localização da residência e a vulnerabilidade de aquífero na região onde se encontrava a residência do indivíduo, não sendo observadas diferenças estatísticas (Tabela 7).

Tabela 7: Prevalência da toxoplasmose por meio de ELISA utilizando antígeno específico de esporozoítio (TgERP) em função de fatores demográficos e de vulnerabilidade de aquíferos. Os valores com significância estatística estão em negrito.

Variáveis		Total	Positivos		Valor p	OR	IC 95%
			n	%			
Sexo	Feminino	445	224	50,3	<0,0001	Ref	
	Masculino	112	32	28,6		2,53	1,62 - 3,97
Idade (anos)	0 - 9	41	9	28,1	<0,0001	Ref	
	10 - 19	155	45	29,0		1,45	0,643 - 3,29
	20 - 29	102	53	52,0		3,85	1,67 - 8,87
	30 - 39	126	73	58,0		4,90	2,16 - 11,1
	40 - 49	61	34	55,7		4,48	1,83 - 11,0
	50 - 59	42	28	66,7		7,11	2,67 - 18,9
	≥60	22	8	36,4		2,03	0,65 - 6,36
Localização	Urbana	77	33	42,9	0,5	Ref	
	Suburbana	273	133	48,2		1,27	0,76 - 2,11
	Rural	207	88	42,5		0,98	0,58 - 1,67
Vulnerabilidade	Moderada	273	123	45,1	0,9	Ref	
	Alta	269	126	46,8		1,07	0,76 - 1,51
	Extrema	15	5	33,3		0,61	0,20 - 1,83

Nota: OR - Odds ratio; IC 95% - Intervalo de confiança de 95%.

Ao avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-TgERP em relação à idade, observou-se que aumento da soropositividade acompanhou o aumento de idade. No entanto, diferentemente do observado no ELISA convencional a soroprevalência de anticorpos anti-TgERP diminuiu nos indivíduos com idade acima dos 60 anos. A prevalência foi menor em ambos os ELISAS nos indivíduos mais jovens, ou seja, com idade de até 20 anos. A maior prevalência foi observada nos indivíduos com idades entre 20 e 59 anos (Tabela 7 e Figura 5).

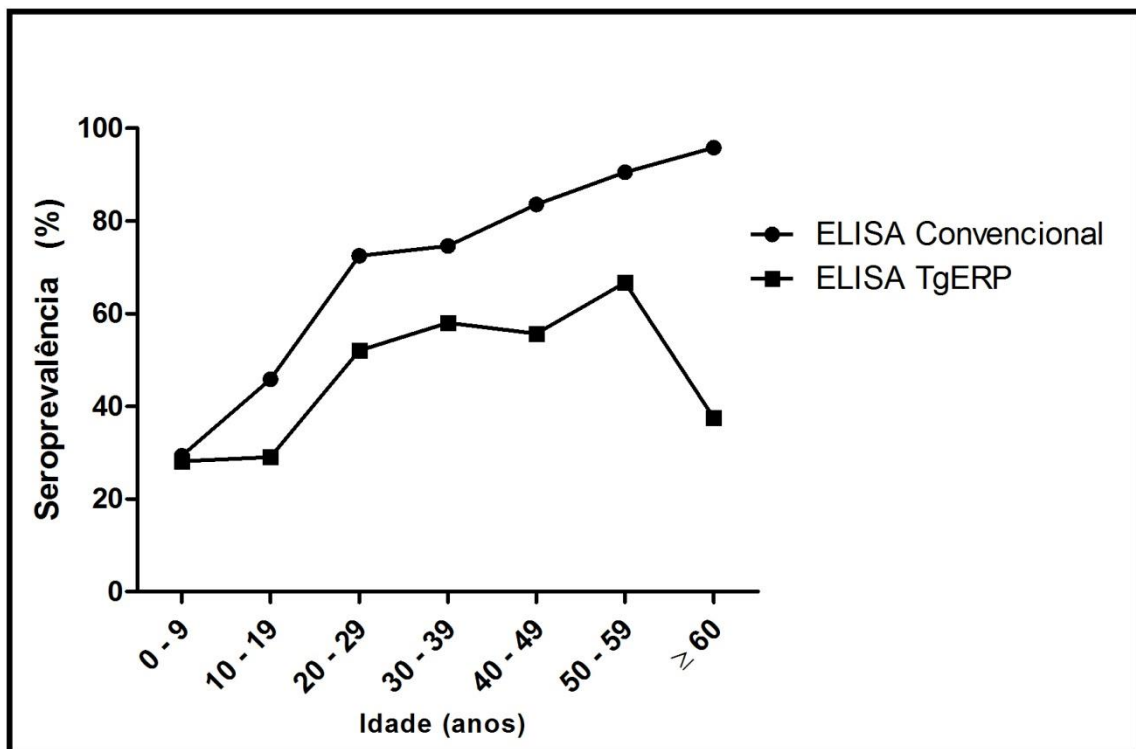


Figura 4: Curvas de comparação da soroprevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* por ELISA convencional e TgERP, de acordo com idade, avaliada em 557 indivíduos.

Com o objetivo de avaliar o grau de reconhecimento antigênico específico para TgERP todos os 256 indivíduos positivos no ELISA TgERP foram avaliados quanto ao valor da densidade óptica (DO). Os níveis de DO foram arbitrariamente considerados como maior que 1 ou menor que 1. A prevalência de indivíduos apresentando um valor de DO maior que 1 foi maior em indivíduos mais jovens e diminuiu com a idade. O contrário foi observado em indivíduos mais velhos onde a prevalência de indivíduos apresentando uma DO menor 1 foi maior e aumentou com a idade (Figura 6).

