

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

EDWARDS FRAZÃO-TEIXEIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS
DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ: COMPARAÇÃO DAS
TÉCNICAS MULTILOCUS PCR-RFLP E SEQÜENCIAMENTO**

Campos dos Goytacazes - RJ
2009

EDWARDS FRAZÃO-TEIXEIRA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS
DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ: COMPARAÇÃO DAS
TÉCNICAS MULTILOCUS PCR-RFLP E SEQÜENCIAMENTO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

ORIENTADOR Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira

CO-ORIENTADOR Prof. Jitender P. Dubey

Campos dos Goytacazes
2009

EDWARDS FRAZÃO-TEIXEIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM SUÍNOS
DE CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ: COMPARAÇÃO DAS
TÉCNICAS MULTILOCUS PCR-RFLP E SEQÜENCIAMENTO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 31 de agosto de 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes (Doutor, Patologia) - UFRRJ

Prof^a. Lílian Maria Garcia Bahia-Oliveira (Doutora, Bioquímica e Imunologia) - UENF

Prof. Victor Martin Quintana Flores (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Doutor, Medicina Veterinária) - UENF
(Orientador)

A

*Minha esposa, que superou todos os
obstáculos durante os quatro meses que
passei nos EUA, para que eu pudesse
completar este trabalho de pesquisa,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bênção que é minha família e pela chegada do meu filho;

À minha família, pois tudo que sou devo a eles;

Aos amigos, colegas e muitas outras pessoas que tive o prazer de conhecer durante o período de realização desta pesquisa, em especial a Vera Lúcia Menezes Rosa, Jéssika de Oliveira Ventura, Nichole Danraj, Leandra Ferreira, Yara Al Kappany, Oliver Kwok, Natarajan Sundar, Rajendran Chellaiah, Dr. Michael E. Grigg e Robin Miller. De várias maneiras diferentes, vocês contribuíram para a execução deste projeto;

Ao amigo Vagner Ricardo da Silva Fiúza, pela parceria durante os quatro meses de estudo nos EUA;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade do aprendizado contínuo;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa sanduíche durante o período de estágio nos EUA;

Ao Dr. Jitender P. Dubey, pela co-orientação e oportunidade de aprender com uma lenda viva no estudo do protozoário *Toxoplasma gondii*;

Ao Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira pela orientação e amizade nestes oito anos de pesquisa juntos.

*“If you wanna make the world a better place
Take a look at yourself and then make that change.”*

Michael Jackson

RESUMO

FRAZÃO-TEIXEIRA, Edwards, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2009. Caracterização genética de *Toxoplasma gondii* em suínos de Campos dos Goytacazes-RJ: comparação das técnicas multilocus PCR-RFLP e seqüenciamento. Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Co-Orientador: Prof. Jitender P. Dubey.

Cinco isolados de *Toxoplasma gondii* (TgPgBr1-5) de corações e cérebros de suínos adquiridos a fresco do principal mercado popular de Campos dos Goytacazes, uma cidade altamente endêmica para toxoplasmose humana do norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram biológica e geneticamente caracterizados através das técnicas multilocus PCR-RFLP e seqüenciamento. Foram detectados quatro novos genótipos, três deles altamente patogênicos a camundongos e um não patogênico. Os três genótipos patogênicos apresentaram predominantemente alelos tipo I (genótipo 1) e alelos atípicos (genótipos 2 e 4) através da análise por seqüenciamento. Estes isolados patogênicos foram capazes de matar 100% dos camundongos primariamente infectados, ao contrário do genótipo não-patogênico (genótipo 3), que demonstrou predominância de alelos tipo III e não foi capaz de matar nenhum camundongo primariamente infectado. Este é o primeiro relato de seqüenciamento de DNA de isolados de *T. gondii* de suínos no Brasil. Os três genótipos virulentos foram letais a camundongos em menos de duas semanas após a inoculação com apenas um oocisto esporulado por via oral. Para o genótipo não patogênico, a dose letal foi 10^2 oocistos esporulados. A multilocus PCR-RFLP como é preconizada atualmente não é capaz de detectar nucleotídeos diferentes dos encontrados para as linhagens clonais tipos I, II e III. Isolados de *T. gondii* do Brasil parecem ter maior variabilidade genética, observado pela multilocus PCR-RFLP e confirmado pelo maior número de alelos atípicos observados através do seqüenciamento. Desta forma, o seqüenciamento é mais acurado do que a multilocus PCR-RFLP para a caracterização genética de isolados brasileiros.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, suínos, PCR, Estado do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

FRAZÃO-TEIXEIRA, Edwards, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August 2009; Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in pigs from Campos dos Goytacazes-RJ: comparison of multilocus PCR-RFLP and sequencing techniques. Adviser: Professor Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. Co-Adviser: Professor Jitender P. Dubey.

Five *Toxoplasma gondii* isolates (TgPgBr1-5) from hearts and brains of pigs purchased freshly at the main popular market of Campos dos Goytacazes, a city highly endemic for human toxoplasmosis in Northern Rio de Janeiro State, Brazil, were biologically and genetically characterized through multilocus PCR-RFLP and sequencing techniques. Four new genotypes were detected, three of them highly pathogenic to mice and one non-pathogenic. The three pathogenic genotypes presented predominantly type I alleles (genotype 1) and atypical alleles (genotypes 2 and 4) through sequencing analysis. They killed 100% of mice infected primarily. The non-pathogenic genotype had predominantly type III alleles, and no mouse died after primary infection with this genotype. This is the first report of DNA sequencing of *T. gondii* isolates in pigs from Brazil. The three virulent genotypes were lethal to mice less than two weeks after inoculation with only 1 sporulated oocyst orally. For the non-pathogenic genotype, the lethal dose was 10^2 sporulated oocysts. Multilocus PCR-RFLP as it is performed today is not capable of detecting nucleotides different from the ones found in the clonal lineages types I, II and III. Brazilian isolates are much more diversified than verified by multilocus PCR-RFLP, as genotypes presented higher number of atypical alleles through sequencing. Therefore, sequencing is more accurate than multilocus PCR-RFLP for the genetic characterization of Brazilian isolates.

Key words: *Toxoplasma gondii*, pigs, isolation, PCR, Rio de Janeiro state.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no mundo (modificado de Dubey et al., 2009).....	28
Quadro 2.	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos na América do Sul (modificado de Dubey et al., 2009).....	28
Quadro 3.	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos no Brasil (modificado de Dubey et al., 2009).....	28
Quadro 4.	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> viável de suínos naturalmente infectados (modificado de Dubey et al., 2009)....	29
Quadro 5.	Descrição dos iniciadores, enzimas e demais especificações da técnica multilocus PCR-RFLP para caracterização genética de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
Quadro 6.	Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações primárias dos isolados TgPgBr1-5 de <i>Toxoplasma gondii</i>	44
Quadro 7.	Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações secundárias dos isolados TgPgBr1-5 de <i>Toxoplasma gondii</i>	45
Quadro 8.	Programa para as amplificações primárias e secundárias dos isolados TgPgBr1-5 de <i>Toxoplasma gondii</i>	45
Quadro 9.	Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados na digestão enzimática dos produtos da nPCR dos isolados TgPgBr1-5 de <i>Toxoplasma gondii</i>	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (modificado de Dubey, 1993)..... 22
- Figura 2.** Fragmentos de restrição para o locus **SAG1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas Sau96I e HaeIII dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo II/III; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo atípico..... 53
- Figura 3.** Fragmentos de restrição para o locus **SAG2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HinfI e TaqI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III retirados de Su et al. (2006); **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo II; **seta vermelha**, fragmento característico de alelo atípico..... 53
- Figura 4.** Fragmentos de restrição para o locus **SAG3** de *Toxoplasma gondii* após digestão com a enzima NciI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo III..... 54
- Figura 5.** Fragmentos de restrição para o locus **BTUB** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsiEI e TaqI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo III..... 54
- Figura 6.** Fragmentos de restrição para o locus **c22-8** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsmAI e MboII dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular

Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo II; **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo III; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo atípico..... 55

Figura 7. Fragmentos de restrição para o *locus c29-2* de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HpyCH4IV e RsaI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo III..... 55

Figura 8. Fragmentos de restrição para o *locus PK1* de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas Aval e RsaI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I..... 56

Figura 9. Nucleotídeos atípicos não observados para os alelos clonais I, II e III de *Toxoplasma gondii* (círculos vermelhos) e detectados nas seqüências de DNA dos isolados TgPgBr1, 3 e 5..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Infectividade e patogenicidade dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> TgPgBr1-5 a camundongos.....	50
Tabela 2.	Período de sobrevivência dos camundongos inoculados com tecidos primários e oocistos dos isolados TgPgBr1-5 de <i>Toxoplasma gondii</i>	50
Tabela 3.	Caracterização genética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> TgPgBr1-5 através da multilocus PCR-RFLP.....	58
Tabela 4.	Caracterização genética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> TgPgBr1-5 através do seqüenciamento.....	58
Tabela 5.	Distribuição alélica para os marcadores SAG1, SAG3, BTUB, c22-8 e c29-2, comuns a ambas as técnicas multilocus PCR-RFLP e seqüenciamento durante a caracterização genética dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> TgPgBr1-5.....	60

LISTA DE SIGLAS

APDL – Animal Parasitic Diseases Laboratory

BSA – bovine serum albumin

DAI – dias após a inoculação

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato

DT – Dye Test

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

IFA – Indirect Fluorescent Antibody

IFN-g – interferon-gama

LPD – Laboratory of Parasitic Diseases

LSA – Laboratório de Sanidade Animal

MAT – Modified Agglutination Test

NIH – National Institutes of Health

nPCR – nested PCR

PBS - phosphate buffered saline

PCR – Polymerase Chain Reaction

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm – rotações por minuto

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

USDA – United States Department Agriculture

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Gerais.....	18
2.2. Específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	19
3.1.1. Taxionomia.....	19
3.1.2. Histórico.....	19
3.1.3. Ciclo biológico, fatores de risco e vias de transmissão.....	20
3.2. A toxoplasmose humana no mundo.....	23
3.3. A toxoplasmose humana no Brasil.....	25
3.4. A toxoplasmose em Campos dos Goytacazes.....	26
3.5. <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos.....	26
3.6. A multilocus PCR-RFLP.....	30
3.7. Os genótipos brasileiros.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Seleção dos açougues.....	34
4.2. Aquisição dos tecidos de suínos.....	34
4.3. Digestão péptica das amostras.....	34
4.4. Isolamento primário em camundongos.....	35
4.4.1. Inoculação.....	35
4.4.2. Período de observação e isolamento.....	36
4.4.2.1. Observação de taquizoítas em líquido peritoneal.....	36
4.4.2.2. Impressão de órgãos em lâmina.....	37
4.4.2.3. Técnica de arrasto.....	37
4.4.3. Eutanásia dos camundongos.....	37
4.5. Envio dos isolados aos EUA e nova prova biológica.....	38

4.6. Prova biológica em gatos e obtenção de oocistos.....	39
4.7. Infectividade e patogenicidade de oocistos a camundongos.....	40
4.8. Avaliação sorológica – MAT.....	41
4.9. Extração de DNA.....	42
4.10. A caracterização genética.....	43
4.10.1. A multilocus PCR-RFLP.....	43
4.10.2. O seqüenciamento.....	47
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Prova biológica em camundongos.....	49
5.2. Patogenicidade dos oocistos a camundongos.....	50
5.3. Caracterização genética através da multilocus PCR-RFLP.....	51
5.4. Caracterização genética através do seqüenciamento.....	56
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

Até recentemente, *Toxoplasma gondii* era considerado clonal com muito pouca variabilidade genética, e os isolados oriundos de seres humanos e animais eram classificados dentro de uma das três linhagens clonais (tipos I, II e III) (DARDÉ et al., 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002a, b). No entanto, estudos recentes indicam que os isolados do Brasil são biológica e geneticamente diferentes dos isolados dos EUA e Europa (DUBEY et al., 2002; LEHMANN et al., 2006; BELFORT-NETO et al., 2007; DUBEY et al., 2007a, b, c; DUBEY et al., 2008). Linhagens clonais parecem predominar também na África, com prevalência maior dos tipos clonais II e III (VELMURUGAN et al., 2008). Genótipos clonais tipo II são ausentes no Brasil e há grande variação genética, com presença de muitos alelos atípicos (DUBEY et al., 2007 a, c; DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008).

A cidade de Campos dos Goytacazes, localizada na região sudeste do Brasil (da SILVA et al., 2003), é conhecida pela endemia de toxoplasmose humana e estudos têm sido realizados com o intuito de encontrar as principais fontes de infecção (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; da SILVA et al., 2003; DUBEY et al., 2003; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006). Estudos soropidemiológicos detectaram como o principal fator associado à soropositividade humana para anticorpos anti-*T. gondii* a ingestão de água não tratada (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003), principalmente para as populações de baixa e média renda. Da Silva et al. (2003) verificaram grande contaminação ambiental através do isolamento de *T. gondii* em corações e cérebros de galinhas criadas de forma extensiva no município de Campos dos Goytacazes. A partir da análise do DNA destes isolados foi possível detectar grande variedade genotípica (DUBEY et al., 2008).

Estudos preliminares para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos e suínos criados em regiões urbanas e arredores deste município indicaram frequência de infecção alta nestes animais (FRAZÃO-TEIXEIRA, 2006), confirmando a importância epidemiológica do parasita na região. Adicionalmente, Frazão-Teixeira et al. (2006) isolaram *T. gondii* em 6 dos 12 cérebros de suínos comercializados *in natura* no principal mercado popular da cidade, verificando assim a importância desta espécie animal como possível fonte de infecção para humanos neste município.

Tendo em vista a necessidade de se verificar as características genéticas dos isolados de *T. gondii* de diversas fontes do município de Campos dos Goytacazes e sua ligação com os genótipos já caracterizados no Brasil, justifica-se um trabalho de pesquisa que caracterize biológica e geneticamente os isolados de *T. gondii* oriundos de tecidos de suínos comercializados *in natura* nesta cidade. Ainda, tendo em vista os recentes estudos que verificaram alta diversidade genética de *T. gondii* para o Brasil, diferentemente de outras regiões onde existem basicamente três genótipos principais, análises por seqüenciamento são necessárias para avaliar a acurácia da técnica multilocus PCR-RFLP para caracterizar geneticamente os isolados do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

a) Caracterizar biológica e geneticamente cepas de *T. gondii* isoladas de tecidos de suínos comercializados *in natura* no principal mercado popular do município de Campos dos Goytacazes-RJ e compará-los a outros isolados estudados no Brasil.

2.2. Específicos

a) Verificar a presença de formas infectantes de *T. gondii* em tecidos de suínos comercializados *in natura* no principal mercado popular do município de Campos dos Goytacazes-RJ;

b) Verificar a diversidade genética de *T. gondii* em suínos neste município e a existência de correlação entre patogenicidade e genótipo;

c) Verificar a eficácia da técnica multilocus PCR-RFLP para a caracterização genética de isolados de *T. gondii* circulantes no Brasil em relação ao seqüenciamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Toxoplasma gondii*

3.1.1. Taxionomia

A classificação taxionômica do agente etiológico da toxoplasmose, de acordo com Current et al. (1990) e Cavalier-Smith (1993), é:

Império: Eucariota Cavalier-Smith, 1993;

Reino: Protozoa Owen, 1858;

Filo: Apicomplexa Levine, 1970;

Classe: Sporozoazida Leukart, 1879;

Ordem: Eucoccidiorida Leukart, 1879;

Subordem: Eimeriorina Leger, 1911;

Família: Sarcocystidae Poche, 1913;

Subfamília: Toxoplasmatinae Bioca, 1956;

Gênero: *Toxoplasma* Nicolle e Manceaux, 1909;

Espécie: *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909

3.1.2. Histórico

Alfonso Splendore foi o primeiro a detectar *T. gondii* em um estudo com coelhos em 1908 no Brasil, independentemente de Nicolle e Manceaux. O pesquisador de origem italiana observou uma patologia com quadro semelhante ao kalazar humano e descreveu as lesões e os corpúsculos parasitários encontrados, tanto as formas livres como intracelulares. A observação de Splendore ocorreu em julho de 1908, porém em outubro do mesmo ano, Nicolle e Manceaux relataram uma descoberta semelhante em células de baço e do fígado de *Ctenodactylus gundi*, um roedor africano (NICOLLE e MANCEAUX, 1908).

Segundo citação de Oliveira (2002), um oftalmologista chamado Jankü fez a primeira descrição de toxoplasmose congênita humana, em 1923. O paciente era uma criança de 11 anos de idade com hidrocefalia e cegueira, que veio a falecer. Ao corte histológico do globo ocular durante a necropsia, pôde observar a presença de formas do parasita na retina. Enquanto Torres (1927) relatou toxoplasmose humana pela primeira vez no Rio de Janeiro ao descrever microorganismos em cortes histológicos do cérebro, miocárdio e músculos esqueléticos de um bebê que faleceu aos 29 dias de vida. Ele reconheceu os organismos como semelhantes a *T. gondii* e a espécies do gênero *Encephalitozoon*.

A primeira caracterização de toxoplasmose fatal em recém-nascidos foi realizada por Wolf e Cowen (1937). Dois anos mais tarde Wolf et al. (1939 e 1940) conseguiram, pela primeira vez, infectar animais com cepas isoladas de uma lesão do sistema nervoso central de um bebê falecido com um mês de vida. A caracterização da doença em indivíduos adultos foi documentada por Pinkerton e Weinman (1940) nos EUA.

Após a padronização de testes sorológicos, em especial o teste de Sabin-Feldman (SABIN e FELDMAN, 1948), pôde-se quantificar a prevalência da infecção por *T. gondii* em seres humanos e animais, confirmando mais tarde sua ampla distribuição na natureza por Feldman, 1982.

Todavia, o ciclo completo do parasita só foi descrito em estudos realizados por Hutchison (1965) e Dubey et al. (1970), que descreveram a transmissão do parasita pelas fezes de gatos e sua fase sexual no intestino destes felídeos, culminando com a produção de oocistos, caracterizando-o como um coccídio.

3.1.3. Ciclo biológico, fatores de risco e vias de transmissão

Dentre todas as espécies de parasitas, *T. gondii* destaca-se pela complexidade do seu ciclo biológico (DUBEY, 1994). As formas infectantes se diferenciam de acordo com cada uma das três fases de seu ciclo.

No intestino do hospedeiro definitivo, a forma infectante resultante é o esporozoíta no oocisto esporulado. Este é liberado em sua forma não esporulada juntamente com as fezes destes animais e, no ambiente, este oocisto sofre uma alteração em sua estrutura para tornar-se potencialmente infeccioso. Esta transformação é catalisada pela ação da temperatura, umidade e concentração de oxigênio ambiente ideal e é chamada esporulação (DUBEY, 1994).

O oocisto é uma importante forma de disseminação do parasita no meio ambiente (da SILVA et al., 2003). Nesse local ele pode alcançar uma grande variedade de hospedeiros intermediários, onde realiza mais uma etapa de seu desenvolvimento biológico. Ao ser ingerido por qualquer animal de sangue quente, seja através de alimentos ou água contaminados, o oocisto esporulado rompe-se no intestino, liberando oito esporozoítas. Estes se dividem rapidamente nas células intestinais e linfonodos associados e dão origem aos taquizoítas (DUBEY, 1994), que atingem os mais variados tecidos do hospedeiro através da circulação sanguínea e linfática (DUBEY e BEATTIE, 1988). Eventualmente, o parasita migra para tecidos nervosos, musculares e hepáticos, onde se encistam. É importante ressaltar que essa fase extra-intestinal ocorre também nos felídeos (FREYRE et al., 1989), tornando-os também hospedeiros intermediários (Figura 1).

As formas de proliferação rápida, os taquizoítas, responsáveis pela fase aguda da doença, reduzem sua velocidade de multiplicação dentro dos cistos teciduais. Por este motivo passam a se chamar bradizoítas. Um cisto pode abrigar até centenas de bradizoítas e essa é a fase crônica ou latente da toxoplasmose (DUBEY, 1994).

O carnivorismo é o principal responsável pela continuidade do ciclo biológico a partir dos hospedeiros intermediários. O tecido contendo cistos teciduais, ao ser ingerido e sob a ação de enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado. Estas enzimas digerem a parede do cisto e permitem que até centenas de bradizoítas infectem os enterócitos do hospedeiro. Nestas células, os bradizoítas transformam-se novamente em taquizoítas e infectam os tecidos do hospedeiro (DUBEY, 1994).

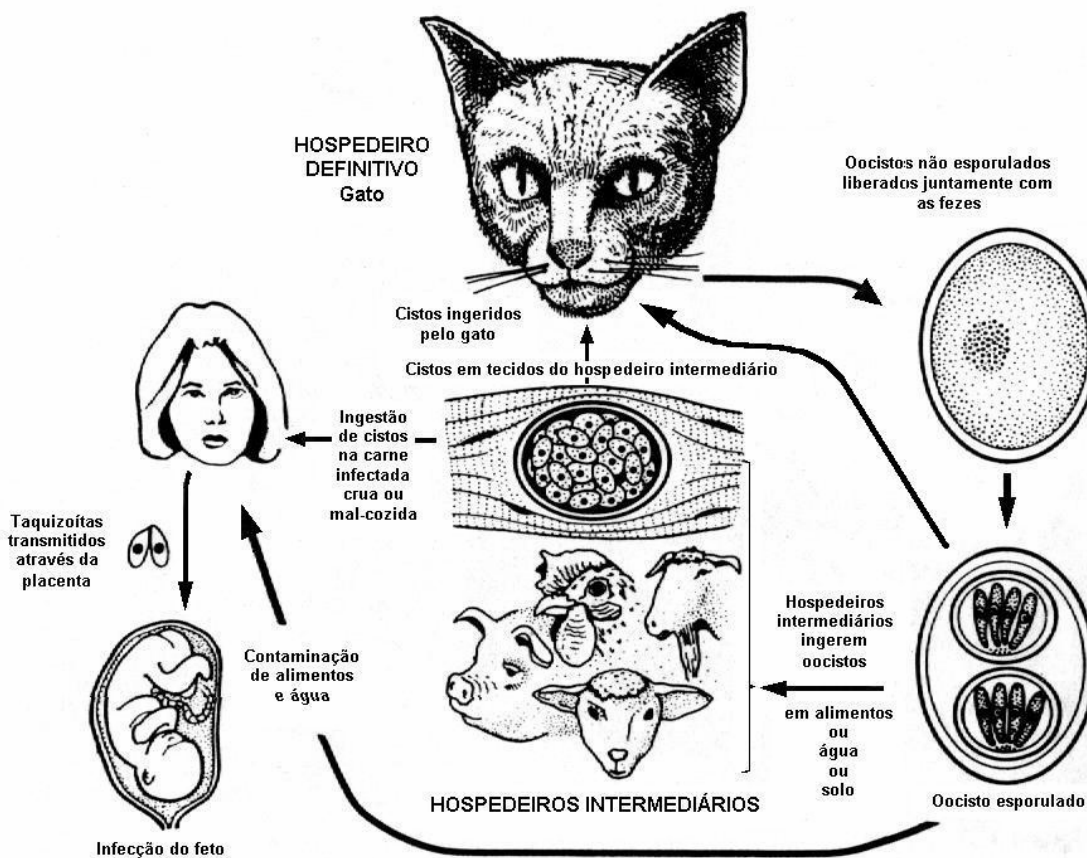


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* (modificado de DUBEY, 1993).

Quando os felídeos ingerem cistos teciduais, o ciclo biológico se completa (Figura 1). Os bradizoítas iniciam um ciclo enteroepitelial com uma fase assexuada e outra sexuada (DUBEY, 1998). Os oocistos se formam durante a fase sexuada no intestino após a fertilização dos gametas femininos (macrogametas) pelos masculinos (microgametas), de acordo com Dubey (1994).

Outra forma de transmissão do *T. gondii* é através da via transplacentária (DUBEY, 1994), que acontece quando hospedeiros não imunes são infectados durante a gestação. O parasita prolifera na placenta e atinge o feto, levando a abortamentos ou lesões congênitas irreversíveis. A infecção pode ocorrer ainda por transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos, mas não possuem a mesma importância que a ingestão de tecidos infectados (DUBEY, 1994; 1998) e água (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003) ou alimentos contaminados com oocistos (DUBEY, 1994).

3.2. A toxoplasmose humana no mundo

A toxoplasmose adquiriu grande importância com a descoberta de sua influência em indivíduos imunocomprometidos, principalmente portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana - HIV (KHAN et al., 2005). Inúmeras são as pesquisas realizadas com o intuito de melhor conhecer os fatores agravantes desta relação e encontrar métodos mais eficientes de diagnóstico precoce da encefalite causada pelo parasitismo (COLOMBO et al., 2005).

Por ser uma doença que acomete animais (ZAKI, 1995) e seres humanos (McALLISTER, 2005) e pelas graves seqüelas que podem advir da infecção humana (FRICKER-HIDALGO et al., 2005), a toxoplasmose tem sido cada vez mais estudada (BONFIOLI e OREFICE, 2005). Apesar de ser considerada uma infecção oportunista, raramente apresentando manifestações patológicas graves em indivíduos imunocompetentes (LUFT e REMINGTON, 1988), esta zoonose é diagnosticada em todo o mundo (DIAS et al., 2005). Pacientes acometidos pela infecção são vistos em consultórios e enfermarias de quase todas as especialidades médicas (WULF et al., 2005).

De todas as complicações que podem advir da infecção por *T. gondii*, aquelas decorrentes da transmissão mãe-feto merecem especial atenção. Em muitos casos a infecção pode se instalar na mãe e permanecer silenciosa durante todo o período gestacional, enquanto o protozoário é passado via placenta ao feto. Cermakova et al. (2005) relataram toxoplasmose congênita em um recém-nascido cuja mãe experimentara anticorpos anti-*T. gondii* dos tipos IgM, IgE e IgA em seu soro. Estas imunoglobulinas são, segundo os próprios autores, os marcadores da infecção aguda. A detecção da toxoplasmose congênita no feto ocorreu através do reconhecimento de DNA de *T. gondii* em seu sangue, dos marcadores de infecção aguda no soro, sinal de hidrocefalia e calcificação à ultra-sonografia cerebral. O diagnóstico acurado e utilização de terapia em ambos, mãe e feto, levaram à normalização progressiva dos testes laboratoriais (CERMAKOVA et al., 2005).

Por outro lado, estudos consideram o impacto das novas terapias imunossupressoras e esclarecem que a infecção adquirida na fase adulta pode assumir aspectos graves (FRICKER-HIDALGO et al., 2005; KHAN et al., 2005). Vários têm sido os relatos de toxoplasmose cerebral em indivíduos adultos

(COLOMBO et al., 2005), sem mencionar as complicações oftálmicas (PASHANINA et al., 2005) e até de cunho psiquiátrico (BROWN et al., 2005). A doença é a causa mais comum de infecção de retina em todo o mundo (HOLLAND, 2003). Uma pesquisa avaliou o efeito dos tratamentos convencionais na toxoplasmose ocular (STANFORD et al., 2003). Segundo estes autores, nenhuma das tentativas de tratamento em indivíduos imunocompetentes mostrou efeito benéfico. Ainda, em pesquisa realizada por Bosch-Driessen et al. (2002), que avaliaram indivíduos com toxoplasmose ocular durante um longo período, foi possível observar que 24% dos olhos afetados apresentaram deficiências irreversíveis.

Muitos estudos apontaram a importância de se observar as alterações decorrentes da infecção por *T. gondii* em indivíduos que não apresentam distúrbio do sistema imunológico (CARME et al., 2002). Os principais sinais incluem linfadenopatia, febre, fraqueza e debilidade, oftalmite e infecções multissistêmicas severas (DURLACH et al., 2003). Ainda, há estudos que realizaram avaliações mais complexas, passando a associar a toxoplasmose com desvios de comportamento e personalidade (LEWEKE et al., 2004; YOLKEN et al., 2001; BROWN et al., 2005). Trabalhos com roedores trouxeram evidências de alteração de comportamento em animais acometidos com a parasitose (BERDOY et al., 1995 e 2000), cooptando com o reconhecimento de situações similares em seres humanos. Condições mentais como esquizofrenia, mudança de personalidade e inteligência reduzida estão cada vez mais sendo associadas à infecção por *T. gondii* (FLEGR et al., 2003). Motivados pelo grande entusiasmo gerado pelas associações citadas, muitos pesquisadores têm postulado várias teorias. Um exemplo é o estudo realizado por Novotna et al. (2005) em que são apresentadas provas de que a alteração nas características de personalidade podem ser resultado de infecções cerebrais em geral, e não em consequência de atividade específica do *T. gondii*.

Mais recentemente, casos fatais de toxoplasmose em indivíduos imunocompetentes foram relatados na Guiana Francesa, América do Sul (DEMAR et al. 2007). Estes casos, inéditos até então, estão causando discussões em torno dos possíveis fatores envolvidos nesta letalidade incomum. Por essas e outras razões, a toxoplasmose vem suscitando o interesse de muitos pesquisadores, no intuito de se encontrar as principais fontes de infecção (DIAS et al., 2005). Por ser uma zoonose, é clara a importância dos animais de produção em sua disseminação para a população humana (HOGHOOGHI-RAD e AFRAA, 1993).

3.3. A toxoplasmose humana no Brasil

Impulsionados pelas descobertas realizadas em universidades e institutos de pesquisa em todo o mundo, pesquisadores brasileiros vêm realizando trabalhos acerca da presença do parasita no país, tanto no homem como em animais. Em Brasília, um estudo retrospectivo em 2.636 mulheres grávidas diagnosticou 17 com toxoplasmose aguda. Destes 17 casos, 15 foram confirmados como infecções primárias (NÓBREGA-ODE e KARNIKOWSKI, 2005). No mesmo estudo, os autores reportam uma soroconversão anual de 6,4 para cada 1.000 indivíduos.

Em outro estudo, Vidal et al. (2005) realizaram análise prospectiva de 55 casos com suspeita ou confirmados de toxoplasmose cerebral em pacientes HIV-positivos. Em 19 dos casos o diagnóstico da toxoplasmose levou à detecção de AIDS. Em 41 casos, a toxoplasmose cerebral foi a principal doença associada à AIDS. De acordo com outros resultados, sinais de deterioração neurológica prevêm resposta não favorável ao tratamento e a administração do tratamento anti-retroviral altamente ativo (HAART) parece estar relacionado a melhores índices de sobrevivência e menores taxas de recidivas.

Estudo realizado por Carvalheiro et al. (2005) estimou a incidência da toxoplasmose congênita no município de Ribeirão Preto, São Paulo. Na pesquisa, coletaram-se amostras de sangue de 15.162 neonatos, através de adsorção em papel filtro, que foram submetidas ao teste sorológico para detecção de IgM anti-*T. gondii*. Do total de amostras, 15 estavam positivas. Cinco destas amostras foram consideradas positivas para toxoplasmose congênita. Os autores ponderaram ainda a respeito da necessidade da instauração de medidas preventivas contra a toxoplasmose e que o rastreamento neonatal é possível desde que sejam utilizados métodos mais eficientes, pois a infecção congênita por *T. gondii* raramente é identificada por exames clínicos de rotina.

Garweg et al. (2005) compararam a resposta imune específica local de indivíduos de Erechim, Sul do Brasil, com aqueles da Suíça. Os indivíduos tinham toxoplasmose ocular ativa. Foram coletadas amostras pareadas de humor aquoso e soro de 27 brasileiros e 50 suíços. Os resultados foram sugestivos de uma deficiência mais pronunciada na barreira uveovascular dos pacientes brasileiros. Em outra pesquisa, amostras de sangue de 47 trabalhadores de oito fábricas de lingüiça

no município de Londrina, Paraná, foram analisadas e 28 (59,5%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* (DIAS et al., 2005). Dos 36 que trabalhavam diretamente com a produção de lingüiças, 20 (55,5%) apresentaram os anticorpos contra o parasita, enquanto a prevalência para os envolvidos com outras funções foi de oito em 11 (72,7%). Segundo os estudos, não houve significância para o fator hábito dos trabalhadores em relação à infecção por *T. gondii*.