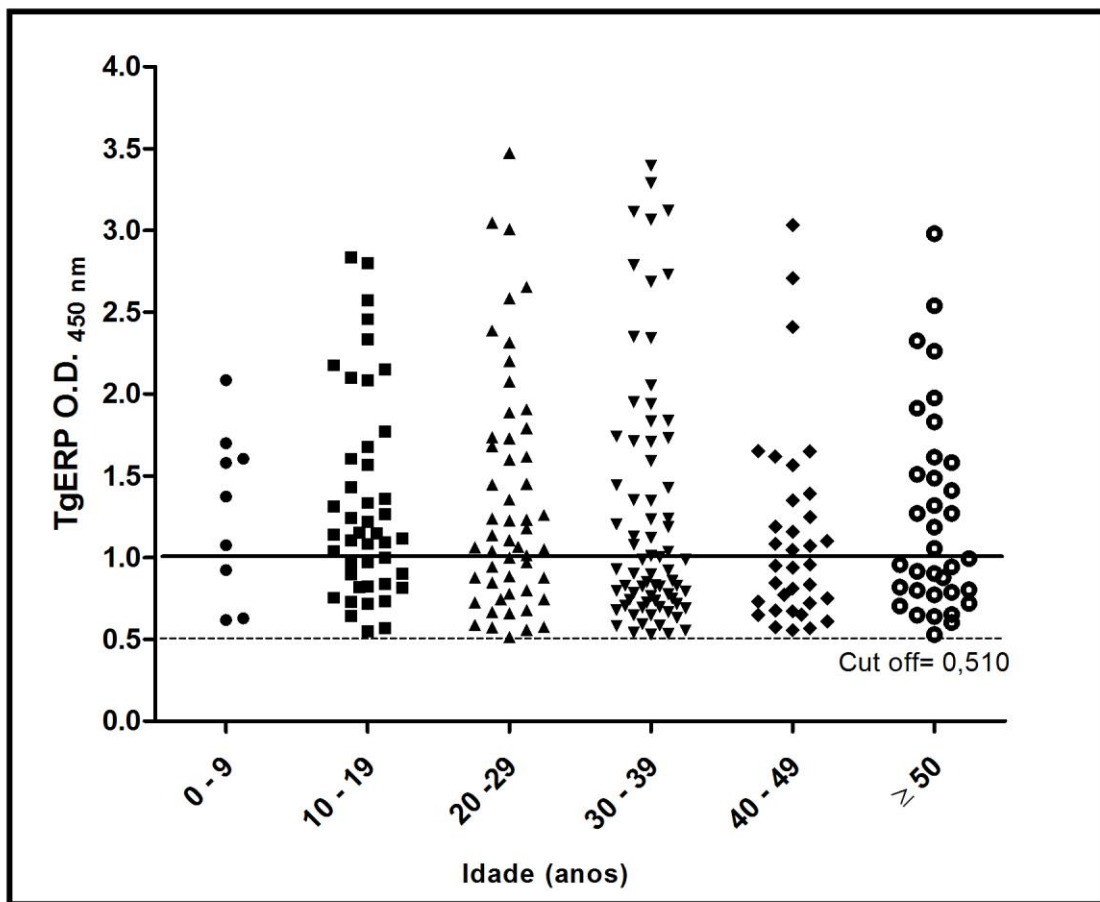


Figura 5: Grau de reconhecimento antigênico no ELISA TgERP em relação a faixa etária da população de estudo (n= 254). Um valor de densidade óptica (OD) maior do que 1 foi estabelecido arbitrariamente (ver material e método).

5.3. Soroprevalência de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* em aves peridomiciliares

A partir do mapa de vulnerabilidade de aquíferos (VIEIRA, 2010), coletas de amostras de sangue de aves peridomiciliares foram realizadas. As áreas urbanas, suburbanas e rurais do município analisadas neste estudo estão assentadas em aquíferos com diferentes graus de vulnerabilidade. Ao longo do ano de 2013 obteve-se material biológico (soro) de 159 aves de cinco regiões de estudo. Das 159 aves, 99 (62,26%) apresentaram sorologia positiva para toxoplasmose no MAT (Tabela 8). Em todas as cinco regiões estudadas foram identificadas aves com sorologia positiva. Ao se comparar a soroprevalência das aves com a respectiva área observou-se que a soroprevalência na área 6 (moderada vulnerabilidade) foi menor do que o observado

em todas as outras áreas ($p=0,0002$), teste de qui-quadrado. A maior soroprevalência foi observada na área 7 de alta vulnerabilidade (Tabela 8).

Tabela 8: Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soro de aves peridomiciliares em Campos dos Goytacazes.

Região	Positivo	Negativo	Total	p
A2	26 (65%)	14 (35%)	40	
A4	13 (81,25%)	3 (18,75%)	16	
A5	28 (82,35%)	6 (17,65)	34	0,0002
A6	27 (42,18%)	37 (57,82%)	64	
A7	5 (100%)	0 (0%)	5	
Total	99 (62,26%)	60 (37,74%)	159	

Ao analisar a soroprevalência da infecção toxoplásmica nas aves peridomiciliares levando em consideração o grau de vulnerabilidade de aquífero da região observou-se que há diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$), Figura 7; tabela 9.

Tabela 9: Soroprevalência da toxoplasmose em soro de frangos em relação ao grau de vulnerabilidade de aquíferos. Os valores com significância estatística encontram-se em negrito.

Grau de vulnerabilidade de aquíferos	Total	Positivos		Valor de p	OR	IC 95%
		n	%			
Moderada	64	27	42,2		Ref	
Alta	55	46	83,6	<0,0001	7	2,94 - 16,72
Extrema	40	26	65	0,03	2,5	1,13 - 5,76

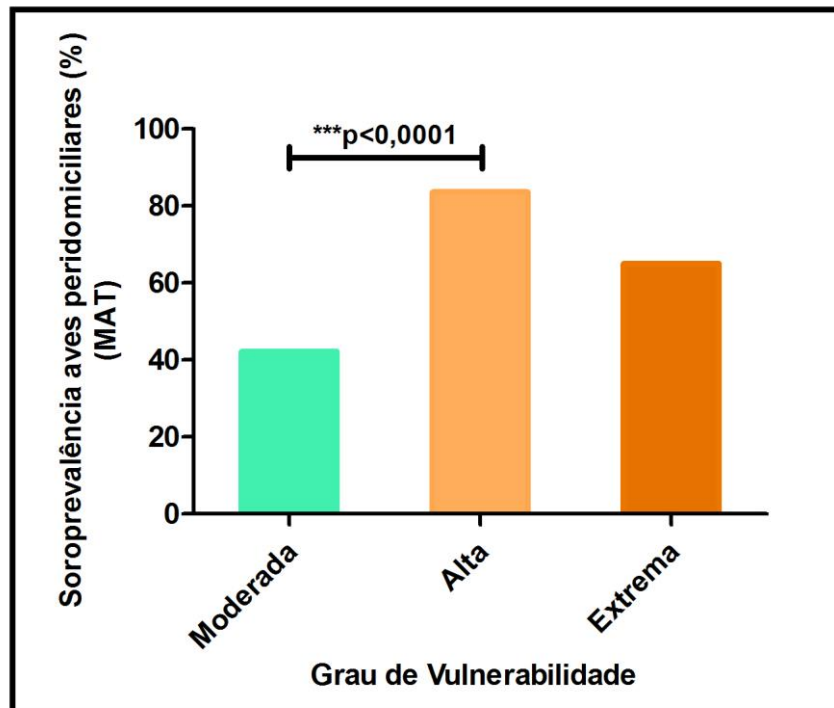


Figura 6: Prevalência da toxoplasmose em aves peridomiciliares considerando o grau de vulnerabilidade de aquíferos da região. As cores na figura representam a soroprevalência em função ao grau de vulnerabilidade e correspondem as cores mostradas no mapa da Figura 4: verde para moderada, laranja claro para alta e laranja escuro para extrema vulnerabilidade.

5.4. Obtenção de isolados viáveis de *Toxoplasma gondii* por bioensaio em camundongos

O bioensaio em camundongos foi realizado com o material (cérebro e coração digeridos) proveniente de 40 aves dentre as 99 com sorologia positiva para a toxoplasmose. Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* nestas aves variaram de 1:25 a 1:6400 (Tabela 10). Dos 40 bioensaios realizados foi possível isolar *T. gondii* viável em 23 (57,5%).

Tabela 10: Frequências absoluta e relativa dos títulos de anticorpos das aves com sorologia positiva no MAT que tiveram seus órgãos (cérebro e coração) inoculados em camundongos.

Título	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
1:25	22	55
1:50	3	7,5
1:100	1	2,5
1:200	4	10
1:400	4	10
1:1600	1	2,5
≥1:6400	5	12,5
TOTAL	40	100

5.5. Caracterização genotípica dos isolados do parasito *Toxoplasma gondii*

A caracterização genotípica de *T. gondii* pela PCR/RFLP foi realizada nos 23 isolados de *T. gondii* obtidos das aves por bioensaio em camundongos. A caracterização genotípica foi realizada do emprego de 11 marcadores, em 17 (73,9%) dos 23 isolados (Tabela 11). Isolados de seis aves apresentaram baixa concentração de DNA de *T. gondii* permitindo somente a obtenção de genótipos parciais, impossibilitando a caracterização genotípica acurada destas amostras.

Tabela 11: Caracterização genética dos isolados de *Toxoplasma gondii* para os 11 marcadores.