3.4. A toxoplasmose em Campos dos Goytacazes

A cidade de Campos dos Goytacazes (da SILVA et al., 2003) é conhecida pela endemia de toxoplasmose humana. Estudos têm sido realizados com o intuito de detectar as principais fontes de infecção neste município (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; da SILVA et al., 2003; DUBEY et al., 2003; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006). Pesquisas soroepidemiológicas detectaram como um dos principais fatores associados à soropositividade humana para anticorpos anti-*T. gondii* a ingestão de água por fontes não tratadas (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003), principalmente para as populações de baixa e média renda. Da Silva et al. (2003) verificaram grande contaminação ambiental através do isolamento de *T. gondii* em corações e cérebros de galinhas criadas de forma extensiva no município de Campos dos Goytacazes. A análise do DNA destes isolados detectou grande variedade genotípica através da multilocus PCR-RFLP (DUBEY et al., 2008). Tecidos de suínos são vendidos a fresco no mercado municipal de Campos dos Goytacazes e trabalhos de pesquisa neste tipo de estabelecimento podem apresentar bons parâmetros para indicar o possível risco de infecção humana (FRAZÃO-TEIXEIRA et al. 2006).

3.5. *Toxoplasma gondii* em suínos

Cerca de um terço da população humana mundial está cronicamente infectada com *T. gondii* (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000). Por ser um parasita cosmopolita (DUBEY e BEATTIE, 1988), *T. gondii* também é encontrado em

diversas espécies de animais de produção. Muitas pesquisas baseadas na presença de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos têm revelado distribuição mundial do parasita nesta espécie animal.

Em revisão recente, Dubey et al. (2009) apresentam os principais aspectos da toxoplasmose em suínos. Os quadros 1, 2, 3 e 4 foram feitos a partir de informações extraídas deste artigo. No quadro 1, pode-se observar a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em suínos de alguns países do mundo. Dentre eles destaca-se a maior produtora de suínos no mundo, a China (FAO, 2003), com 23,6% de soropositividade em 338 animais estudados. Os EUA, grandes consumidores de carne suína com 30kg per capita (FAO, 2003), apresentam soropositividade similar (23%) em um estudo realizado em todo o país através do MAT. É possível observar níveis próximos de zero, como em estudo realizado com 6.048 suínos no Canadá através do ELISA (0,74%), mas também níveis altos como em estudo realizado na Itália (64,4%) em apenas 90 animais analisados.

No quadro 2, podem-se observar resultados sorológicos em suínos criados na América do Sul. O maior destaque é o Uruguai, com 70,2% de soropositividade. Os demais países (Chile, Peru e Argentina) apresentam um quase equilíbrio nos percentuais de soropositividade, apesar da grande variação no número de animais estudados em cada pesquisa. No Brasil são muitos os estudos que avaliaram a soropositividade a anticorpos anti-*T. gondii* em suínos. Vários foram os testes utilizados, mas o parasita foi detectado em pelo menos três regiões distintas (Norte, Sul e Sudeste). Destaca-se estudo realizado com 198 suínos em Minas Gerais, onde 90,4% dos animais apresentaram contato prévio com *T. gondii*. Suínos da Amazônia apresentaram alta soropositividade através do MAT, com 80 animais estudados. Em Campos dos Goytacazes, Frazão-Teixeira (2006) observou que em 61 suínos, 34 eram oriundos de criações familiares. Nestas criações, os animais eram mantidos sem o mínimo de higiene e se alimentavam predominantemente de restos de alimentos vegetais e animais. Ainda, outras espécies animais, como aves e até roedores, tinham livre acesso aos criadouros. O percentual de soropositividade dentre estes 34 animais foi de 20,6% pelo teste de ELISA. Estes resultados são expressivos e ressaltam a importância desta espécie animal na dispersão de *T. gondii* no município.

Quadro 1. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos no mundo (citado por DUBEY et al., 2009).

Local	Autor	%	n	Teste	Título
China	Cui et al. (1989)	23,6	338	ELISA	-
EUA	Dubey et al. (1991)	23	11.229	MAT	1:25
Holanda	Berends et al (1991)	2,1	23.348	ELISA	-
Itália	Genchi et al. (1991)	64,4	90	IFA	1:40
Alemanha	Fehlhaber et al. (2003)	20,5	1.005	ELISA	-
Portugal	De Sousa et al. (2006)	15,6	333	MAT	1:20
Canadá	Poljak et al. (2008)	0,74	6.048	ELISA	-

Quadro 2. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos na América do Sul (citado por DUBEY et al., 2009).

Local	Autor	%	n	Teste	Título
Chile	Tamayo et al. (1990)	28,1	1474	DT	1:16
Uruguai	Freyre et al. (1991)	70,2	601	DT	1:16
Peru	Suarez-Aranda et al. (2000)	32,3	96	ELISA	-
Argentina	Venturini et al. (2004)	37,8	230	MAT	1:25

Quadro 3. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos no Brasil (citado por DUBEY et al., 2009).

Local	Autor	%	N	Teste	Título
Minas Gerais	Guimarães et al. (1992)	90,4	198	IFA	1:16
Rio Grande do Sul	Grunspan et al. (1995)	18	200	IHA	1:64
São Paulo	Suarez-Aranda et al. (2000)	9,6	300	ELISA	-
Amazônia	Cavalcante et al. (2006)	37,5	80	MAT	1:25
Paraná	De Moura et al. (2007)	8,54	117	IFA	1:64
Rio de Janeiro	Frazão-Teixeira (2006)	20,6	34	ELISA	1:100

Quadro 4. Isolamento de *Toxoplasma gondii* viável de suínos naturalmente infectados (citado por DUBEY et al., 2009).

País	Tipo de suíno	n	Positivos (%)	Tecidos analisados	Referências
Argentina	Mercado	109	14 (12,8) ^a	Diafragma	Omata et al. (1994)
Áustria	Mercado	253	1 (0,4) ^a	Cérebro, coração, diafragma	Edelhofer (1994)
Brasil	Mercado	28 ^b	7 (25)	Coração, cérebro, língua	Dos Santos et al. (2005)
	Mercado	12	6 (50) ^a	Cérebro	Frazão-Teixeira et al. (2006)
	Lingüiças	149	13 (8,7) ^a	Lingüiça	Dias et al. (2005)
República Tcheca	Mercado	2.447	29 (1,1) ^a	Cérebro, diafragma	Hejlícek e Literak (1993)
Portugal	Mercado	37 ^b	15 (40,5)	Coração, cérebro	de Sousa et al. (2006)
EUA	Mercado	38 ^b	14 (36,8) ^a	Coração	Dubey et al. (2008); Velmurugan et al. (2009)
	Porcas	1.000	170 (17) ^a	Coração	Dubey et al. (1995a) and Velmurugan et al. (2009)
	Mercado	300	29 (9,6) ^c	Coração	Velmurugan et al. (2009)
	Mercado	55	51 (92,7) ^c	Coração, língua	Dubey et al. (2002), Lehmann et al. (2003)
	Varejo	2.094	7 (0,3) ^c	Lombo	Velmurugan et al. (2009) Dubey et al. (2005)

^a Isolamento em camundongos

^b Soropositivo

^c Isolamento em gatos

O parasita tem sido isolado de diversos tecidos de suínos em todo o mundo, sejam aqueles oriundos de abatedouros ou de fazendas (DUBEY et al., 2009). O sucesso do isolamento tem variado muito, provavelmente devido aos procedimentos de prova biológica. A prova biológica em gatos tem sido a mais bem-sucedida, principalmente devido à maior quantidade de tecido utilizada (500 g ou mais) em comparação à prova biológica em camundongos (DUBEY et al., 2009). Outro fator que tem aumentado a eficiência de isolamento é a avaliação sorológica prévia dos animais (DUBEY et al., 2009).

Dentre os isolamentos relatados no Brasil (quadro 4) destaca-se o realizado em 13 de 149 lingüiças comercializadas na região sul (DIAS et al., 2005). As lingüiças foram preparadas com contato prévio com sal por um período desconhecido (< 2h). O parasita viável foi isolado em apenas uma amostra. Os demais isolamentos foram confirmados através de sorologia positiva dos camundongos infectados (IFA, títulos 1:16), mas nenhum parasita viável foi detectado. Segundo Dubey et al. (2009),

quase metade da carne suína dos EUA é injetada com sais e água, por isso estudos com isolamentos em abatedouros neste país não fornecem boa avaliação do risco de infecção a seres humanos. Alguns destes tratamentos matam cistos teciduais de *T. gondii*.

Outros tecidos de suínos no Brasil foram analisados (quadro 4), com destaque para a detecção de *T. gondii* viável em sete dos 28 corações, cérebros e línguas (dos SANTOS et al., 2005) e seis de 12 cérebros avaliados em mercado popular de Campos dos Goytacazes (FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006). Ainda, *T. gondii* foi isolado de muitos outros tecidos de suínos no mundo (quadro 4). Com uma extensa amostragem de 2.447 tecidos de cérebro e diafragma de suínos em idade de abate na República Tcheca, Hejlícek e Literak (1993) isolaram o parasita viável em 1,1% (29 isolamentos). Outro estudo importante avaliou 2.094 carnes (lombo) de suínos adquiridas a varejo em estabelecimentos comerciais ao redor dos EUA (DUBEY et al., 2005). O resultado foi 0,3% (sete isolamentos) e provavelmente teve influência do congelamento prévio, comum a carnes obtidas em supermercados e açougues.

3.6. A multilocus PCR-RFLP

A multilocus PCR-RFLP foi desenvolvida com um grupo de marcadores moleculares capazes de distinguir as três linhagens clonais de *T. gondii* (tipos I, II, e III) após tratamento dos produtos de amplificação (produtos da PCR) com uma ou duas enzimas de restrição. Os marcadores utilizados por Su et al. (2006), capazes de alta resolução para caracterização genética de isolados de *T. gondii* são: SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, L358 e PK1. Mais recentemente o marcador SAG1 foi introduzido à análise, constituindo hoje 10 marcadores genéticos (DUBEY et al., 2008). Estes marcadores, seus respectivos iniciadores e enzimas de restrição utilizados para a distinção dos padrões alélicos característicos dos genótipos de *T. gondii* estão contidos no quadro 5.

A caracterização genética dos isolados é então realizada através da comparação dos fragmentos de restrição obtidos após a digestão dos produtos de amplificação de DNA do parasita para cada *locus* (ou marcador) com isolados referência sabidamente tipos I, II e III.

Estudos com isolados adquiridos de tecidos de suínos no Brasil foram realizados. No entanto, os resultados apresentados até o momento foram obtidos através da análise de um ou no máximo quatro marcadores dos 10 atualmente utilizados para a caracterização genética de *T. gondii*. Na região sul do Brasil, endêmica para toxoplasmose humana e com alta incidência da doença ocular (KHAN et al., 2006), Belfort-Neto et al. (2007) analisaram língua e diafragmas de suínos obtidos em abatedouros desta região. A caracterização genética de quatro isolados através da multilocus PCR-RFLP utilizando quatro marcadores genéticos foi feita diretamente dos tecidos sem prova biológica. A caracterização biológica é essencial, especialmente em estudos com populações de *T. gondii* que apresentam alta variação de alelos atípicos. É interessante notar que todos os isolados analisados apresentaram alelos tipo II para o *locus* BTUB, apesar de o genótipo clonal ser ausente para o Brasil. Outro trabalho realizado por dos Santos et al. (2005) analisou sete isolados de *T. gondii* obtidos de tecidos de suínos do Estado de São Paulo, também através da PCR-RFLP. No entanto este estudo utilizou apenas o marcador SAG2, previamente descrito por Howe et al. (1997). Cinco destes isolados foram caracterizados como tipo III e outros dois como tipo I. Este marcador SAG2 preconizado por Howe et al. (1997) foi substituído pelo novo SAG2, atualmente utilizado dentre os 10 marcadores preconizados para a genotipagem de *T. gondii* (PENA et al. 2008; DUBEY et al., 2008).

3.7. Os genótipos brasileiros

Com a utilização da multilocus PCR-RFLP, começou-se a perceber uma grande diferença genética para os genótipos do Brasil em relação aos da América do Norte e Europa. Enquanto estes últimos apresentam-se predominantemente clonais tipos I, II ou III, com maior predominância dos genótipos II e III (DARDÉ et al., 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002 a, b), os genótipos do Brasil são geneticamente mais diversificados, com praticamente ausência de genótipos clonais (DUBEY et al., 2002; LEHMANN et al., 2006; BELFORT-NETO et al., 2007; DUBEY et al., 2007a, b, c; DUBEY et al., 2008). Não só os genótipos brasileiros apresentaram combinações dos alelos presentes nas linhagens clonais I, II e III,

como também novos alelos ausentes em outras regiões do mundo, chamados atípicos. Ainda, apresentam ausência do genótipo tipo II (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008).

Quadro 5. Descrição dos iniciadores, enzimas e demais especificações da técnica multilocus PCR-RFLP para caracterização genética de *Toxoplasma gondii*.

Marcador		Iniciadores	Tamanho	Enzimas	Digestão e eletroforese	Referência
SAG1	Primários	F:GTTCTAACCACGCACCCTGAG R:AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	390 bp	Sau96I HaeII	NEB4, BSA, 37°C 60 min, gel a 2,6%	Grigg et al. (2001a)
	Secundários	F:CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R:GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG				
SAG2	Primários	F:GGAACGCGAACAATGAGTTT R:GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	546 bp	Hinf I Taq I	NEB3, BSA, 37°C 30 min, 65°C 30 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:ACCCATCTGCGAAGAAAACG R:ATTTGACCCAGCGGGAGCAC				
SAG3	Primários	F:CAACTCTCACCATTCACCC R:GCGCGTTGTTAGACAAGACA	225 bp	Nci I	NEB4, BSA, 37°C 60 min, gel a 2.5%	Grigg et al. (2001b) Su et al. (2006)
	Secundários	F:TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R:CACAAGGAGACCGAGAAGGA				
BTUB	Primários	F:TCCAAAATGAGAGAAATCGT R:AAATTGAAATGACGGAAGAA	411 bp	BsiEI Taq I	NEB4, BSA, 60°C 60 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:GAGGTCATCTCGGACGAACA R:TTGTAGGAACACCCGGACGC				
GRA6	Primários	F:ATTTGTGTTCCGAGCAGGT R:GCACCTTCGCTTGTGGTT	344 bp	Mse I	NEB2, BSA, 37°C 60 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:TTTCCGAGCAGGTGACCT R:TCGCCGAAGAGTTGACATAG				
c22-8	Primários	F:TGATGCATCCATGCGTTTAT R:CCTCCACTTCGGTCTCA	521 bp	BsmAI Mbo II	NEB2, BSA, 37°C 30 min, 55°C 30 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:TCTCTCTACGTGGACGCC R:AGGTGCTTGGATATTCGC				
c29-2	Primários	F:ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R:AGGGTCTCTTGCGCATACAT	446 bp	HpyCH4IV Rsa I	NEB1, BSA, 37°C 60 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:AGTTCTGCAGAGTGTGCGC R:TGTCTAGGAAAGAGGCGC				
L358	Primários	F:CTCTCGACTTCGCCTCTTC R:GCAATTTCCCTCGAAGACAGG	418 bp	Hae III Nla III	NEB4, BSA, 37 °C 60 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:AGGAGGCGTAGCGCAAGT R:CCCTCTGGCTGCAGTGCT				
PK1	Primários	F:GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R:AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	903 bp	Ava I Rsa I	NEB4, BSA, 37 °C 60 min, gel a 2.5%	Khan et al. (2005) Su et al. (2006)
	Secundários	F:CGCAAAGGGAGACAATCAGT R:TCATCGCTGAATCTCATTGC				
Apico	Primários	F:TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG R:AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	640 bp	Afl II Dde I	NEB2, BSA, 37 °C 60 min, gel a 3%	Su et al. (2006)
	Secundários	F:TGCAAATTCCTGAATTCTCAGTT R:GGGATTCGAACCCCTTGATA				

Esta alta variedade genética permitiu aos pesquisadores ponderarem acerca do alto índice de recombinação sexual do parasita na América do Sul. Esta é possivelmente a causa da estrutura populacional atípica deste parasita neste continente (PENA et al., 2008). Seguindo os argumentos de Lehmann et al. (2006), a introdução do gato doméstico na América do Sul durante o período da colonização possivelmente permitiu uma explosão genética da população de *T. gondii* nesta região, considerada o lugar de origem do parasita (LEHMANN et al., 2006). É de grande interesse a investigação da participação dos genótipos de *T. gondii* na toxoplasmose humana (SU et al., 2006). A linhagem tipo I tem sido mais freqüentemente associada à toxoplasmose congênita e ocular em seres humanos (FUENTES et al., 2001; VALLOCHI et al., 2005; KHAN et al., 2006), no entanto estes estudos basearam-se na análise de apenas um ou poucos marcadores genéticos.