Grau de Vulnerabilidade de aquífero	Código amostras	Ave Título (MAT)	SAG1	(5'+3')SAG2	Alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	Genótipo ToxoDB # *
Moderada	16	1:25	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	#36
Moderada	328	1:400	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	#36
Moderada	371	1:400	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	#21
Moderada	63	1≥6400	I	I	II	III	III	III	u-1	III	I	III	I	#110
Moderada	3	1:25	u-1	I	II	III	I	III	II	I	I	I	I	#51
Moderada	64	1:50	u-1	I	II	III	I	III	II	I	I	I	I	#51
Alta	46	1≥6400	I	III	III	III	III	III	u-1	I	III	u-2	III	#248 (New)
Alta	11	1:200	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	#36
Alta	12	1:50	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	III	#247 (New)
Alta	65	1:25	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	III	III	III	#22
Alta	68	1:1600	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	#36
Alta	70	1≥6400	I	I	I	III	I	III	II	I	III	I	III	#36
Alta	365	1:400	II or III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	#2
Alta	367	1≥200	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	#6
Extrema	26	1:25	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	#111
Extrema	30	1≥6400	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	#19
Extrema	60	1:200	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	#19

* Segundo <http://toxodb.org/toxo/>

A genotipagem dos 17 isolados evidenciou a presença de 11 genótipos distintos, incluindo o tipo clonal III e dois genótipos novos (#247, #248) os quais não haviam sido descritos anteriormente (Tabela 10). O genótipo tipo I (ToxoDB RFLP genótipo #6) foi encontrado em um isolado. O parasito foi isolado de 6 aves com títulos de 1:25, 2 com títulos 1:50, 1 com título de 1:100, 5 com títulos de 1:200, 3 com títulos 1: 400, 1 com título 1:1600 e 5 com título 1:6400 ou maior (Tabela 11).

Tabela 12: Distribuição dos isolados de *Toxoplasma gondii* nas cinco áreas de estudo.

Número da área	Grau de Vulnerabilidade	Nº galinhas (159)	Nº e (%) de soropositivos	Nº de aves Bioensaiadas	<i>T. gondii</i> Isolados
A2	Extrema	40	26 (55%)	10	5 (21,7%)
A4	Alta	16	13 (81,2%)	8	2 (8,7%)
A5	Alta	34	28 (82,3%)	11	9 (39,1%)
A6	Baixa/Moderada	64	27 (42,2%)	6	3 (13,0%)
A7	Alta	5	5 (100%)	5	4 (17,4%)
TOTAL		159	99	40	23

A prevalência da toxoplasmose em aves peridomiciliares em relação ao grau de vulnerabilidade de aquíferos da região foi maior nas áreas de alta vulnerabilidade de aquífero (83,6%), Figura 7. Dos onze genótipos identificados, seis (54,5%) foram provenientes de aves das regiões de alta vulnerabilidade de aquífero, incluindo os dois novos genótipos (#247, #248) (Tabela 11).

6. DISCUSSÃO

A prevalência da toxoplasmose varia grandemente de uma região para outra, de país para país e até mesmo dentro de um mesmo país (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Estas diferenças na prevalência da toxoplasmose decorrem principalmente, da localização geográfica, das condições ambientais, dos hábitos culturais (especialmente em relação à alimentação), do grau de desenvolvimento do país e infra-estrutura hídrica e sanitária (REMLINGTON; MCLEOD; DESMONTS, 1995). No mundo, estima-se que um terço da população tenha anticorpos anti-*T. gondii* (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O presente estudo mostrou ser alta a soroprevalência da toxoplasmose na cidade de Campos dos Goytacazes, sendo que 65,9% dos indivíduos apresentaram sorologia positiva para *Toxoplasma gondii*. Esta prevalência é comparável ao encontrado em um levantamento epidemiológico realizado previamente no município de Campos dos Goytacazes, onde a prevalência média desta infecção foi de 73% na população de baixo e médio poder aquisitivo (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Os indivíduos participantes do estudo atual pertencem à população de baixo e médio poder aquisitivo referida no estudo anterior como população 1 (P1) e população 2 (P2) por Bahia-Oliveira e colaboradores (2003). Dos indivíduos estudados, os soropositivos tiveram uma média de idade maior (32,9 anos) do que os indivíduos soronegativos (20,7 anos), sendo observado um aumento progressivo da soropositividade com o passar do tempo ($p < 0,0001$) (Tabela 5). O aumento da idade relaciona-se diretamente com a maior chance de adquirir a infecção por *T. gondii*, explicado pela maior probabilidade que o indivíduo tem em entrar em contato com os diversos fatores de transmissão ao longo dos anos (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DA SILVA et al., 2014; SINGH et al., 2014; SPALDING et al., 2003).

Nenhuma diferença foi observada na sorologia convencional com relação ao fator sexo ($p = 0,4$), corroborando com os resultados já descritos no Brasil (CAVALCANTE et al., 2006; COELHO; KOBAYASHI; CARVALHO, 2003; GARCIA et al., 1999; GIRALDI et al., 2002).

Com relação a localização da residência dos indivíduos este estudo demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,003$). A prevalência dos indivíduos que moram na zona suburbana e rural foi maior do que a soroprevalência

dos indivíduos que moram na zona urbana (Tabela 5). Este resultado se assemelha ao encontrado por Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) nessa mesma região e por SPALDING e colaboradores (2005) na região noroeste do Rio Grande do Sul, onde a prevalência também foi maior na região rural (78%) que na urbana (71,3%). Uma maior prevalência na zona suburbana e rural sugere que os fatores de risco de infecção devem ser maiores nestes locais. Esta maior prevalência associa-se à maior exposição dos indivíduos da zona rural a *T. gondii*, devido às suas atividades relacionadas à terra, portanto com maior exposição aos oocistos. Além disso, a zona rural é caracterizada pela ausência de abastecimento público de água, ausência de coleta de lixo e rede de esgoto que podem estar diretamente associados à infecção por *T. gondii*. As residências localizadas na área suburbana apresentam características tanto urbanas quanto rurais, com presença de animais em pequeno espaço e com pouca condição de higiene o que reflete menor condição socioeconômica dos indivíduos dessa região. Como visto anteriormente (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003) a alta prevalência da toxoplasmose em Campos está relacionada a fatores socioeconômicos: indivíduos de menor poder aquisitivo apresentam maior prevalência da infecção. Estudos mostram que a soropositividade da infecção por *T. gondii* está diretamente relacionada com suas condições de moradia (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2008). Quanto melhores as condições do domicílio, melhores são os padrões socioeconômicos dos moradores e consequentemente seus hábitos alimentares e de higiene.

A ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas e a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados de *T. gondii* é uma via importante de transmissão da toxoplasmose humana. No entanto, não é possível determinar a via de infecção (oocistos ou cistos teciduais) por meio de testes sorológicos convencionais. Neste trabalho, a magnitude da via de transmissão por oocisto foi avaliada por meio deste ELISA específico anti-antígeno de esporozoítio (TgERP). A proporção de indivíduos que apresentaram sorologia positiva no ELISA TgERP foi de 62,9%, o que sugere que a principal de via de infecção da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é por meio da ingestão de oocistos (Tabela 7). Esse resultado corrobora com estudos prévios que demonstraram por meio de inquéritos epidemiológicos a importância da transmissão via oocistos nessa região (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Outros trabalhos mostram

que a proporção da população humana que adquire a infecção pela ingestão de oocistos é maior do que se imaginava, aproximadamente 78% nos Estados Unidos (BOYER et al., 2011) e 43% no Chile (MUNOZ-ZANZI et al., 2010).

A prevalência de indivíduos positivos no ELISA TgERP aumentou progressivamente com a idade até os 39 anos, semelhante ao observado no ELISA convencional (Figura 5). Fato interessante é que na faixa etária de 30 a 60 anos a soroprevalência da toxoplasmose no ELISA TgERP se manteve estável em torno de 60,1%, o que sugere exposição contínua a oocistos de *T. gondii*, visto que o TgERP não se constitui em estímulo imunológico contínuo sendo transitória a sua apresentação no curso do desenvolvimento do organismo *T. gondii*, em seus hospedeiros. Os anticorpos anti-TgERP persistem no soro por cerca de 6 a 8 meses após a infecção (HILL et al., 2011) em estudos realizados em indivíduos com exposição esporádica à infecção. A re-infecção em áreas endêmicas para a toxoplasmose tem sido sugerida e precisa ser mais profundamente investigada. Dos 557 indivíduos amostrados no estudo, 25 apresentaram sorologia negativa no ELISA convencional e sorologia positiva no ELISA TGERP. Uma possível explicação para este dado é a possibilidade de que a diversidade antigênica de parasitos circulantes nesta região gere uma resposta imune que não é 100% coberta pelos testes sorológicos convencionais, que são baseados em antígenos de cepas clonais.

O grau de reconhecimento antigênico específico para TgERP foi avaliado em todos os 256 indivíduos positivos no ELISA TgERP (Figura 6). A prevalência de indivíduos apresentando valor de OD maior que 1 foi maior em indivíduos mais jovens e diminuiu com a idade. O contrário foi observado em indivíduos mais velhos onde a prevalência de indivíduos apresentando OD menor 1 foi maior e aumentou com a idade (Figura 6). Adicionalmente, a prevalência no ELISA TgERP em indivíduos com idade superior a 60 anos diminuiu. Esses dados corroboram dados epidemiológicos que mostram que indivíduos mais jovens são mais susceptíveis à infecção por toxoplasmose do que indivíduos mais velhos e ilustra a magnitude da transmissão via oocistos em indivíduos mais jovens.

A soroprevalência da toxoplasmose humana pelo ELISA convencional e pelo ELISA TgERP também foi avaliada em relação ao grau de vulnerabilidade de aquífero da região e não foi observada significância estatística entre qualquer das duas variáveis sorológicas e o grau de vulnerabilidade do aquífero (Tabela 5 e 7).

Observa-se que há tendência entre o aumento em paralelo (coincidente) da prevalência da toxoplasmose humana avaliada pelo ELISA convencional e o aumento do grau de vulnerabilidade de aquífero, como observado na tabela 5. A maior prevalência foi observada na área de extrema vulnerabilidade (86,7%). Surpreendentemente a prevalência da toxoplasmose no ELISA TgERP foi menor na área de extrema vulnerabilidade de aquífero (Tabela 7). Esse resultado deve ser interpretado com cautela e pode decorrer do fato de que a média de idades dos indivíduos na área de extrema vulnerabilidade de aquífero foi maior (49,9 anos \pm 17,7) do que o observado na área de moderada (28 anos \pm 16,6) e alta vulnerabilidade (28,3 anos \pm 17,7). Como discutido acima a soroprevalência dos indivíduos no ELISA TgERP tende a diminuir nos indivíduos mais velhos, como o observado na curva da Figura 5.

A soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em frangos de vida livre de diferentes regiões do mundo tem sido extensivamente avaliada com o objetivo de estimar o nível de contaminação do solo por oocistos de *T. gondii* (DA SILVA et al., 2003; DUBEY et al., 2008e; MORE et al., 2012).

No presente estudo, anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 99 das 159 aves avaliadas (62,3%) das cinco diferentes regiões de Campos dos Goytacazes (Tabela 8). Resultados similares (65%) foram encontrados em um estudo conduzido em Campos dos Goytacazes em 2001 (DA SILVA et al., 2003). Aqui reavaliamos o nível de contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* em Campos dos Goytacazes e comparamos a soroprevalência da infecção toxoplásmica em aves com a vulnerabilidade de aquíferos desta região. Das cinco áreas, todas apresentam aves com sorologia positiva para toxoplasmose, mostrando que a contaminação por oocistos de *T. gondii* nessa região ainda permanece alta. Ao comparar a soroprevalência das aves com as respectivas áreas observou-se que a soroprevalência na área 6 (moderada vulnerabilidade) apresentou a menor a soroprevalência em todas as outras áreas estudadas ($p=0,0002$, teste do qui-quadrado para tendência linear, com nível de significância de 5%). A maior soroprevalência foi observada na área 7 (alta vulnerabilidade) (Tabela 8).

Os animais de maneira geral são considerados melhores indicadores da contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*, pois tendem a ficar restritos ao ambiente onde vivem, de modo que a chance de adquirir a infecção fique limitada às

condições do ambiente onde vivem. Por outro lado, a transmissão da toxoplasmose humana não fica restrita somente às condições do ambiente, visto que os seres humanos apresentam maior mobilidade que os animais. Além disso, a soroprevalência humana pode ser influenciada por outros fatores de risco para a toxoplasmose tais como os determinados por hábitos alimentares.

Dos 40 bioensaios realizados em camundongos foi possível a obtenção de 23 isolados de *T. gondii* (57,5%). As áreas que apresentaram maior número de isolados em relação ao número de bioensaios realizados foram as áreas 5 (9 de 11) e 7 (4 de 5) (Tabela 12). Estas áreas estão localizadas na região urbana/suburbana do município e apresentam aquíferos de alta vulnerabilidade. As aves desta região eram normalmente mantidas em pequenos quintais no fundo das casas com pouca condição de higiene, muitas vezes convivendo no mesmo espaço com outros animais, como gatos e cachorros. Esse fato evidencia a importância epidemiológica da contaminação do solo por oocistos de *T. gondii* em áreas endêmicas, onde as pessoas vivem com poucas condições de higiene e utilizam muitas vezes água proveniente de poços rasos tipo cacimbas para consumo.

A caracterização genotípica de isolados de *T. gondii*, por métodos moleculares, tem sido realizada em amostras provenientes de animais domésticos e humanos em todo o mundo. O presente estudo caracterizou genotipicamente amostras de 23 isolados de frangos de vida livre de cinco áreas do município de Campos dos Goytacazes (Tabela 11). A genotipagem das 23 amostras evidenciou a presença de 11 genótipos distintos, dos quais 2 nunca haviam sido descritos anteriormente e um nunca havia sido descrito no Brasil. A magnitude destes achados é comparável com a diversidade genética encontrada em outros estudos realizados no Brasil. Dois genótipos (#247 e #248) dos 11 genótipos foram considerados novos e oito deles tiveram apenas um único isolado. O genótipo tipo BRI (ToxoDB RFLP genotype #6) foi também encontrado no presente estudo o que confirma que este genótipo é amplamente distribuído em diferentes regiões do Brasil. A diversidade genética dos isolados de Campos tem sido estudada por um longo tempo (DA SILVA et al., 2003; DUBEY et al., 2008e) e os genótipos investigados (Toxo DB PCR-RFLP genótipo 2 (type III), 6 (type BrI), 11 (type BrII), 17, 19, 22, 33, 36, 37, 40, 51, 59, 65, 71, 75, 82, 93, 94, 107, 135, 138). Neste estudo encontramos os genótipos tipo #2, #6, #19, #21, #22, #36 e # 51 já descritos

anteriormente neste município, mostrando que estes genótipos são comuns nessa região. Os genótipos #22, #36, #247 e #248 foram encontrados apenas nesta região. A alta proporção de genótipos encontrados em Campos dos Goytacazes é consequência de um ambiente altamente contaminado com oocistos de *T. gondii*. Os isolados #2, #6, #19, #21, #51 e #111 descritos aqui também foram identificados em outros estudos realizados no Brasil (DUBEY et al., 2007; DUBEY et al., 2008e; PENA et al., 2008). Inesperadamente, o genótipo #110 encontrado neste estudo foi descrito uma única vez em carneiros nos Estados (DUBEY et al., 2008f). Estes resultados mostram uma grande variabilidade genética de *T. gondii* entre as aves amostradas e corroboram os dados obtidos e os dados de estudos realizados em humanos (FERREIRA et al., 2011) e em animais domésticos (DUBEY et al., 2012; DUBEY et al., 2008f; LEHMANN et al., 2006; PENA et al., 2008), mostrando que, no Brasil, a variabilidade genética de *T. gondii* é alta, independente da espécie de hospedeiro estudada ou mesmo do ambiente onde esta vive.