Mais recentemente, estudos analisaram isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas e gatos de diferentes áreas geográficas do Brasil utilizando 10 marcadores genéticos (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008). As análises permitiram verificar inúmeros genótipos diferentes, e mais da metade destes genótipos foram associados a apenas um isolado (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008). No entanto, foi possível observar a predominância de quatro novos genótipos emergentes, designados BrI, BrII, BrIII e BrIV. Estes genótipos apresentaram características fenotípicas distintas, sendo o tipo BrI altamente virulento a camundongos e o tipo BrIII não virulento. Os tipos BrII e BrIV apresentaram virulência intermediária.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos açougues

Foram selecionados para o estudo açougues que comercializam carne suína *in natura* para consumo humano no município de Campos dos Goytacazes. O critério de seleção dos estabelecimentos para coleta das amostras foi por conveniência (PEREIRA, 1995), no principal mercado popular do município. Cinco açougues participaram desta pesquisa.

4.2. Aquisição dos tecidos de suínos

Foram adquiridos 35 amostras de tecidos de suínos, das quais 16 eram corações e 19 cérebros. Os tecidos foram comprados simulando-se o contato do consumidor com os cinco açougues estudados. Para remoção dos cérebros, um dos vendedores dispôs-se a cortar as cabeças em troca das musculaturas da face e tecidos adjacentes, utilizando a serra elétrica de seu estabelecimento. Os corações e cérebros foram armazenados em recipientes individuais, identificados e levados ao Laboratório de Sanidade Animal (LSA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) onde foram processados imediatamente.

4.3. Digestão péptica das amostras

A aplicação da técnica de digestão péptica baseou-se em protocolo previamente estabelecido por Dubey (1998), assim como o preparo do inóculo, com algumas modificações. Este procedimento foi realizado no LSA.

Cada tecido foi triturado por inteiro e separadamente, utilizando-se para isso um liquidificador de uso doméstico. Durante a trituração adicionou-se um volume mínimo de PBS para facilitar o procedimento. O copo do aparelho foi devidamente

lavado entre as etapas para evitar contaminação entre as amostras. Foram então retirados 40 gramas de cada homogeneizado, que foram armazenados individualmente em Erlenmeyers de 200ml devidamente identificados. Completou-se o conteúdo com solução de pepsina ácida até o volume de 200ml. A pepsina ácida foi preparada com a adição de 2,6 g de pepsina, 5 g de cloreto de sódio e 7 ml de ácido clorídrico, completando-se com água destilada até atingir um volume total de 500 ml. Com o auxílio de um peagômetro, estabilizou-se o pH entre 1,1 e 1,2.

O processo de digestão foi feito com o uso de um agitador orbital termostatzado, programado para uma temperatura de 37°C durante uma hora. Após este período, o material digerido foi passado em tamis com gaze dupla, o filtrado distribuído em quatro tubos de 50ml e então centrifugados a 1800g por 10 minutos.

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, restando apenas uma fração de aproximadamente 5 ml no interior de cada tubo. Completou-se o conteúdo com solução neutralizadora até atingir um volume final de 10 ml. Para o preparo da solução neutralizadora (bicarbonato de sódio 1,2%) adicionaram-se 12 g de bicarbonato de sódio e água destilada até atingir um litro. O pH da solução final foi estabilizado em 8,3.

O conteúdo total de cada um dos quatro tubos foi reunido em um único tubo de 50ml. Este foi centrifugado e processado a 1800g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 5-10 ml de solução de antibiótico, preparada com a adição de 100 µg/ml de estreptomicina e 1000 UI de penicilina (Sigma®).

4.4. Isolamento primário em camundongos

4.4.1. Inoculação

Foram utilizados 145 camundongos suíços fêmeas, pesando entre 20 e 25 g, oriundos do Biotério da UENF, sendo 105 utilizados para inoculação primária, 30 como controles para o total de 10 procedimentos de inoculação e 10 camundongos inoculados para cronificação e envio dos cérebros ao Animal Parasitic Diseases

Laboratory (APDL) do United States Department of Agriculture (USDA), EUA, para realização das caracterizações biológicas e genéticas.

Uma dose de 1 ml da suspensão contendo o produto da digestão péptica foi inoculada via intraperitoneal (i.p.) em grupos de 3 camundongos. Aos camundongos controle foi administrado apenas o veículo, PBS, pela mesma via. A utilização destes camundongos para a presente pesquisa foi aprovada pela comissão de ética da UENF.

4.4.2. Período de observação e isolamento

Cada grupo de camundongos inoculados, referente a um tecido analisado, foi mantido em uma caixa devidamente identificada e recebeu ração própria para a espécie e água *ad libitum*. Os animais foram observados durante seis semanas. Os que vieram a óbito, apresentaram aumento de volume abdominal ou qualquer sinal que sugeriu infecção por *T. gondii*, foram examinados para eventual presença do parasita em líquido peritoneal e impressão de órgãos em lâminas, através da observação ao microscópio óptico (Zeiss®) após coloração com Giemsa. Os encéfalos dos camundongos que não apresentaram quaisquer sinais da infecção por *T. gondii* ao fim do período de observação foram examinados através de observação direta dos esfregaços de cérebros ao microscópio óptico e pela técnica de arrasto.

4.4.2.1. Observação de taquizoítas em líquido peritoneal

Nos animais que morreram ou tiveram aumento de volume abdominal e sinais como letargia, pelos eriçados e olhos entreabertos, demonstrando suspeita de toxoplasmose aguda, foi realizada lavagem peritoneal com solução salina 0,9%. Uma gota do conteúdo foi então colocada entre lâmina e lamínula para observação de formas proliferativas de *T. gondii*, taquizoítas, ao microscópio óptico sob o aumento de 400x.

4.4.2.2. Impressão de órgãos em lâminas

Daqueles animais que vieram a óbito ou foram eutanasiados por apresentarem aumento de volume abdominal, foram coletadas amostras de fígado, baço e pulmão. Estas amostras passaram por um procedimento que consiste em opor fragmentos de tecidos em lâminas, desidratar com metanol por quatro minutos, corar com Giemsa e observar ao microscópio óptico sob aumento de 400X em busca de taquizoítas. Para a coloração com Giemsa, cada lâmina foi completamente coberta com o corante (Azur II 80mg/dl + Eosinato de Azur II 100mg/dl), através do auxílio de uma pipeta Pasteur. Decorridos 30 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente para remoção do excesso do corante e secas à temperatura ambiente.

4.4.2.3. Técnica de arrasto

Ainda acerca dos animais que não vieram a óbito após o fim do período de observação, fragmentos dos tecidos encefálicos foram utilizados para a observação de cistos cerebrais sob a técnica de arrasto. Esta técnica consiste em colocar-se um fragmento de tecido entre duas lâminas e arrastar uma sobre a outra, formando uma camada delgada de tecido para observação ao microscópio óptico sob o aumento de 100X após fixação e coloração com Giemsa como descrito anteriormente.

4.4.3. Eutanásia dos camundongos

A manutenção e o manuseio dos animais, incluindo o procedimento de eutanásia, seguiram os princípios éticos em pesquisa com animais de experimentação (COBEA, 2008).

4.5. Envio dos isolados aos EUA e nova prova biológica

Foram descritos cinco isolados, designados TgPgBr1, TgPgBr2, TgPgBr3, TgPgBr4 e TgPgBr5. Cada isolado foi subinoculado em dois camundongos e aqueles que ficaram doentes receberam sulfadiazina (1mg/ml) na água, tornaram-se cronicamente infectados e após 30 dias os cérebros destes animais contendo cistos de *T. gondii* foram enviados ao APDL, USDA, EUA, para caracterização biológica.

Os tecidos cerebrais foram removidos dos microtubos e macerados em grau e pistilo juntamente com quatro ml de solução de antibiótico (item 4.3). A nova solução foi aspirada com uma seringa de cinco ml e deixada à temperatura ambiente durante trinta minutos. Em seguida, a solução foi inoculada subcutaneamente em dois camundongos suíços fêmeas e dois nocaute para IFN-g (Taconic Farms, Germantown, NY). Os animais receberam ração própria para a espécie e água *ad libitum* e foram observados durante seis semanas.

Os camundongos que morreram durante o período de observação foram analisados quanto à presença de taquizoítas em esfregaços pulmonares ou cistos cerebrais. Para a realização de esfregaços pulmonares, um pedaço de aproximadamente 50 mm do pulmão foi espremido sobre uma lâmina de microscopia comum com o auxílio de uma pinça para liberação de fluido e células. Foi colocada uma gota de solução salina (NaCl 0,9%) sobre o esfregaço, homogeneizando-se com o próprio pedaço de tecido. Uma lamínula foi colocada sobre o esfregaço e observada ao microscópio óptico sob o aumento de 400X em busca de taquizoítas de *T. gondii*. Quando dois ou mais taquizoítas foram encontrados, a amostra foi considerada positiva.

Para a busca de cistos teciduais, um pedaço de aproximadamente 10 mm do tecido cerebral foi colocado entre lâmina e lamínula. O tecido foi então pressionado com o auxílio de uma segunda lâmina de microscopia colocada sobre a lamínula, até que uma camada fina de tecido fosse formada e então levada ao microscópio óptico (Zeiss®) para observação sob um aumento de 100X.

Uma amostra de tecido pulmonar dos animais infectados de aproximadamente 50 mm foi acondicionada em tubo tipo eppendorf de 1,5 ml, devidamente identificado e acondicionado a -20°C para futura análise de DNA do parasita. Todo o restante do tecido foi macerado com 1 ml de solução salina estéril com grau e pistilo. Ao

homogenado, foi adicionado 1,5 ml de solução de antibiótico (item 4.3) para formação de uma solução final de inoculação contendo aproximadamente 3 ml seguido de reinoculação em outros três camundongos (1 ml/camundongo via subcutânea). Os animais foram observados durante seis semanas e aqueles que apresentaram sinais de toxoplasmose aguda receberam sulfadiazina (1 mg/ml) na água para passagem ao estado crônico da doença.

4.6. Prova biológica em gatos e obtenção de oocistos

Os grupos de três camundongos cronificados (cinco grupos no total) foram eutanasiados no décimo quinto dia após a inoculação e suas carcaças, incluindo vísceras, tecidos musculares e cérebro, administrados via oral a cinco gatos jovens (< 1 ano) sabidamente negativos para *T. gondii*, criados no biotério do USDA. Cada gato foi inoculado com tecidos de um único isolado de *T. gondii*. Estes foram mantidos sem comida desde a véspera da inoculação para aumentar o apetite e facilitar a administração dos tecidos. Após a inoculação, os animais foram mantidos isoladamente em gaiolas apropriadas no infectório do USDA e receberam ração própria para a espécie e água *ad libitum*. As fezes foram observadas diariamente a partir do terceiro dia para a presença de oocistos de *T. gondii* como segue.

As amostras de fezes foram homogeneizadas com água e 5-10 gramas do conteúdo foram adicionados a 50 ml de solução de sacarose (530 gramas de açúcar comum / litro de água). Após homogeneizar, o conteúdo foi filtrado com gaze dupla, colocado em um tubo de 50 ml e centrifugado a 1300g / 10 minutos. Em seguida, colocou-se uma gota do sobrenadante entre lâmina e lamínula para verificar a presença de oocistos de *T. gondii* ao microscópio óptico sob o aumento de 100X e 400x. Para as amostras positivas, 5 ml do sobrenadante foram removidos com uma pipeta Pasteur e colocados em outro tubo de 50 ml. O tubo foi completado com água e centrifugado a 1300g / 15 minutos para eliminar a sacarose.

Para a concentração dos oocistos de cada isolado, os conteúdos fecais diários correspondentes à mesma cepa de *T. gondii* foram reunidos dois a dois em um mesmo recipiente. A amostra foi homogeneizada com um pouco de água e filtrada como previamente descrito. Cada volume foi distribuído em quatro tubos de 250 ml,

que foram então completados com água e centrifugados a 650g / 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, novamente completado com água e centrifugado como descrito. Após novo descarte do sobrenadante, adicionou-se solução de sacarose em um volume quatro vezes maior que a fração restante. O conteúdo foi homogeneizado por agitação manual, distribuído em tubos de 50 ml e centrifugado a 1300g / 10 minutos. Foram então removidos 5 ml do sobrenadante de cada tubo e colocados em outro tubo de 50 ml (cada 5 ml para cada tubo). Os conteúdos dos tubos foram completados com água e centrifugados a 1300g / 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets completados até 5 ml de ácido sulfúrico a 2% para cada tubo, homogeneizados e agrupados no mesmo tubo de 50 ml. Os tubos referentes às concentrações dos diferentes dias do mesmo gato inoculado foram reunidos em garrafas de 250ml devidamente identificadas e colocadas em agitação por no mínimo dois dias para esporulação dos oocistos.

4.7. Infectividade e patogenicidade de oocistos a camundongos

O ácido sulfúrico da solução concentrada de oocistos foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio a 3,3% (contendo indicador de pH vermelho fenol a 2%). Quando havia mudança do pH ácido para neutro, a coloração tornava-se alaranjada. Caso as amostras não fossem processadas imediatamente, estas eram acondicionadas a 4°C. Uma gota do concentrado foi colocada com o auxílio de uma pipeta Pasteur em um hemocitômetro e os oocistos contados como a seguir.

Para a verificação do número de oocistos / ml, o total de oocistos presentes no primeiro quadrante do dispositivo foi contado e multiplicado por 10.000. Em seguida foram realizadas diluições em série, removendo-se 0,5 ml da solução original e adicionando-se a 4,5 ml de solução salina (NaCl) 0,9%. Para as diluições seguintes, este procedimento era repetido. No presente estudo, as diluições de oocistos utilizadas foram <1, 1, 10, 10² e 10³. A quantidade de 1 ml de cada diluição de oocistos foi inoculada via oral a grupos de quatro camundongos, utilizando-se para isso uma sonda de gavagem acoplada a uma seringa de 5 ml. As camas dos camundongos foram descartadas e as gaiolas esterilizadas 24 horas após a

inoculação. Quatro camundongos controles negativos receberam a solução salina (NaCl) 0,9% em mesmo volume.

Os animais foram observados durante seis semanas e receberam ração própria para a espécie e água *ad libitum*. A mortalidade dos camundongos foi registrada para cada diluição de oocistos administrada para cada isolado. Para os animais que morreram, a presença de taquizoítas de *T. gondii* foi verificada em linfonodos mesentéricos como segue.

Um fragmento de aproximadamente 50 mm dos linfonodos mesentéricos foi friccionado sobre uma lâmina de microscopia com o auxílio de uma pinça. Uma gota de solução salina foi colocada sobre o esfregaço, que foi homogeneizado utilizando-se o próprio fragmento do tecido. Colocou-se então uma lamínula sobre o líquido e observou-se o conteúdo sob o aumento de 400X ao microscópio óptico em busca de taquizoítas de *T. gondii*. A amostra era dada como positiva quando dois ou mais parasitas eram observados na lâmina.

Os animais que não morreram tiveram seus sangues colhidos por punção dos sinos orbitais com pipetas descartáveis e testados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* através do teste de aglutinação modificado (MAT; título ≥ 50) ou para a presença de cistos em tecido cerebral como previamente descrito.

4.8. Avaliação sorológica - MAT

O teste utilizado para a análise dos soros dos camundongos foi o MAT, realizado rotineiramente no APDL. Este foi conduzido em placas de 96 poços em forma de "U". Os soros a serem testados foram diluídos em tampão salina fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,2. e a técnica realizada de acordo com o protocolo preconizado por Desmonds e Remington (1980).

A suspensão de antígeno foi composta de 2,5 ml de tampão borato pH 8,95 contendo 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), 35 μ l de 2-mercaptoetanol, 50 μ l de azul de Evans a 2mg/ml e 140 μ l da suspensão de taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH inativados com formalina, obtidos do estoque do APDL. Em cada poço da placa foram adicionados 25 μ l da solução de antígeno e 25 μ l dos soros previamente diluídos a 1:25 ou 1:50. Controles positivos e negativos também foram incluídos e a

placa foi coberta com uma fita adesiva transparente e incubada a 37°C por 12 horas. A leitura da reação baseou-se no perfil de sedimentação da suspensão de taquizoítas, onde a formação de uma teia indica a presença de anticorpos e a formação de um ponto azul no fundo do poço indica a ausência de anticorpos.

4.9. Extração de DNA

O DNA de *T. gondii* dos isolados foi extraído dos tecidos pulmonares de camundongos infectados. O DNA do isolado TgPgBr4 foi extraído a partir de tecidos pulmonares de camundongos nocaute infectados, pois o isolado não foi patogênico a camundongos imunocompetentes. A extração foi realizada utilizando-se o kit DNeasy® da Qiagen, de acordo com o protocolo do fabricante com modificações.

Foi utilizado o protocolo spin-column para tecidos animais (os reagentes citados a seguir foram fornecidos pelo fabricante). O fragmento de tecido pulmonar infectado de camundongo foi colocado em um tubo de centrífuga de 1,5 ml. Foram adicionados 180 µl do tampão ATL e 20 µl de proteinase K, homogeneizados vortex (Sybron® Maxi Mix II Thermolyne) e incubados sob agitação em banho-maria a 56°C (Precision® Circulating Water Bath) até que o tecido tivesse sido completamente lisado, o que aconteceu em 2,5 horas. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos, adicionaram-se 200 µl do tampão AL e novamente foram homogeneizados em vortex. Foram adicionados 200 µl de etanol (96 a 100%), homogeneizados em vortex novamente. É importante adicionar o tampão AL e o etanol à amostra e misturá-los imediatamente através do vórtex ou pipetagem para permitir uma solução homogênea.

A mistura é então pipetada (incluindo qualquer precipitado) na coluna mini spin, acoplada a um tubo coletor de 2ml (fornecidos pelo fabricante). Os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm (Eppendorf® Centrifuge 5415D) e em seguida descartaram-se os filtrados e os tubos coletores. As colunas mini spin foram acopladas a novos tubos coletores, adicionaram-se 500 µl de tampão AW1 e foram centrifugadas durante um minuto a 13.200 rpm. Novamente os filtrados e os tubos coletores foram descartados. As colunas mini spin foram acopladas a novos tubos coletores, foram adicionados 500 µl de tampão AW2 e centrifugados durante três

minutos a 13.200 rpm para secar a membrana DNeasy[®]. Foram descartados os filtrados e os tubos coletores e as colunas mini spin acopladas a um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml (não fornecido pelo fabricante; USA Scientific[®]). Foram adicionados 50 µl de tampão AE (diluído 1:10 em água para PCR) diretamente à membrana DNeasy[®]. A solução foi incubada à temperatura ambiente por um minuto e centrifugada também por um minuto a 13.200 rpm para eluição. Foram removidos os mesmos 50 µl e aplicados à mesma coluna novamente, utilizando-se o mesmo tubo eppendorf.

O conteúdo foi incubado à temperatura ambiente por um minuto e centrifugado também por um minuto a 13.200 rpm para eluição. Os tubos foram identificados apropriadamente e mantidos a -20°C até a realização da PCR.

4.10. A caracterização genética

A caracterização genética foi realizada através de parceria com o Laboratory of Parasitic Diseases (LPD) do National Institutes of Health (NIH), Bethesda, EUA, utilizando duas técnicas moleculares: a multilocus Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (multilocus PCR-RFLP) e a multilocus sequencing (seqüenciamento).

4.10.1. A multilocus PCR-RFLP

O DNA dos cinco isolados foi amplificado através de uma nested-Polymerase Chain Reaction (nPCR) para sete marcadores: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, e PK1. Todas as misturas e reações foram preparadas dentro do fluxo laminar (Nuair[®] Biological Safety Cabinets) para evitar contaminação. As pipetas e a superfície de trabalho do fluxo foram esterilizadas com cloro e toalhas de papel descartáveis. Os volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados para o preparo das soluções mix para cada marcador molecular nas amplificações primária e secundária estão contidos nos quadros 6 e 7.

Os iniciadores foram mantidos a -20°C na diluição de 500 pmol e somente diluídos a 50 pmol no momento da reação de PCR. Para a reação primária foram pipetados (Gilson[®] Pipetman) 47 μl da solução mix (quadro 7) em sete microtubos de 0,2 ml (Axygen[®]) e posteriormente adicionados 3 μl de cada amostra de DNA em cada um dos microtubos devidamente identificados, completando 50 μl de solução final. A enzima Taq DNA polimerase foi previamente mantida em recipiente com gelo e adicionada somente quando da adição das amostras. O programa da amplificação primária ao termociclador (Eppendorf[®] 5331 Mastercycler Gradient) foi estabelecido como no quadro 8.

Para a reação de amplificação secundária (quadro 7) o produto da reação primária foi utilizado no lugar da amostra de DNA original. A exemplo da reação primária, as soluções mix foram preparadas separadamente para cada marcador. Foram então adicionados 49 μl destas soluções para cada microtubo de 0,2 ml. Em seguida foi adicionado 1 μl do produto da respectiva reação primária. Os microtubos foram devidamente identificados para cada marcador e isolado, e inseridos no termociclador para incubação de acordo com a mesma programação descrita para a reação de amplificação primária (quadro 8).

Quadro 6. Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações primárias dos isolados TgPgBr1-5 de *Toxoplasma gondii*.

Reagente	1 reação	8 reações ^a	Especificações
Tampão 10X (com MgCl_2)	5 μl	40 μl	Sigma [®]
dNTPs (2mM)	5 μl	40 μl	Sigma [®]
Iniciador F ^b (50 pmol)	0,5 μl	4 μl	IDT [®]
Iniciador R ^b (50 pmol)	0,5 μl	4 μl	IDT [®]
Taq polimerase (5 U/ μl)	0,5 μl	4 μl	Sigma [®]
Amostra de DNA	3 μl	3 μl ^c	-
Água para PCR	35,5 μl	268 μl	Sigma [®]

^a Cinco isolados TgPgBr1-5, um controle positivo, um controle negativo e cálculo para uma amostra excedente.

^b Iniciadores direto e reverso para a amplificação primária.

^c As amostras de DNA serão adicionadas separadamente.

Quadro 7. Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados nas amplificações secundárias dos isolados TgPgBr1-5 de *Toxoplasma gondii*.

Reagente	Reação secundária		Especificações
	1 reação	8 reações ^a	
Tampão 10X (com MgCl ₂)	5 µl	40 µl	Sigma [®]
dNTPs (2mM)	5 µl	40 µl	Sigma [®]
Iniciador F ^b (50 pmol)	0,5 µl	4 µl	IDT [®]
Iniciador R ^b (50 pmol)	0,5 µl	4 µl	IDT [®]
Taq polimerase (5 U/µl)	0,5 µl	4 µl	Sigma [®]
Produto da reação primária	1 µl	1 µl ^c	-
Água para PCR	37,5 µl	300 µl	Sigma [®]

^a Cinco isolados TgPgBr1-5, um controle positivo, um controle negativo e um controle negativo para a reação secundária.

^b Iniciadores direto e reverso para a amplificação secundária.

^c Os produtos da reação de amplificação secundária serão adicionados separadamente.

Quadro 8. Programa para as amplificações primárias e secundárias dos isolados TgPgBr1-5 de *Toxoplasma gondii*.

Número de ciclos	Temperatura	Período
1	94°C	4 minutos
35	94°C	40 segundos
	58°C	40 segundos
	72°C	40 segundos
1	22°C	10 minutos
1	4°C	∞

As sequências dos iniciadores utilizados e as especificações do processo de digestão enzimática para cada marcador molecular e leitura através de eletroforese em gel de agarose são descritas no quadro 5. Para a reação de digestão enzimática dos produtos da reação secundária, estes foram submetidos a um procedimento com uma ou duas enzimas de restrição (quadro 5). Onde apenas uma enzima de restrição foi utilizada, o mesmo volume de água para PCR foi adicionado no lugar da

segunda enzima no preparo da solução mix. Esta solução foi preparada como especificado no quadro 9, para cada marcador separadamente.

Quadro 9. Volumes, concentrações e especificações dos reagentes utilizados na digestão enzimática dos produtos da nPCR dos isolados TgPgBr1-5 de *Toxoplasma gondii*.

Digestão enzimática dos produtos da nPCR			
Reagente	1 reação	10 reações^a	Especificações
Água para PCR	14,6 µl	146 µl	Sigma [®]
Tampão NEB 10X ^b	2 µl	20 µl	New England Biolabs [®]
BSA 100X	0,2 µl	2 µl	Sigma [®]
Enzima de restrição 1	0,1 µl	1 µl	New England Biolabs [®]
Enzima de restrição 2	0,1 µl	1 µl	New England Biolabs [®]
Produto da nPCR	3 µl	3 µl ^c	-

^a Cinco isolados TgPgBr1-5, um controle positivo e um controle negativo.

^b Tampões NEB 1, 2, 3 e 4 utilizados de acordo com especificações do fabricante.

^c Os produtos da nPCR serão adicionados separadamente.

Foram adicionados 17 µl da solução mix a microtubos de 0,5 ml (Eppendorf[®]) devidamente identificados para cada isolado e marcador. Foram então adicionados 3µl dos produtos da reação de amplificação secundária, incubando-se às temperaturas correspondentes (Thelco[®] Laboratory Incubator Precision). Após este período, 4 µl do corante 6X (Amresco[®] Agarose Gel Loading Dye) foram adicionados à reação, os padrões alélicos observados em gel de agarose 2-3% (Invitrogen[™] Ultrapure Agarose) e revelados em cuba de eletroforese (BioRad PowerPac Basic[™]) de acordo com o quadro 5.

4.10.2. O seqüenciamento

As amostras de DNA dos cinco isolados foram amplificadas através da nPCR (como descrito no item *a*) para oito marcadores genéticos: SAG1, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, L358, Apico e GRA6 (quadro 5) e tratadas em uma etapa adicional. Os produtos da nPCR foram purificados usando o kit ExoSAP-IT[®] (USB Corporation), como segue.

Cinco microlitros do produto da reação de nPCR foram adicionados a 2 µl da solução ExoSAP-IT[®], culminando em uma reação final de 7 µl, e incubados a 37°C durante 15 minutos para degradação dos iniciadores e nucleotídeos. Em seguida, a solução foi incubada a 80°C por 15 minutos para inativação da solução de ExoSAP-IT[®]. Os produtos da PCR foram mantidos a -20°C até seu envio para seqüenciamento do DNA do parasita.

As seqüências foram enviadas para uma companhia terceirizada que realiza seqüenciamento de forma rotineira para o LPD, NIH, sediada em Montana, EUA. As seqüências foram comparadas a seqüências referências tipos I, II e III através de um software para análises de seqüências de DNA chamado DNASTAR[®] (Lasergene) para a detecção dos genótipos do parasita. Os isolados referência tipos I, II e III utilizados no programa para cada marcador foram: SAG1 (RH, Me49, VEG), SAG3 (RH, PRU, CEP), BTUB (RH, Me49, CTG), c22-8 (RH, PTG, CTG), c29-2 (GT1, Me49, VEG), L358 (RH, PTG, CTG), GRA6 (RH, BEV, NED) e Apico (RH, Me49, VEG).

Através da comparação nucleotídeo a nucleotídeo das seqüências de DNA dos isolados TgPgBr1-5 com estas cepas referência foi possível verificar as semelhanças e diferenças detalhadamente. Quando todos os nucleotídeos presentes na seqüência de DNA de um dos isolados foram comuns ao genótipo referência tipo I, este isolado foi considerado possuidor de alelo tipo I para aquele *loci*. Quando todos os nucleotídeos presentes foram comuns ao genótipo referência tipo II, este isolado foi classificado como tipo II. Quando todos os nucleotídeos foram comuns ao genótipo tipo III, este isolado foi classificado como tipo III. No entanto, quando nucleotídeos comuns aos três genótipos foram detectados na seqüência de um isolado ao mesmo *loci*, este isolado foi considerado como possuidor de um alelo

atípico para o marcador em questão. O mesmo ocorreu a nucleotídeos diferentes dos encontrados para quaisquer dos três genótipos referência.

5. RESULTADOS

5.1. Prova biológica em camundongos

Cinco isolados de *T. gondii* foram detectados dentre os 35 tecidos de suínos analisados e foram designados TgPgBr1-5. Os dados a respeito da infectividade e patogenicidade a camundongos podem ser observados na tabela 1. Dois destes isolados foram obtidos de corações de suínos (TgPgBr2 e TgPgBr5) e três de cérebros (TgPgBr1, TgPgBr3 e TgPgBr4). Todos os isolados foram obtidos de tecidos adquiridos do mesmo açougue dentre os cinco estudados no principal mercado popular da cidade. Todos os isolados, exceto TgPgBr4, foram letais a 100% dos camundongos infectados primariamente. Camundongos infectados com o isolado TgPgBr4 apresentaram-se clinicamente normais ao longo de todo o período de observação. A infectividade deste isolado foi verificada através de sorologia pelo MAT (título $\geq 1:25$), observação de cistos cerebrais após seis semanas de infecção e taquizoítas nos pulmões dos camundongos nocaute mortos (tabela 1). Para os outros isolados o diagnóstico de toxoplasmose aguda foi dado através da observação de taquizoítas em esfregaços pulmonares. Todos os camundongos infectados com estes isolados morreram entre o 11^o e 15^o dia após a inoculação (DAI), com exceção de um camundongo infectado com o isolado TgPgBr2, que morreu ao 24^o DAI. Para os isolados TgPgBr1, 2, 3 e 5, dois camundongos inoculados com tecidos cerebrais de camundongos cronicamente infectados tornaram-se infectados e morreram.

Tabela 1. Infectividade e patogenicidade dos isolados de *Toxoplasma gondii* TgPgBr1-5 a camundongos.

Isolados	Número da amostra (tecido primário)	Data em que os tecidos foram obtidos	Mortos/infectados após inoculação com cérebros de camundongos infectados ^a	Mortos/infectados após inoculação com oocistos ^b			
				1	10	10 ²	10 ³
TgPgBr1	7 (cérebro)	01/08/2008	2/2	3/3	4/4	4/4	4/4
TgPgBr2	8 (coração)	01/08/2008	2/2	1/1	2/2	4/4	4/4
TgPgBr3	22 (cérebro)	25/08/2008	2/2	2/2	4/4	4/4	4/4
TgPgBr4	23 (coração)	25/08/2008	0/2 ^c	0/0	0/4 ^d	4/4	4/4
TgPgBr5	25 (cérebro)	25/08/2008	2/2	2/2	3/3	4/4	4/4

^a De dois camundongos inoculados; todos os camundongos nocautes morreram.

^b De quatro camundongos inoculados.

^c Positivo através do MAT (título ≥ 25).

^d Positivo através do MAT (título ≥ 50) e através da presença de cistos no cérebro.

Tabela 2. Período de sobrevivência dos camundongos inoculados com tecidos primários e oocistos dos isolados TgPgBr1-5 de *Toxoplasma gondii*.