Uma notável proporção de genótipos revelados usando PCR-RFLP apresenta isolados únicos, como o observado neste estudo. A presença de múltiplos isolados de um mesmo genótipo é frequentemente relacionada com uma clonalidade endêmica que é característica de regiões com a presença de genótipos clonais (PENA et al., 2008). O estudo da diversidade genética de isolados de *T. gondii* é muito importante, pois permite melhor entendimento da estrutura populacional do parasito. Mais estudos no Brasil são necessários, pois provavelmente a diversidade genética de *T. gondii* é muito maior do que a já observada. A estrutura populacional de *T. gondii* no Brasil indica que algumas linhagens clonais têm se espalhado e tornado endêmicas em algumas regiões e no país (PENA et al., 2008).

A contaminação ambiental e a alta endemicidade da toxoplasmose humana em Campos dos Goytacazes abriram novas perspectivas sobre o impacto da contaminação ambiental na transmissão hídrica da toxoplasmose no município. Trabalhos anteriores (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DA SILVA et al., 2003) e este demonstram que o solo desta região é altamente contaminado por oocistos de *T. gondii*. A capacidade destes oocistos de serem removidos por filtração dentro do solo ou por predação é desconhecido. Em experimentos realizados em caixas de solo (ATWILL et al., 2006) ou estudos em laboratórios (TATE; PEREIRA; ATWILL, 2004), as concentrações de oocistos de *Cryptosporidium* foram reduzidos por um a

três unidades log por metro de tampão com vegetação (SIMON et al., 2013b), sugerindo que poucos oocistos conseguiriam percolar por longas distâncias no solo. No entanto, outras evidências sugerem que oocistos de *T. gondii* presentes no ambiente terrestre podem atingir os ecossistemas marinhos por meio do escoamento de água superficial, resultando na infecção de mamíferos marinhos, como lontras do mar (MILLER et al., 2008) bem como outros mamíferos marinhos em vários estudos pelo mundo (DUBEY, 2010a). No ártico Canadense, focas com sorologia positiva para a toxoplasmose foram encontrados (SIMON et al., 2011). No entanto, felídeos selvagens e domésticos são os únicos hospedeiros descritos como capazes de eliminar oocistos de *T. gondii* e são praticamente inexistentes no ártico Canadense. Segundo Simon, a infecção de focas por *T. gondii* pode ser devido à contaminação de ambientes marinhos por oocistos excretados por felinos vivendo na região sul do ártico e transportados via escoamento de água doce para os estuários ao longo da costa ártica do Canadá, (SIMON et al., 2013a). Estes estudos demonstram que os oocistos de *T. gondii* podem percorrer longas distâncias sendo carregados por águas das chuvas e assim contaminando outros mananciais.

Considerando que aquífero é toda formação geológica subterrânea que funciona como reservatório de água, sendo alimentado pelas águas das chuvas que se infiltram no subsolo e que seu grau de vulnerabilidade é dado por suas condições hidrogeológicas, pode-se então inferir que as características hidrogeológicas de uma região podem contribuir para a maior ou menor dispersão de oocistos de *T. gondii* do ambiente terrestre para o aquático. Além disso, o ambiente aquático é favorável a preservação e enriquecimento da diversidade genética do parasito, pois este ambiente “líquido” permite a formação de uma solução rica em oocistos, favorecendo assim a sua distribuição e permanência por mais tempo no ambiente. Nesse sentido, este estudo utiliza uma abordagem de investigação que considera o grau de vulnerabilidade de aquífero do município de Campos dos Goytacazes em relação à prevalência da toxoplasmose humana e em aves peridomiciliares. Neste trabalho observou-se maior prevalência da toxoplasmose humana e em aves peridomiciliares em regiões de alta e extrema vulnerabilidade de aquíferos. A relação entre o aumento da vulnerabilidade de aquífero e maiores taxas de prevalência da toxoplasmose humana e animal demonstram que há associação entre os parâmetros hidrogeológicos e a prevalência da infecção por meio da

ingestão de oocistos. Espera-se que esta metodologia poderá ser reproduzida em outras áreas, contribuindo assim, para o desenvolvimento de estratégias que visem reduzir o risco da infecção por *T. gondii*. Estudos futuros utilizando partículas como as microesferas carboxilada em trabalhos de laboratórios e de campo (SHAPIRO et al., 2009) e aves sentinelas poderão ajudar a elucidar importantes aspectos da contaminação de solos e recursos hídricos por oocistos de *T. gondii*.

Análise dos resultados mostra que após 10 anos a prevalência da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes permanece alta e os fatores de riscos que predispoem para a infecção ainda são os mesmos relatados em estudos anteriores (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Essa constatação pode ser expandida a nível nacional. O Brasil tem contribuído com importante parcela da produção de conhecimentos básicos e aplicados à toxoplasmose. No entanto, o país não apresenta políticas públicas definidas de atenção à toxoplasmose como tem a França, por exemplo, onde a alta prevalência caiu drasticamente após adoção de medidas preventivas direcionadas para os fatores de risco locais (NOGAREDA et al., 2014). Conhecer a prevalência da toxoplasmose, bem como os principais fatores de risco para a sua transmissão na população geral, e principalmente em mulheres em idade fértil são de essencial importância para a elaboração de programas estratégicos de prevenção da toxoplasmose adquirida e congênita.

7. CONCLUSÕES

A soroprevalência da toxoplasmose em Campos dos Goytacazes estimada pelo ELISA convencional na população geral foi de 65,9% mostrando que a prevalência para a toxoplasmose permanece elevada conforme mostrado em estudo anterior (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Dos indivíduos positivos no ELISA convencional, 62,9% foram positivos no ELISA TgERP demonstrando a importância da transmissão por oocistos de *T. gondii* nessa região.

A caracterização genotípica de *T. gondii* pela PCR/RFLP foi realizada nos 23 isolados de *T. gondii* obtidos das aves pelo bioensaio em camundongos, sendo possível realizar a caracterização genotípica completa, isto é, a análise dos 11 marcadores, em 17 (73,9%) dos 23 isolados. Essa alta proporção de genótipos encontrados em Campos dos Goytacazes é consequência de um ambiente altamente contaminado com oocistos de *T. gondii* e é comparável com a diversidade genética encontrada em outros estudos realizados no Brasil.

Maior prevalência da toxoplasmose humana e animal foi observada nas áreas de alta e extrema vulnerabilidade de aquíferos. A correlação entre a vulnerabilidade de aquíferos e a prevalência da toxoplasmose animal e humana estimada pelo ELISA convencional e pelo ELISA anti- antígenos de esporozoítos é inédita e revela-se estratégia de valor para estudo de relação da infecção humana e animal *versus* contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*. Portanto, recomenda-se que seja realizada em outros locais.