Isolados	Período de sobrevivência (dias) após inoculação com tecidos primários	Período de sobrevivência (dias) após inoculação com oocistos			
		1	10	10 ²	10 ³
TgPgBr1	12, 12	10, 12, 13	9, 9, 10, 10	8, 9, 9, 9	8, 8, 8, 9
TgPgBr2	15, 24	10	9, 9	9, 9, 9, 9	8, 8, 9, 9
TgPgBr3	11, 14	11, 19	9, 10, 10, 10	8, 8, 9, 9	7, 7, 8, 8
TgPgBr4	- ^a	-	-	10, 10, 12, 13	7, 8, 8, 10
TgPgBr5	11, 12	9, 11	9, 11, 11	8, 9, 9, 9	8, 8, 8, 8

^a Nenhum camundongo morto.

5.2. Patogenicidade dos oocistos a camundongos

Apenas um oocisto foi suficiente para matar camundongos para todos os isolados, exceto TgPgBr4, para o qual a dose letal foi 100 vezes maior (tabela 1). A dose infectiva para este isolado foi 10 oocistos, verificado através de sorologia por MAT (título $\geq 1:50$) e presença de cistos no cérebro após seis semanas. Desta forma, este isolado foi menos infectivo ou patogênico a camundongos. As doses 10² e 10³ oocistos foram capazes de matar todos os camundongos infectados. O isolado mais patogênico foi TgPgBr1, que matou 15 de todos os 16 camundongos inoculados. As mortes dos camundongos ocorreram entre o 7^o e o 13^o DAI, com exceção de um camundongo inoculado com um oocisto do isolado TgPgBr3, que morreu no 19^o DAI (tabela 2).

Para os quatro camundongos inoculados com um oocisto do isolado TgPgBr1, três foram infectados e três morreram entre o 10^o e o 13^o DAI. Para os quatro

camundongos inoculados com um oocisto do isolado TgPgBr2, um tornou-se infectado e um morreu no 10º DAI. Para os quatro camundongos inoculados com um oocisto do isolado TgPgBr3, dois tornaram-se infectados e dois morreram entre o 11º e o 19º DAI. Para os quatro camundongos inoculados com um oocisto do isolado TgPgBr4, nenhum se tornou infectado ou morreu. Para os quatro camundongos inoculados com um oocisto do isolado TgPgBr5, dois tornaram-se infectados e dois morreram entre o 9º e o 11º DAI (tabelas 1 e 2).

Para os quatro camundongos inoculados com 10 oocistos do isolado TgPgBr1, todos se tornaram infectados e todos morreram entre o 9º e o 10º DAI. Para os quatro camundongos inoculados com 10 oocistos do isolado TgPgBr2, dois tornaram-se infectados e dois morreram no 9º DAI. Para os quatro camundongos inoculados com 10 oocistos do isolado TgPgBr3, todos se tornaram infectados e morreram entre o 9º e o 10º DAI. Para os quatro camundongos inoculados com 10 oocistos do isolado TgPgBr4, todos se tornaram infectados mas nenhum morreu. Para os quatro camundongos inoculados com 10 oocistos do isolado TgPgBr5, três tornaram-se infectados e três morreram entre o 9º e o 11º DAI. Para as doses 10^2 e 10^3 oocistos, todos os quatro camundongos inoculados para cada um dos isolados tornaram-se infectados e morreram entre o 7º e o 13º DAI (tabelas 1 e 2).

5.3. Caracterização genética através da multilocus PCR-RFLP

A análise dos fragmentos de restrição por eletroforese em gel de agarose para os cinco isolados TgPgBr1-5 permitiu identificar quatro genótipos, descritos na tabela 3. O genótipo 1 inclui os isolados TgPgBr1 e 2, o genótipo 2 o isolado TgPgBr3, o genótipo 3 o isolado TgPgBr4 e o genótipo 4 o isolado TgPgBr5. Não foi detectado qualquer genótipo clonal. Os isolados TgPgBr1 e 2 apresentaram os mesmos alelos para todos os *loci* analisados, o que os classifica no mesmo genótipo. Os outros isolados apresentaram diferentes padrões alélicos para pelo menos dois *loci* e todos os genótipos apresentaram alelos atípicos através da multilocus PCR-RFLP.

Através das figuras 2-8, pode-se verificar os fragmentos de restrição após a digestão com as enzimas específicas por marcador molecular para os cinco isolados TgPgBr1-5. Para o marcador SAG1 (figura 2), pode-se observar a presença de

fragmentos condizentes com o alelo tipo II/III para os isolados TgPgBr1, 2 e 4, e alelo atípico para os isolados TgPgBr3 e 5. Para o marcador SAG2 (figura 3), pode-se observar a presença de fragmentos condizentes com o alelo tipo I para os isolados TgPgBr1, 2, 3 e 5, e alelo atípico para o isolado TgPgBr4. Para o marcador SAG3 (figura 4), pode-se observar a presença de fragmentos condizentes com o alelo tipo III para todos os isolados. Para o marcador BTUB (figura 5), pode-se observar a presença de fragmentos condizentes com o alelo tipo I para os isolados TgPgBr1, 2 e 3, e alelo tipo III para os isolados TgPgBr4 e 5. Para o marcador c22-8 (figura 6), pode-se observar a presença de fragmentos condizentes com o alelo tipo I para o isolado TgPgBr5, alelo tipo II para o isolado TgPgBr3, alelo tipo III para o isolado TgPgBr4 e alelos atípicos para os isolados TgPgBr1 e 2. Para o marcador c29-2 (figura 7), pode-se observar a presença de fragmentos condizentes com o alelo tipo I para os isolados TgPgBr1, 2, 3 e 5, e alelo tipo III para o isolado TgPgBr4. Para o marcador PK1 (figura 8), pode-se observar a presença de fragmentos condizentes com o alelo tipo I para todos os isolados.

Para os genótipos 1 e 2 foi observada predominância de alelos tipo I. Os alelos diferentes do tipo I detectados para o genótipo 1 foram: um tipo II/III, um tipo III e um atípico aos *loci* SAG1, SAG3 e c22-8, respectivamente. Para o genótipo 2, os alelos diferentes do tipo I foram um alelo atípico, um tipo III e um tipo II aos *loci* SAG1, SAG3 e c22-8. O genótipo 3 apresentou predominância de alelos tipo III, com exceção para os *loci* SAG1, SAG2 e PK1, que apresentaram um alelo tipo II/III, um atípico e um tipo I, respectivamente. O genótipo 4 apresentou predominância de alelos tipo I. Os alelos diferentes do tipo I para este genótipo foram: um atípico para o SAG1, um tipo III para o SAG3 e um tipo III para BTUB (tabela 3).

Os genótipos 1 e 2 apresentaram cinco alelos iguais para os *loci* SAG2, SAG3, BTUB, c29-2 e PK1. Os genótipos 2 e 3 apresentaram apenas dois alelos iguais, para os *loci* SAG3 e PK1. Os genótipos 3 e 4 apresentaram três alelos iguais para os *loci* SAG3, BTUB e PK1. Os genótipos 1 e 3 apresentaram três alelos iguais, para os *loci* SAG1, SAG3 e PK1. Os genótipos 2 e 4 apresentaram cinco alelos iguais para os *loci* SAG1, SAG2, SAG3, c29-2 e PK1, com alelos atípicos compartilhados ao *loci* SAG1. Os genótipos 1 e 4 apresentaram igualdade de alelos para os quatro *loci* SAG2, SAG3, c29-2 e PK1 (tabela 3).

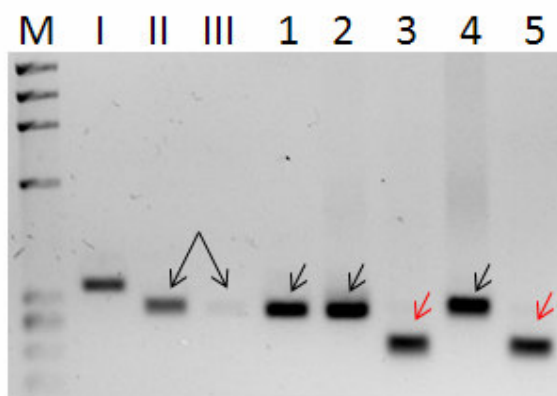


Figura 2. Fragmentos de restrição para o locus **SAG1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas Sal96I e HaeII dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo III/III; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo atípico.

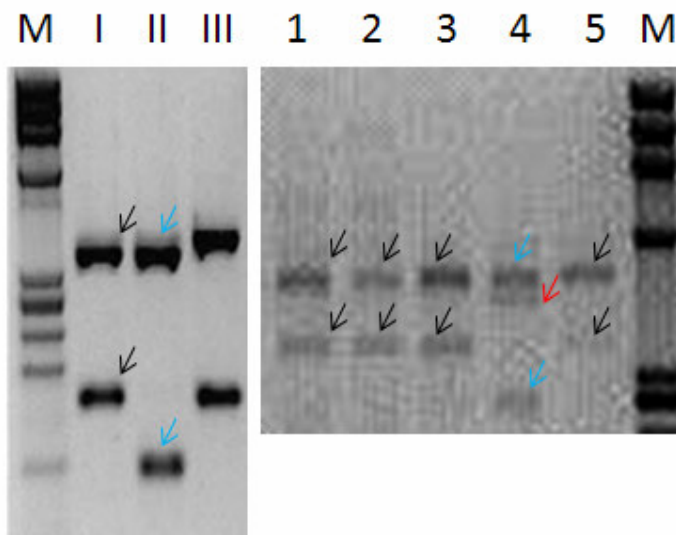


Figura 3. Fragmentos de restrição para o locus **SAG2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HinfI e TaqI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III retirados de Su et al. (2006); **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo II; **seta vermelha**, fragmento característico de alelo atípico.

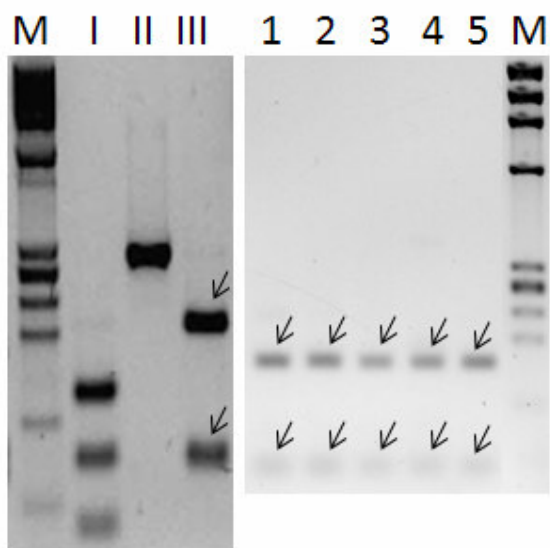


Figura 4. Fragmentos de restrição para o locus **SAG3** de *Toxoplasma gondii* após digestão com a enzima NciI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo III.

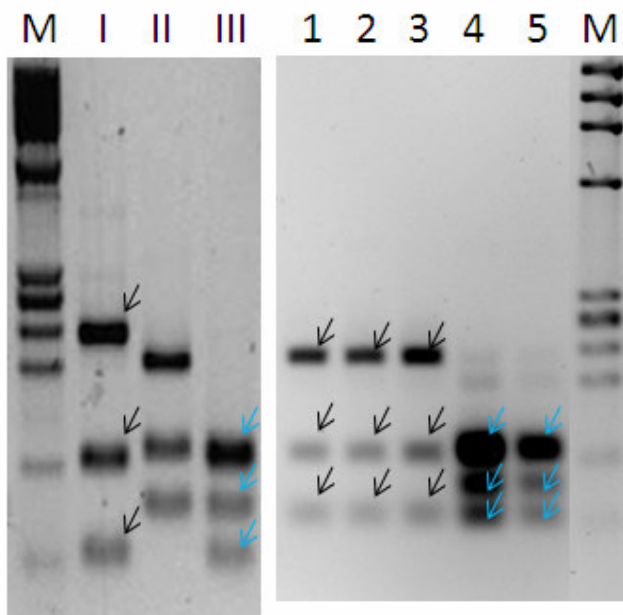


Figura 5. Fragmentos de restrição para o locus **BTUB** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsiEI e TaqI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo III.

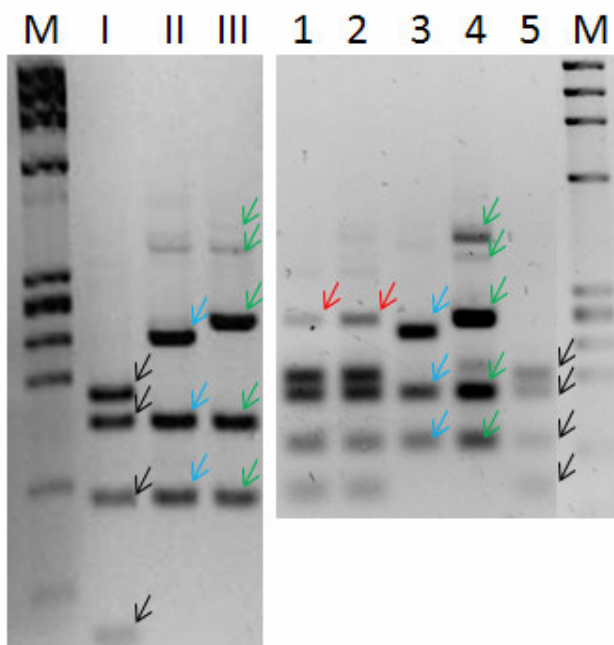


Figura 6. Fragmentos de restrição para o locus **c22-8** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsmAI e MbolI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo II; **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo III; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo atípico.

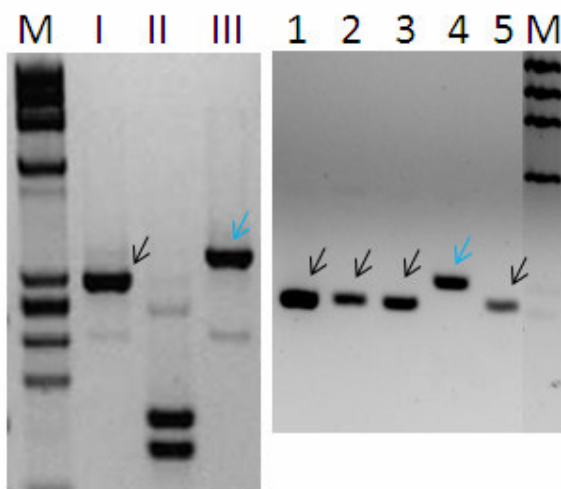


Figura 7. Fragmentos de restrição para o locus **c29-2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HpyCH4IV e RsaI dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/HaeIII; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo III.

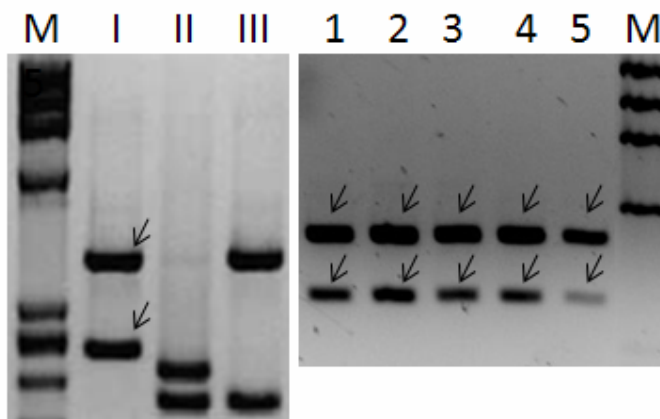


Figura 8. Fragmentos de restrição para o locus **PK1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas *AvaI* e *RsaI* dos isolados TgPgBr1-5. **M**, marcador de peso molecular Phix174/*HaeIII*; **I, II, III**, DNAs referência tipos I, II, III; **1, 2, 3, 4, 5**, DNAs dos isolados TgPgBr1-5; **setas pretas**, fragmentos característicos de alelo tipo I.

5.4. Caracterização genética através do seqüenciamento

A caracterização genética através do seqüenciamento também permitiu identificar quatro genótipos dentre os cinco isolados estudados, como observado na tabela 4. A igualdade de alelos para todos os *loci* foi confirmada para os isolados TgPgBr1 e 2, assim como as diferenças entre os demais isolados. A análise das seqüências também permitiu verificar a ausência dos genótipos clonais, mas detectou uma maior quantidade de alelos atípicos em comparação à multilocus PCR-RFLP.

Observando a tabela 5 verifica-se que através do seqüenciamento foram detectados oito alelos atípicos enquanto através da multilocus PCR-RFLP foram detectados apenas três, para os marcadores comuns a ambas as técnicas: SAG1, SAG3, BTUB, c22-8 e c29-2. Comparando-se ambas as técnicas para estes marcadores em comum verifica-se que a predominância de alelos para os genótipos 2 e 4 foi diferente. O genótipo 1 manteve a predominância de alelos tipo I verificada pela multilocus PCR-RFLP, com a adição de um alelo tipo I ao marcador SAG1. O genótipo 2, predominantemente tipo I para a análise pela multilocus PCR-RFLP, reduziu o número de alelos tipo I de dois para um, tornando-se predominantemente atípico, com três alelos desta característica para o seqüenciamento contra um para a multilocus PCR-RFLP para os marcadores comuns.

A predominância de alelos tipo III foi confirmada para o genótipo 3, mantendo o número de quatro alelos para esta característica. O genótipo 4, que possuía um equilíbrio de dois alelos tipo I e dois tipo III, mudou completamente sua predominância para atípico, passando de um alelo para quatro enquanto os alelos tipo I e III foram reduzidos para zero e um, respectivamente, para os marcadores comuns (tabela 5).

Três dos quatro genótipos descritos nesta pesquisa (genótipos 1, 2 e 4), como pode ser observado na figura 9, apresentaram nucleotídeos não observados para quaisquer linhagens clonais. Para o isolado TgPgBr1 (genótipo 1), nucleotídeos atípicos foram detectados aos *loci* c22-8 (nucleotídeo 24) e GRA6 (nucleotídeo 171, 610, 643 e 676). Para o isolado TgPgBr3 (genótipo 2) foram detectados nucleotídeos atípicos para os *loci* c29-2 (nucleotídeo 9) e L358 (nucleotídeos 101 e 110). Para o isolado TgPgBr5 foram detectados nucleotídeos atípicos aos *loci* c29-2 (nucleotídeo 9) e L358 (nucleotídeos 197 e 234). É possível observar que os isolados TgPgBr3 e 5 apresentaram modificações para os mesmos *loci*: c29-2 e L358, incluindo a mesma modificação para o nucleotídeo 9 ao *locus* c29-2 (os isolados referência apresentaram uma adenina enquanto os isolados TgPgBr3 e 5 apresentaram uma guanina) (figura 9).

A comparação do número total de alelos através de ambas as técnicas para os marcadores comuns (tabela 5) permite observar uma redução do número de alelos tipos I, II e III da multilocus PCR-RFLP para o seqüenciamento. Através desta técnica, foi possível observar um quase equilíbrio no total de alelos atípicos e tipo III (oito e sete alelos respectivamente), diferentemente do que era estabelecido pela RFLP (três atípicos e oito tipo III) (tabela 5).

Na tabela 4 é possível observar detalhes da análise das seqüências para todos os marcadores usados nesta técnica: SAG1, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, L358, GRA6 e Apico. O genótipo 1 apresentou predominância de alelos tipo I (cinco alelos), exceto para os *loci* SAG3 (tipo III), c22-8 (atípico) e GRA6 (atípico). O genótipo 2 apresentou predominância de quatro alelos atípicos (SAG1, c22-8, c29-2 e L358), mas também dois alelos tipo I (BTUB e Apico), um alelo tipo III (SAG3) e um tipo II (GRA6). O genótipo 3 apresentou predominância de alelos tipo III, exceto para o *loci* SAG1 (II/III) e Apico (I). Finalmente, o genótipo 4 foi predominantemente atípico (seis alelos), exceto para os marcadores SAG3 (III) e Apico (I).

Tabela 3. Caracterização genética dos isolados de *Toxoplasma gondii* TgPgBr1-5 através da multilocus PCR-RFLP.

Genótipos	Isolados	Marcadores genéticos								Referências
		SAG1	SAG2	SAG3	BTUB	c22-8	c29-2	PK1		
Tipo I	RH88	I	I	I	I	I	I	I	I	Dubey et al. (2008)
Tipo II	PTG	II/III	II	II	II	II	II	II	II	
Tipo III	CTG	II/III	III	III	III	III	III	III	III	
Brl	TgCkBr123,124,55 79, 86, 87, 10, 98, 101, 102, 104, 144 TgCatBr 42, 47, 53, 54, 55, 62, 71, 75	I	I	III	I	u-1 ^a	I	I	I	Dubey et al. (2008) Pena et al. (2008)
BrII	TgCkBr 57, 64, 97 TgCatBr 39, 51, 52, 56, 61, 68, 77, 78	I	II	III	III	I	III	II	II	Dubey et al. (2008) Pena et al. (2008)
BrIII	TgCkBr 11, 7, 17, 131, 132, 133, 134 TgCatBr 58, 59, 60, 73, 74	I	III	III	III	II	III	III	III	Dubey et al. (2008) Pena et al. (2008)
BrIV	TgCkBr 81, 147, 148, 151, 154, 160, 162, 163	u-1	II	III	III	u-1	I	III	III	Dubey et al. (2008)
-	TgCkBr 41, 42, 49, 60, 62	u-1	II	III	I	II	I	I	I	Dubey et al. (2008)
-	TgCkBr 46	u-1	II	III	I	II	I	I	I	Dubey et al. (2008)
Genótipo 1	TgPgBr1, TgPgBr2	II/III	I	III	I	u-1	I	I	I	Esta pesquisa
Genótipo 2	TgPgBr3	u-1	I	III	I	II	I	I	I	
Genótipo 3	TgPgBr4	II/III	u-1	III	III	III	III	III	I	
Genótipo 4	TgPgBr5	u-1	I	III	III	I	I	I	I	

^a Alelos atípicos.**Tabela 4.** Caracterização genética dos isolados de *Toxoplasma gondii* TgPgBr1-5 através do seqüenciamento.

Genótipos	Isolados	Marcadores genéticos							
		SAG1	SAG3	BTUB	c22-8	c29-2	L358	Apico	GRA6
Genótipo 1	TgPgBr1, TgPgBr2	I	III	I	u-1	I	I	I	u-1
Genótipo 2	TgPgBr3	u-1 ^a	III	I	u-2 ^a	u-1	u-1	I	II
Genótipo 3	TgPgBr4	II/III	III	III	III	III	III	I	III
Genótipo 4	TgPgBr5	u-1	III	u-1	u-3 ^a	u-1	u-2	I	u-2

^a Alelos atípicos.

TgPgBr1	c22-8	Tipo I Tipo II Tipo III TgPgBr1	<pre> 20 30 ----- GCTGCGTTTCGTTTCTTTI ----- gctgcgtttcgtttctttt gctgcgtttcgtttctttt gctgcgtttcgtttctttt GCTGCGTTTCGTTTCTTTI </pre>
	GRA6	Tipo I Tipo II Tipo III TgPgBr1	<pre> 170 180 600 610 620 640 650 670 680 ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- GGTGGTGTTAAGCAGACCCC AGGCAATAATGCT-gggaacggt AGAGGTTACGGAGGCAGAG GAGGATGACAGGCGCSCG ggtggtgttaagcagacccc aggcaataatgct-gggaacggt agaggttacggaggcagag gaggatgacaggcgcccg ggtggtgttaagcagacccc aggcaataatgct-gggaacggt agaggt----- gaggatgacaggcgcccg gatggtgttaagcagacccc aggcaataatgct-gggaacggt agaggttacggaggcagag gaggatgacaggcgcccg GGTGGTGTTAAGCAGACCCC AGGCAATAATGCT-gggaacggt AGAGGTTACGGAGGCAGAG GAGGATGACAGGCGCGC </pre>
TgPgBr3	c29-2	Tipo I Tipo II Tipo III TgPgBr3	<pre> 10 ----- GTGATGTGAGAATGGATA ----- GTGATGTGAGAATGGATA GTGATGTGAGAATGGATA GTGATGTGAGAATGGATA GTGATGTGAGAATGGATA </pre>
	L358	Tipo I Tipo II Tipo III TgPgBr3	<pre> 100 110 120 ----- ----- ----- GCTTCTCTCCCGCTTCTCCGTCGAAACG ----- gcttctctccccgcttctccgctcgaaacg gcttctctccccgcttctccgctcgaaacg gcttctctccccgcttctccgctcgaaacg GCTTCTCTCCCGCTTCTCCGTCGAAACG </pre>
TgPgBr5	C29-2	Tipo I Tipo II Tipo III TgPgBr5	<pre> 10 ----- GTGATGTGAGAATGGATA ----- GTGATGTGAGAATGGATA GTGATGTGAGAATGGATA GTGATGTGAGAATGGATA GTGATGTGAGAATGGATA </pre>
	L358	Tipo I Tipo II Tipo III TgPgBr5	<pre> 190 200 230 240 ----- ----- ----- ----- TCTATCAGCGGGGTGGCCG ACGCGCAGCCGAGCGAAAGG ----- tctatcagcggggtggcgg acgcgcagccgagcgaagg tctatcagcggggtggcgg acgcgcagccgagcgaagg tctatcagcggggtggcgg acgcgcagccgagcgaagg TCTATCAGCGGGGTGGCCG ACGCGCAGCCGAGCGAAAGG </pre>

Figura 9. Nucleotídeos atípicos não observados para os alelos clonais I, II e III de *Toxoplasma gondii* (círculos vermelhos) e detectados nas seqüências de DNA dos isolados TgPgBr1, 3 e 5.

Tabela 5. Distribuição alélica para os marcadores SAG1, SAG3, BTUB, c22-8 e c29-2, comuns a ambas as técnicas multilocus PCR-RFLP e seqüenciamento durante a caracterização genética dos isolados de *Toxoplasma gondii* TgPgBr1-5.

Alelos	Genótipo 1		Genótipo 2		Genótipo 3		Genótipo 4		Total	
	RFLP ^a	Seq. ^b	RFLP	Seq.	RFLP	Seq.	RFLP	Seq.	RFLP	Seq.
I	2	3	2	1	0	0	2	0	6	4
II	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
III	1	1	1	1	4	4	2	1	8	7
Atípicos	1	1	1	3	0	0	1	4	3	8
II/III	1	0	0	0	1	1	0	0	2	1

^a Distribuição dos alelos pela técnica multilocus PCR-RFLP.

^b Distribuição dos alelos pela técnica de seqüenciamento.

Os genótipos 1 e 2 apresentaram igualdade de três alelos (SAG3, BTUB e Apico). Os genótipos 2 e 3 apresentaram igualdade de apenas dois alelos (SAG3 e Apico). Os genótipos 3 e 4 apresentaram igualdade de apenas dois alelos (SAG 3 e Apico). Os genótipos 1 e 4 apresentaram igualdade de quatro alelos (SAG3, c22-8, Apico e GRA6). Os genótipos 1 e 3 apresentaram igualdade de dois alelos (SAG3 e Apico). Os genótipos 2 e 4 apresentaram igualdade de cinco alelos (SAG1, SAG3, c29-2, L358 e Apico), sendo três atípicos (SAG1, c29-2 e L358).

6. DISCUSSÃO

Os genótipos detectados nesta pesquisa são diferentes de qualquer outro genótipo já descrito para isolados brasileiros (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008). Comparando-se os padrões alélicos para os marcadores analisados aqui pela multilocus PCR-RFLP com aqueles previamente descritos por Dubey et al. (2008) e Pena et al. (2008) para galinhas e gatos de várias regiões do Brasil, os genótipos 1–4 apresentados nesta pesquisa são únicos. Estes genótipos não se encaixam em nenhum dos quatro principais grupos genotípicos descritos no Brasil: tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV (Tabela 3). Por outro lado, o genótipo 1 demonstrou similaridade de seis alelos (dos sete marcadores em comum) com o genótipo BrI (SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2 e PK1). Ainda, o genótipo 2 demonstrou similaridade de seis alelos com os isolados TgCkBr 41, 42, 49, 60, 62 (SAG1, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2 e PK1) e com o isolado TgCkBr 46 (SAG1, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2 e PK1), descritos em galinhas no Brasil (DUBEY et al., 2008) através da multilocus PCR-RFLP.

Na pesquisa realizada por Khan et al. (2006) isolados de casos clínicos de toxoplasmose ocular humana e animais do Brasil foram caracterizados através da multilocus PCR-RFLP para os marcadores 5´SAG2, 3´SAG2, BTUB, SAG3 e GRA6. Comparando os resultados dessa pesquisa com os genótipos detectados no presente trabalho, foram verificadas similaridades para os marcadores SAG3 (tipo III) e BTUB (tipo III), genótipos 3 e 4, com um genótipo de um cão e três casos humanos (um paciente com toxoplasmose recorrente, um com toxoplasmose aguda e um que adquiriu a doença de um surto após a ingestão de carne de porco infectada). Apesar da similaridade, estes pesquisadores utilizaram apenas dois marcadores RFLP em comum, e hoje se sabe que nenhuma conexão concreta pode ser feita entre os genótipos brasileiros baseados em apenas dois marcadores genéticos, tendo em vista as recentes descobertas utilizando-se 10 marcadores RFLP para caracterização genética de isolados brasileiros de *T. gondii* (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008).

O fato de todos os isolados desta pesquisa terem sido adquiridos do mesmo açougue, dentre os cinco estudados, confirma a grande variação genética do parasita nesta cidade endêmica para toxoplasmose humana, e até mesmo para o

Brasil, como descrito em outros estudos (DUBEY et al., 2007a, c; 2008; PENA et al., 2008). Isto é reforçado pelo fato de que foram detectados quatro genótipos diferentes dentre apenas cinco isolados. A frequência total de isolamento para todas as amostras adquiridas foi 15,28% (5 de 35) e para as amostras adquiridas do único açougue positivo foi 38,46% (5 de 13). Muitos açougueiros adquirem sua carne de suínos criados em propriedades familiares da cidade, mas em muitos casos estes animais são criados pelo próprio açougueiro no quintal de sua residência.

A possibilidade de um alto nível de recombinação sexual entre os isolados brasileiros já foi levantada por outros autores (FERREIRA et al., 2006) e a análise da rede filogenética formada por estes isolados demonstrou que ela é muito reticulada, o que realmente sugere altos níveis de recombinação dentro da população do parasita. A contaminação ambiental na cidade de Campos dos Goytacazes é muito alta (da SILVA et al., 2003), o que reforça a possibilidade de alto nível de recombinação sexual do parasita na região, devido às grandes quantidades de hospedeiros intermediários que podem ser infectados e servirem como uma fonte de infecção a gatos (PENA et al., 2008). O número de gatos de rua nesta cidade é alto, o que motivou o Centro de Controle de Zoonoses a iniciar um programa de controle populacional que inclui cirurgia de esterilização gratuita para animais domésticos. O aumento do número de gatos favorece uma maior concentração de oocistos no meio ambiente. O município sofre com constantes enchentes causadas pelo alto índice de chuvas, o que pode levar a uma disseminação dos oocistos a diferentes zonas da cidade. Conseqüentemente, esta disseminação pode estar contribuindo para a maior recombinação sexual de *T. gondii*, já que os hospedeiros definitivos podem ter contato com diferentes genótipos.

O município de Campos dos Goytacazes possui um nível elevado de infecção humana, chegando a 84% de positividade para a classe socioeconômica baixa (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar as principais rotas de infecção a seres humanos na cidade (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; da SILVA et al., 2003; DUBEY et al., 2003; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006). Para complementar estes estudos, que analisaram fatores de risco para infecção humana e a presença do parasita em animais de produção, é essencial conhecer as características genéticas dos isolados detectados, incluindo aqueles adquiridos no ambiente e tecidos de animais criados e comercializados nesta cidade. O genótipo descrito para estas fontes deve ser comparado a isolados

detectados em seres humanos para que seja possível ter uma visão ampla da dispersão da toxoplasmose. Técnicas moleculares como a multilocus PCR-RFLP e o seqüenciamento podem ajudar a encontrar conexões entre as possíveis fontes de infecção e os seres humanos, especialmente o seqüenciamento.