A utilização de mapas hidrogeológicos mostrou-se viável e poderá ser utilizada para a elaboração de estratégias que visem a redução do risco de infecção via oocistos de *T. gondii* bem como para o estudo de outros parasitos de veiculação hídrica. Neste sentido, abrem-se novas perspectivas nos estudos que visem avaliar/estimar a contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J. M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Rev Mol Med**, v. 2001, p. 1-19, Jan 6 2001.

AJZENBERG, D. et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **J Infect Dis**, v. 186, n. 5, p. 684-9, Sep 1 2002.

ALBINET, M.; MARGAT, J. Cartographie de la vulnérabilité à la pollution des nappes d'eau souterraine. **Bull BRGM**, v. 3, n. 4, p. 13-22, 1970.

ALLER, L. et al. DRASTIC: a standardized system for evaluating ground water pollution potential using hydrogeologic settings. **US Environmental Protection Agency, Ada, OK**, v. EPA/600/2, p. 2-878-03, 1987.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in waste pickers and waste workers in Durango, Mexico. **Zoonoses Public Health**, v. 55, n. 6, p. 306-12, Aug 2008.

ATWILL, E. R. et al. Efficacy of natural grassland buffers for removal of *Cryptosporidium parvum* in rangeland runoff. **J Food Prot**, v. 69, n. 1, p. 177-84, Jan 2006.

AUER, H. et al. Clinical and diagnostic relevance of the *Toxoplasma* IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Austria. **Parasitol Res**, v. 86, n. 12, p. 965-70, Dec 2000.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 55-62, Jan 2003.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 9, p. 426-30, Sep 2003.

BELTRAME, M. A. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Vet Parasitol**, v. 188, n. 3-4, p. 225-30, Sep 10 2012.

BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cell Microbiol**, v 13, n.6, p 797-805, Apr 28 2011.

BESSIERES, M. H. et al. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 7, p. 605-8, Jul 1992.

BOBIC, B.; SIBALIC, D.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. **Gynecol Obstet Invest**, v. 31, n. 3, p. 182-4, 1991.

BOYER, K. et al. Unrecognized ingestion of *Toxoplasma gondii* oocysts leads to congenital toxoplasmosis and causes epidemics in North America. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 11, p. 1081-9, Dec 2011.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 83-9, Feb 2007.

CAVALCANTE, G. T. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. **J Parasitol**, v. 92, n. 3, p. 647-9, Jun 2006.

CHRISTIE, E.; PAPPAS, P. W.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of excystation of *Toxoplasma gondii* oocysts. **J Protozool**, v. 25, n. 4, p. 438-43, Nov 1978.

COELHO, R. A.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO, L. B., JR. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 4, p. 229-31, Jul-Aug 2003.

COHEN, S. N. Toxoplasmosis in patients receiving immunosuppressive therapy. **JAMA**, v. 211, n. 4, p. 657-60, Jan 26 1970.

DA SILVA, D. S. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. **J Parasitol**, v. 89, n. 2, p. 394-6, Apr 2003.

DA SILVA, M. G. et al. Epidemiological factors associated with seropositivity for toxoplasmosis in pregnant women from Gurupi, State of Tocantins, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 4, p. 469-75, Jul 2014.

DE MOURA, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 326-9, Feb 2006.

DE OLIVEIRA, L. N. et al. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the northeast region of Brazil. **J Parasitol**, v. 95, n. 1, p. 235-7, Feb 2009.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. **N Engl J Med**, v. 290, n. 20, p. 1110-6, May 16 1974.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **J Clin Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 562-8, Jun 1980.

DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 933-9, Mar 22 1996.

DOERFLIFER, N.; JEANNIN, P. Y.; ZWAHLEN, F. Water vulnerability assessment in karst environments: a new method of defining protection areas using a multi-attribute approach and GIS tools (EPIK method). **Environmental Geology**, v. 39, n. 2, 1999.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocysts*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In **Parasitic Protozoa**, ed. J. P. Kreier. 101-237, New York: Academic Press, 1977.

_____. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. **Vet Parasitol**, v. 71, n. 4, p. 307-10, Aug 1997.

_____. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Vet Parasitol**, v. 74, n. 1, p. 75-7, Jan 15 1998b.

_____. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60-73, Feb 2010b.

DUBEY, J.P; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of animals and humans. 1^a Ed. Boca Raton, CRC Press, 220p, 1988.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Vet J**, v. 19, n. 4, p. 337-9, Jul 1987.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **J Protozool**, v. 19, n. 1, p. 155-77, Feb 1972.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **J Parasitol**, v. 92, n. 1, p. 36-40, Feb 2006.

DUBEY, J. P. et al. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 1, p. 99-105, Jan 2002.

DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **J Parasitol**, v. 89, n. 4, p. 851-3, Aug 2003b.

DUBEY, J. P. et al. Endemic toxoplasmosis in pigs on a farm in Maryland: isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 94, n. 1, p. 36-41, Feb 2008d.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 11, p. 1257-78, Sep 2008a.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 267-99, Apr 1998.

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

_____. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. **J Am Vet Med Assoc**, v. 157, n. 11, p. 1767-70, Dec 1 1970b.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 3, p. 229-34, Nov 14 2003a.

DUBEY, J. P. et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from raccoons (*Procyon lotor*), cats (*Felis domesticus*), striped skunk (*Mephitis mephitis*), black bear (*Ursus americanus*), and cougar (*Puma concolor*) from Canada. **J Parasitol**, v. 94, n. 1, p. 42-5, Feb 2008b.

DUBEY, J. P. et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 2, p. 182-8, Jan 31 2007.

DUBEY, J. P. et al. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 8-9, p. 999-1006, Jul 2008c.

_____. DUBEY, J.P. Toxoplasmosis of animals and humans. 2^a Ed. Boca Raton, CRC Press, 305p, 2010a.

_____. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 8-9, p. 999-1006, Jul 2008f.

DUBEY, J. P. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, Nov 7 2008e.

DUMÈTRE, A; DARDÉ, M.L. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. **Parasitol Res**. v. 4, n 101, p 989–996, May 2007. DUMÈTRE, A; DARDÉ, M.L. Detection of *Toxoplasma gondii* in water by an immunomagnetic separation method targeting the sporocysts. **Parasitol Res**. v. 4, n 101, p 989–996, May 2007.

EISENDLE-FLÖCKNER, U.; HILBERG, S. Hard rock aquifers and free-living nematodes - an interdisciplinary approach based on two widely neglected components in groundwater research. **Ecohidrol.**, 2014.

ELYASI, H. et al. Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 9, p. 1349-55, Sep 2010.

FELDMAN, H. A. The clinical manifestations and laboratory diagnosis of toxoplasmosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 2, n. 3, p. 420-8, May 1953.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133-48, Mar 2009.

FERGUSON, D.J. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? **Trends Parasitol**, v.18, n. 8, p. 355-359, Aug 2002.

FERGUSON, D. J. et al. An ultrastructural study on the excystation of the sporozoites of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathol Microbiol Scand B**, v. 87, n. 5, p. 277-83, Oct 1979.

FERREIRA ADE, M. et al. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 1, p. 22-31, Jan 2006.

FERREIRA, I. M. et al. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. **Exp Parasitol**, v. 129, n. 2, p. 190-5, Oct 2011.

FOSTER, S. S. D. Fundamental concepts in aquifer vulnerability, pollution risk and protection strategy. 1987.

FOSTER, S. S. D.; HIRATA, R. Groundwater risk assessment: a methodology using available data. **CEPIS** Lima. 1988

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Effects of freezing on the viability of *toxoplasma* oocysts. **J Parasitol**, v. 59, n. 3, p. 587-8, Jun 1973.

FRENKEL, J. K.; JACOBS, L. Ocular toxoplasmosis; pathogenesis, diagnosis and treatment. **AMA Arch Ophthalmol**, v. 59, n. 2, p. 260-79, Feb 1958.

FRENKEL, J. K.; RUIZ, A.; CHINCHILLA, M. Soil survival of *toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. **Am J Trop Med Hyg**, v. 24, n. 3, p. 439-43, May 1975.

GARCIA, J. L. et al. [Seroprevalence, epidemiology and ocular evaluation of human toxoplasmosis in the rural zone Jauguapita (Parana) Brazil]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 6, n. 3, p. 157-63, Sep 1999.

GIRALDI, N. et al. *Toxoplasma* antibody and stool parasites in public school children, Rolandia, Parana, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 3, p. 215-9, May-Jun 2002.

GRIGG, M. E. et al. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 184, n. 5, p. 633-9, Sep 1 2001.

GUIMARAES, A. C. et al. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the Sao Paulo metropolitan region. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 35, n. 6, p. 479-83, Nov-Dec 1993.

HILL, D. et al. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 97, n. 2, p. 328-37, Apr 2011.

HIRATA, R. C. A. Recursos Hídricos. In: TEIXEIRA, W., TOLEDO, M. C. M., FAIRCHILD, T. R., TAIOLI, F., *Decifrando a Terra*, 2000.

HOWE, D. K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 6, p. 1411-4, Jun 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**, v. 172, n. 6, p. 1561-6, Dec 1995.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 766-78, Nov 2012.

IBGE - Censo Populacional 2013 - Estado do Rio de Janeiro *Censo Populacional 2013 - Estado do Rio de Janeiro* Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (29 de novembro de 2013). Visitado em 23 de novembro de 2014.

JACOBS, L. *Toxoplasma* and Toxoplasmosis. **Annu Rev Microbiol**, v. 17, p. 429-50, 1963.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 46, p. 11-21, Feb 1960.

JANKŮ, J. Pathogenesa a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolombu žluté skvrany voku normálně velikem a microphthalmickém s nalezem parazitu v sítnici. Časopis lékařů českých. **Cas. Lék. Cesk**, v. 62, p. 1021–1027, 1052–1059, 1081–1085, 1111-111, 1138–1143, 1923.

JANKŮ, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retine. **Cesk. Parasitol.**, v. 6, p. 9-58, 1959.

KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 6, p. 645-55, May 2011.

KHAN, A. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 9, p. 2980-92, 2005.

KNIEL, K. E. et al. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. **J Parasitol**, v. 88, n. 4, p. 790-3, Aug 2002.

KOTULA, A. W. et al. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 9, p. 687-90, 1991.

KOURENTI, C., et al, Development and application of different methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in water. **Appl Environ Microbiol**. v 1, n 169, p 102–106, Jan 2003.

KUTICIC, V.; WIKERHAUSER, T. Studies of the effect of various treatments on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts and oocysts. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 219, p. 261-5, 1996.

LE GRAND, H. System for evaluating contamination potencial for same waste sites. **American Water Work Association Journal**, v. 56, n. 8, p. 959-974, 1964.

LEHMANN, T. et al. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 30, p. 11423-8, Jul 25 2006.

- LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 5, p. 198-201, May 2002.
- MAENZ, M. et al. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Prog Retin Eye Res**, v. 39, p. 77-106, Jan 2014.
- MEHLHORN, H.; FRENKEL, J. K. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. **J Parasitol**, v. 66, n. 1, p. 59-67, Feb 1980.
- MILLER, M. A. et al. An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 3, p. 275-84, Mar 9 2004.
- MILLER, M. A. et al. Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: new linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 11, p. 1319-28, Sep 2008.
- MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 185 Suppl 1, p. S73-82, Feb 15 2002.
- MORE, G. et al. *Toxoplasma gondii* infection in sentinel and free-range chickens from Argentina. **Vet Parasitol**, v. 184, n. 2-4, p. 116-21, Mar 23 2012.
- MUNOZ-ZANZI, C. A. et al. *Toxoplasma gondii* oocyst-specific antibodies and source of infection. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1591-3, Oct 2010.
- MURAT, J. B. et al. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 9, p. 943-56, Sep 2013.
- NASCIMENTO, F. S. Desenvolvimento de novas metodologias para detecção de oocistos de *Toxoplasma gondii* em fontes de água doce. 2004. vi, 43 f., il. Trabalho Monográfico - Bacharelado em Ciências Biológicas, 2004
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 5^a ed., Rio de Janeiro, Atheneu, 381p, 1985.
- NICOLLE, M. C.; MANCEAUX, L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma* N. Gen). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, Mar 2009.

NOGAREDA, F. et al. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. **Epidemiol Infect**, v. 142, n. 8, p. 1661-70, Aug 2014.

ORÉFICE, F; BONFIOLI, A. Toxoplasmose. In F Oréface, *Uveíte Clínica e Cirúrgica*, Cultura Médica, Rio de Janeiro, p. 620-678, 2000.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 12, p. 1385-94, Oct 2009.

PENA, H. F. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 5, p. 561-9, Apr 2008.

REMINGTON, J,S, MCLEOD, R., DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. Philadelphia: **W. B. Saunders**; p. 140-267, 1995.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 941-5, Mar 2004.

RIEMANN, H. P. et al. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. **J Pediatr**, v. 87, n. 4, p. 573-6, Oct 1975.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Apr 2012.

ROBERTS, F.; MCLEOD, R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Paeasitol Today*, v.15, n. 2, p. 51-57, Feb 1999.

RUSKIN, J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the compromised host. **Ann Intern Med**, v. 84, n. 2, p. 193-9, Feb 1976.

SABIN, A. B. Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. **Adv Pediatr** v. 1, p. 1-53, 1942.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660-3, Dec 10 1948.

SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **JAMA**, v. 248, n. 14, p. 1728-32, Oct 8 1982.

SANTOS, T. R. et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 161, n. 3-4, p. 324-6, May 12 2009.

SCHLUTER, D. et al. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int J Med Microbiol**, Sep 10 2014.

SEMADS – SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. Ambiente das Águas do Estado do Rio de Janeiro. Projeto PLANÁGUA –SEMADS/GTZ / Coordenador William Weber. Rio de Janeiro. 230p, 2001.

SEPULVEDA-ARIAS, J. C. et al. Toxoplasmosis as a travel risk. **Travel Med Infect Dis**, Jun 7 2014.

SHAPIRO, K. et al. Surface properties of *Toxoplasma gondii* oocysts and surrogate microspheres. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 4, p. 1185-91, Feb 2009.

SHEFFIELD, H. G.; MELTON, M. L. *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 892-3, Feb 6 1970.

SHWAB, E., et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, p 453-61, Apr 2014.

SIMON, A. et al. Spatio-temporal variations and age effect on *Toxoplasma gondii* seroprevalence in seals from the Canadian Arctic. **Parasitology**, v. 138, n. 11, p. 1362-8, Sep 2011.

SIMON, A. et al. Fate and transport of *Toxoplasma gondii* oocysts in seasonally snow covered watersheds: a conceptual framework from a melting snowpack to the Canadian arctic coasts. **Int J Environ Res Public Health**, v. 10, n. 3, p. 994-1005, Mar 2013a.

SIMON, A. et al. Hydrological modelling of *Toxoplasma gondii* oocysts transport to investigate contaminated snowmelt runoff as a potential source of infection for

marine mammals in the Canadian Arctic. **J Environ Manage**, v. 127, p. 150-61, Sep 30 2013b.

SINGH, S. et al. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in Indian women of child bearing age and effects of social and environmental factors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, p. e2737, Mar 2014.

SLIFKO, T. R.; SMITH, H. V.; ROSE, J. B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1379-93, Nov 2000.

SPALDING, S. M. et al. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 2, p. 173-7, Mar-Apr 2005.

SPALDING, S. M. et al. [Prospective study of pregnant women and babies with risk of congenital toxoplasmosis in municipal district of Rio Grande do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 4, p. 483-91, Jul-Aug 2003.

SPEER, C. A.; CLARK, S.; DUBEY, J. P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 84, n. 3, p. 505-12, Jun 1998.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 2, p. 193-206, Feb 2005.

SPLENDORE, A. On a new protozoan parasite of rabbits. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, March 2009.

SU, C. et al. Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 16, p. 10753-8, Aug 6 2002.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-11, Jan 2010.

SU, C. et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 15, n 109, p 5844 – 9, Apr 2012

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. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 7, p. 841-8, Jun 2006.

SUNDAR, N. et al. Genetic diversity among sea otter isolates of *Toxoplasma gondii*. **Vet Parasitol**, v. 151, n. 2-4, p. 125-32, Feb 14 2008.

SWIERZY, I. J. et al. *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. **Int J Parasitol**, v. 44, n. 2, p. 91-8, Feb 2014.

TATE, K. W.; PEREIRA, M. D.; ATWILL, E. R. Efficacy of vegetated buffer strips for retaining *Cryptosporidium parvum*. **J Environ Qual**, v. 33, n. 6, p. 2243-51, Nov-Dec 2004.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364-9, Mar 2009.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, Nov 2000.

TORRES, C. M. Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, Encephalitozoon chagasi, N. sp., observe dans un cas de meningo-encephalo-myelite congenitale avec myosite et myocardite. **C R Soc Biol**, v. 97, p. 1787–1790, 1927.

VIEIRA, F.P. *Correlação entre a vulnerabilidade de aquíferos e a prevalência da toxoplasmose humana e animal em Campos dos Goytacazes – Região norte do estado do Rio de Janeiro*. 2010. 61f. **Dissertação** (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

VILLENA, I. et al. Detection of specific immunoglobulin E during maternal, fetal, and congenital toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 11, p. 3487-90, Nov 1999.

VILLENA, I., et al. Evaluation of strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. **Appl Environ Microbio**. v. 7, n 70, p 4035–4039, Jul 2004.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 87, n. 1, p. 211-6, Oct 1954.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 895-901, Jul 1 2009.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Front Biosci**, v. 5, p. D391-405, Apr 1 2000.

WHITE, M. W.; RADKE, J. R.; RADKE, J. B. Toxoplasma development - turn the switch on or off? **Cell Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 466-72, Apr 2014.

WILDER, H. C. *Toxoplasma* chorioretinitis in adults. **AMA Arch Ophthalmol**, v. 48, n. 2, p. 127-36, Aug 1952.

WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. **Bull Neur Inst NY**, v. 6, p. 306–371, 1937.

9. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., respondendo por..... recebi informações sobre o projeto de pesquisa intitulado “*Caracterização genotípica de isolados de Toxoplasma gondii em humanos e animais domésticos em área endêmica para toxoplasmose*” que tem como objetivo prover informação sobre a distribuição dos genótipos de *T. gondii* em Campos dos Goytacazes. Estou ciente de que a minha participação é voluntária e será limitada à doação de amostras de sangue venoso (no máximo trinta mililitros) sobre o qual recebi a orientação dos possíveis riscos e desconfortos. Tais desconfortos podem ser pequena dor no momento da picadura e a formação de hematomas, após a coleta do sangue. Tenho consciência que a minha participação como voluntário(a) não me trará nenhum benefício financeiro. No entanto, conhecer a minha sorologia para toxoplasmose traz-me o benefício de poder planejar, caso eu seja imune, visitas regulares a oftalmologistas para acompanhamento. Bem como estou consciente de que conhecer a condição de imunidade ao *Toxoplasma gondii* previamente à gravidez traz o benefício da orientação de prevenção da infecção congênita (isto é, durante a gravidez) necessária em indivíduos não imunes. Caso eu concorde em participar como voluntário(a) neste projeto de pesquisa, os meus dados não serão revelados a ninguém e a minha identidade será preservada. Sei também que para preservar minha identidade, serão utilizados códigos, ao invés de nomes, durante todas as etapas do estudo. Fui informado(a) de que não devo esperar resultados imediatos ou pessoais a não ser o do diagnóstico sorológico. Estou ciente que o sangue que forneci, para o referido projeto de pesquisa, será enviado ao exterior, onde parte das análises será feita e, posteriormente eliminado. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu

representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso ao profissional responsável que poderá ser encontrado através do(s) telefone(s): (22)27397255

Qualquer dúvida dirigir-se ao Laboratório de Biologia do Reconhecer (UENF) ou ao pesquisador responsável referido abaixo:

Prof^a. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira Telefone: (22)2739-7255

Campos dos Goytacazes, _____ de _____ de 20__

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Representante Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

Consentimento para Estocagem e Uso Futuro de Espécimes Coletadas

Vieira, F.P. novembro de 2015 – Pág: 70

Caso o sangue que eu forneci para o projeto de pesquisa intitulado, “*Caracterização genotípica de isolados de Toxoplasma gondii em humanos e animais domésticos em área endêmica para toxoplasmose*”, não seja totalmente utilizado, eu autorizo que o restante seja:

- Eliminado.
- Destruído depois de ____ anos.
- Armazenado e possa ser usado em pesquisas futuras com o mesmo propósito do atual projeto de pesquisa
- Armazenado e possa ser usado em pesquisas futuras de qualquer tipo.
- Armazenado indefinidamente
- Armazenado somente com autorização do CEP

Quero que minha identidade seja:

- Removida do material restante.
- Mantida no material restante

NOME DO PARTICIPANTE: _____ **P:** **ID:**

ASSINATURA DO PARTICIPANTE: _____

NOME DO RESPONSÁVEL: _____


ASSINATURA DO RESPONSÁVEL: _____

NOME DA TESTEMUNHA: _____


ASSINATURA DA TESTEMUNHA: _____

DATA: ____/____/____.

10. ANEXOS



Universidade Estadual do Norte Fluminense - Campos, RJ

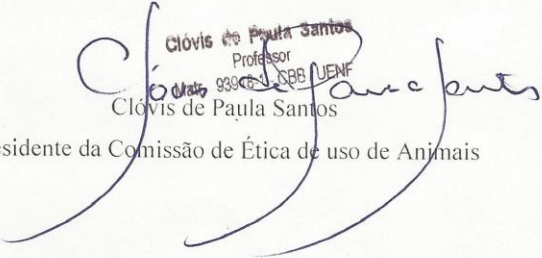


Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 97, intitulado “Correlação entre a vulnerabilidade de aquíferos e a prevalência da toxoplasmose humana e animal em Campos dos Goytacazes – região norte do estado do Rio de Janeiro ” sob a responsabilidade do Dr. Lilian Maria Garcia Bahia de Oliveira, Centro de Biociências e Biotecnologias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 19/08/2010. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 19/08/2014.

Campos dos Goytacazes, 19 de agosto de 2010.



Clóvis de Paula Santos
Professor
939 071 9330 - SBB UENF
Clóvis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-7180 - Fax: (22) 2739-9178 - correio eletrônico: ceua@uenf.br