Outros estudos com isolados adquiridos de suínos no Brasil foram realizados. A região sul do Brasil é também conhecida por sua endemia de toxoplasmose humana, com alta incidência da doença ocular (KHAN et al., 2006). Belfort-Neto et al. (2007) analisaram língua e diafragma de suínos em abatedouros desta região. Eles realizaram uma análise de quatro isolados através da multilocus PCR-RFLP usando cinco marcadores, diretamente dos tecidos sem prova biológica. Os isolados designados 6T, 7T, 8T e 9T apresentaram as seguintes características genéticas: BTUB (todos tipo II), SAG3 (todos tipo III), GRA6 (tipos III, III, II e III), 5´SAG2 (todos tipo I) e 3´SAG2 (todos tipo I). A única correspondência destes isolados com os caracterizados na presente pesquisa foi para o marcador SAG3. Por outro lado, como os marcadores em comum entre ambos os estudos foram apenas dois (SAG3 e BTUB), e o estudo não fez qualquer análise biológica, não é possível comparar propriamente os isolados.

A caracterização biológica é essencial, especialmente em estudos com populações de *T. gondii* que apresentam alta variação de alelos atípicos. Na pesquisa de Belfort-Neto et al. (2007) é interessante notar que todos os isolados analisados apresentaram alelos tipo II para o *locus* BTUB, diferente dos genótipos de Campos dos Goytacazes que demonstraram tipos I, I, III e III para este mesmo *locus*. Dos genótipos da presente pesquisa, apenas o genótipo 2 apresentou alelo tipo II (ao marcador c22-8). Outro trabalho de dos Santos et al. (2005) analisou sete isolados de *T. gondii* de tecidos de suínos do estado de São Paulo, através da PCR-RFLP utilizando apenas um marcador SAG2, previamente descrito por Howe et al. (1997). Cinco destes isolados foram caracterizados como tipo III e os outros dois como tipo I. Este marcador SAG2 é a reunião das análises de dois *loci* (5´SAG2 e 3´SAG2) dentro do mesmo gene SAG2. O marcador SAG2 utilizado na presente pesquisa é diferente deste e mais eficiente, permitindo a diferenciação dos três tipos clonais através da análise de apenas um *locus* (SU et al., 2006).

Alguns dados sobre a caracterização de isolados de *T. gondii* de seres humanos no Brasil foram recentemente descritos. Ferreira et al. (2008) caracterizaram 87 isolados de *T. gondii* adquiridos de sangue e fluido cérebro-

espinhal de pacientes HIV positivos com toxoplasmose cerebral em São Paulo. O estudo foi realizado com os marcadores 5´SAG2, 3´SAG2, SAG3 e GRA6, e caracterizou 40 isolados como tipo I, quatro como tipo III, 13 atípicos (ou polimórficos), seis tipo II/III, nove tipo II e 15 não classificados por quaisquer marcadores. Estes últimos 15 isolados provavelmente tinham muitos alelos atípicos que não apresentavam quaisquer padrões clonais. Adicionalmente, os autores realizaram o seqüenciamento dos produtos da PCR para os isolados polimórficos e tipo II ao marcador SAG 3 e detectaram que estes isolados apresentavam polimorfismo para os arquétipos clonais.

Este é o primeiro seqüenciamento de isolados de *T. gondii* de suínos brasileiros. Os dados desta pesquisa estão de acordo com a afirmação de Dubey et al. (2008) que sugerem a existência de muitos outros genótipos únicos circulando no ambiente, detectáveis para as diferentes espécies hospedeiras. Os quatro genótipos detectados nesta pesquisa apresentam não apenas algumas diferenças alélicas entre eles, mas também diferenças nas predominâncias destes alelos. Foram observadas três predominâncias alélicas entre estes isolados: tipo I, tipo III e atípica. O genótipo 1 apresentou predominância de alelos tipo I, confirmado tanto pela multilocus PCR-RFLP como pelo seqüenciamento. Através do seqüenciamento, os genótipos 2 e 4 apresentaram predominância de alelos atípicos, enquanto o genótipo 3 foi considerado predominantemente tipo III para ambas as técnicas (tabela 5). Um alelo tipo II foi detectado para o genótipo 2 ao marcador GRA6 através do seqüenciamento (Tabela 4) e ao marcador c22-8 através da RFLP (Tabela 3). No entanto, este alelo tipo II à RFLP foi re-caracterizado através do seqüenciamento como sendo um alelo atípico. Ambas as técnicas serão comparadas mais adiante nesta discussão.

Os genótipos 2 e 4 apresentaram grande similaridade quando comparados. Além de quatro alelos de similaridade, estes dois genótipos apresentaram alelos atípicos para os *loci* SAG1, c22-8, c29-2 e L358 através do seqüenciamento (tabela 4). Adicionalmente, estes genótipos apresentaram alta patogenicidade a camundongos e como ambos os isolados foram obtidos de tecidos de suínos adquiridos do mesmo açougue no mesmo dia de amostragem isto pode representar sinal de recombinação sexual recente.

Os isolados TgPgBr 1 e 2, classificados nesta pesquisa como sendo do mesmo genótipo parecem pertencer a tecidos do mesmo hospedeiro. A evidência para isso

está no fato de que os tecidos de onde estes isolados foram obtidos (um cérebro e um coração) foram adquiridos do mesmo açougue no mesmo dia de amostragem (tabela 1). Em adição, os isolados foram igualmente patogênicos a camundongos (Tabelas 1 e 2).

Outra importante observação é que o genótipo 2 apresentou alelos tipo II, e a presença deste alelo é um importante achado que prova que, embora as linhagens clonais tipo II de *T. gondii* nunca tenham sido detectadas no Brasil, alelos desta linhagem circulam na natureza. Outros alelos tipo II foram detectados em três dos quatro principais genótipos do Brasil (BrII, BrIII e BrIV), mas tendo em vista os dados apresentados nesta tese, estes alelos precisam de confirmação através de seqüenciamento (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008).

Em pesquisas de caracterização genética de isolados com tamanha variação genética é importante saber quais marcadores foram mais eficientes para detectar alelos atípicos através de ambas as técnicas. Para RFLP, os marcadores que permitiram a detecção de alelos atípicos foram SAG1 (dois alelos atípicos), SAG2 (um alelo atípico) e c22-8 (um alelo atípico). Para o seqüenciamento, os marcadores que permitiram melhor identificação dos alelos atípicos foram GRA6 (três alelos atípicos), SAG1 (dois 2 alelos atípicos), c22-8 (três alelos atípicos), c29-2 (dois alelos atípicos), L358 (dois alelos atípicos) e BTUB (1um alelo atípico). Comparando ambas as técnicas para os marcadores em comum SAG1, SAG3, BTUB, c22-8 e c29-2, observou-se que dois marcadores que não permitiram a detecção de alelos atípicos através da RFLP foram capazes de fazê-lo através do seqüenciamento. Estes marcadores foram BTUB, que detectou 1 alelo atípico para o genótipo 4; e c29-2, que detectou 2 alelos atípicos para os genótipos 2 e 4. Estes marcadores deveriam ser analisados em estudos futuros com um maior número de isolados brasileiros com o objetivo de determinar um padrão nucleotídico que permita definir enzimas de restrição que poderiam melhor distinguir genótipos atípicos na região estudada e até mesmo Brasil através da multilocus PCR-RFLP.

Ainda, baseado em divergências encontradas entre a RFLP e o seqüenciamento para a caracterização genética dos isolados neste estudo, o seqüenciamento dos grupos genotípicos predominantes no Brasil BrI, BrII, BrIII e BrIV (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008) deve permitir uma melhora na acurácia da RFLP para a distinção de genótipos brasileiros. Outra consequência deste seqüenciamento poderia ser a completa modificação dos padrões alélicos

encontrados para os quatro principais genótipos do Brasil, como observado para os isolados apresentados na presente pesquisa.

Os três tipos clonais I, II e III diferem marcadamente em sua patogenicidade a camundongos. Os isolados tipo I são mais virulentos do que os tipos II e III e esta virulência é geneticamente controlada (HOWE et al., 1996; GRIGG et al., 2001; SU et al., 2002). Foi verificada uma correlação dos genótipos com os fenótipos para os quatro genótipos detectados na presente pesquisa. O genótipo 1, que apresentou predominantemente alelos tipo I foi também altamente patogênico a camundongos, pois foi capaz de matar 100% dos camundongos infectados primariamente e 50% dos camundongos inoculados com apenas um oocisto deste genótipo, como observado na tabela 1. Esta mesma patogenicidade foi verificada para os genótipos 2 e 4, mas estes apresentaram predominância de alelos atípicos através do seqüenciamento (tabelas 1 e 4). Para estes três genótipos 1, 2 e 4 a dose de um oocisto foi letal a camundongos predominantemente durante as primeiras duas semanas após a inoculação (tabela 2), consistente com a alta patogenicidade observada para a linhagem tipo I. O genótipo 3 apresentou predominância de alelos tipo III para ambas as técnicas moleculares e as características fenotípicas seguiram a menor patogenicidade a camundongos, comum a isolados clonais tipo III (tabelas 1, 2 e 3). Este genótipo não foi capaz de matar camundongos primariamente inoculados e a dose letal de oocistos foi 10^2 (tabela 1). Desta forma, as predominâncias de alelos tipos I e III mantiveram suas características fenotípicas a camundongos, verificada por outros autores (HOWE et al., 1996; GRIGG et al., 2001; SU et al., 2002). Por outro lado, foi verificado que a predominância de alelos atípicos também estava associada à alta patogenicidade a camundongos. Embora existam poucos estudos que mostrem qualquer correlação entre os genótipos atípicos de *T. gondii* e a toxoplasmose severa em seres humanos, casos da doença em pacientes imunocompetentes na Guiana Francesa ou Suriname (CARME et al., 2002; DEMAR et al., 2007) e outros casos de toxoplasmose congênita (AJZENBERG et al., 2002b) são mais freqüentemente associados a genótipos atípicos. É interessante notar que, para os genótipos 1, 2 e 4, todos os camundongos infectados morreram. Pena et al. (2008) afirmaram, baseados em muitos estudos, que os isolados descritos em muitos estados brasileiros e classificados no mesmo genótipo apresentaram virulência similar, e isto é outra evidência de que o fenótipo de *T. gondii* está associado com o genótipo.

O seqüenciamento permite a observação de diferenças genéticas de nucleotídeo a nucleotídeo, e desta forma é muito mais acurada para diferenciar os isolados detectados no Brasil, pois estes têm um alto nível de recombinação genética. A multilocus PCR-RFLP como é realizada em estudos de caracterização genética de *T. gondii* permite apenas a detecção dos sítios de digestão das enzimas de restrição, preconizado pela análise das linhagens clonais presentes em isolados da América do Norte, Europa e África. Desta forma, é capaz de detectar polimorfismos, mas não mononucleotídeos atípicos comuns a genótipos da América do Sul, especialmente Brasil, como observado no presente trabalho (figura 9). Pena et al. (2008) discutem que novos seqüenciamentos deveriam ser realizados com isolados brasileiros com o objetivo de melhorar a multilocus PCR-RFLP para adaptá-la à caracterização de isolados desta região. A vantagem da multilocus PCR-RFLP é que ela é uma técnica fácil de ser realizada e com boa resolução (SU et al., 2006), gerando informação valiosa para revelar a diversidade de *T. gondii* (PENA et al., 2008). No entanto, novos genótipos brasileiros são descobertos a cada pesquisa e pelo que se pode observar neste trabalho de pesquisa através do seqüenciamento o parasita é muito mais diversificado do que verificado pela multilocus PCR-RFLP (tabelas 4 e 5, figura 9). Apesar de Pena et al. (2008) terem detectado a predominância de quatro genótipos principais no Brasil, existem muitos outros genótipos e uma grande quantidade destes são representados por apenas um isolado, como observado na presente pesquisa e outras (DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008). O seqüenciamento é capaz de distinguir com precisão os genótipos brasileiros e, como foi verificado nesta pesquisa, com maior acurácia em comparação à RFLP. Comparando o total de alelos atípicos detectados através da RFLP para os marcadores SAG1, SAG3, BTUB, c22-8 e c29-2 (três alelos atípicos) com o total de alelos atípicos detectados através do seqüenciamento para os mesmos marcadores (oito alelos atípicos), torna-se evidente o poder analítico da última técnica (tabela 5). Um exemplo desta alta acurácia é o genótipo 2, para o qual a RFLP foi capaz de detectar um alelo atípico ao marcador SAG1, confirmado pelo seqüenciamento, porém outros nucleotídeos atípicos foram também detectados para os *loci* c22-8, c29-2 e L358 pelo seqüenciamento. Isto é um exemplo da diversidade genética deste genótipo. O genótipo 4 apresentou a maior quantidade de alelos atípicos, seis no total para os *loci* SAG1, BTUB, c22-8, c29-2, L358 e GRA6 através da análise das seqüências.

Ferreira et al. (2008), estudando isolados de *T. gondii* em seres humanos verificaram a alta capacidade de discriminação do seqüenciamento ao observar que isolados classificados como tipo II através da RFLP apresentaram vários polimorfismos para o marcador SAG3 através do seqüenciamento. Desta forma, de acordo com Pena et al. (2008), e baseado nos resultados do presente trabalho de pesquisa, a multilocus PCR-RFLP do jeito que ela é realizada nesta pesquisa está subestimando a verdadeira diversidade da população de *T. gondii* na América do Sul, especialmente Brasil.

Os genótipos atípicos detectados nesta pesquisa não são formados por apenas um grupo de polimorfismos contendo alelos previamente verificados para as linhagens clonais de *T. gondii*. Três dos quatro genótipos descritos nesta pesquisa (genótipos 1, 2 e 4), como pode ser observado na figura 9, apresentaram nucleotídeos não observados para quaisquer linhagens clonais. Esta é mais uma evidência da variação genética de *T. gondii* no Brasil e mais especificamente em Campos dos Goytacazes. Nesta pesquisa, nucleotídeos deste tipo foram detectados em todos os genótipos que apresentaram alelos atípicos (genótipos 1, 2 e 4). Os isolados TgPgBr3 e 5 apresentaram modificações para os mesmos *loci*: c29-2 e L358, incluindo a mesma modificação para o nucleotídeo 9 ao *locus* c29-2 (os isolados referência apresentaram uma adenina enquanto os isolados TgPgBr3 e 5 apresentaram uma guanina) (figura 9). Em vista do fato destes isolados serem provenientes do mesmo açougue no mesmo dia de coleta, esta semelhança nucleotídica atípica pode representar uma recombinação genética recente entre as linhagens da mesma região onde os suínos foram criados.

7. CONCLUSÕES

Os isolados apresentaram alta variação genética e os genótipos detectados nesta pesquisa são únicos. O seqüenciamento aumentou a capacidade de identificação dos marcadores BTUB e c29-2 para alelos atípicos em comparação ao seu uso em estudos com a multilocus PCR-RFLP. A presença de alelos atípicos foi correlacionada positivamente com a alta patogenicidade a camundongos e os genótipos foram fortemente correlacionados com os fenótipos. A multilocus PCR-RFLP do jeito que ela é realizada hoje não é capaz de detectar nucleotídeos atípicos. Os isolados brasileiros são mais diversificados do que verificado pela multilocus PCR-RFLP, pois os genótipos apresentaram maior número de alelos atípicos através do seqüenciamento. Desta forma, o seqüenciamento é mais preciso do que a multilocus PCR-RFLP para a caracterização genética de isolados brasileiros.

REFERÊNCIAS

- AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.L.; TIBAYRENC, M.; DARDÉ, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 15–21, 2002a.
- AJZENBERG, D.; COGNÉ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.H.; THULLIEZ, P.; FILISSETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÉ, M.L.. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 684–689, 2002b.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55–62, 2003.
- BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, D.; BELFORT Jr. R. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 111-114, 2007.
- BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MacDONALD, D. W. Parasite-altered behaviour: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific? **Parasitology**, v. 111, p. 403–409, 1995.
- BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MacDONALD, D. W. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the Biological Sciences**, v. 267, p. 1591–1594, 2000.
- BONFIOLI, A. A.; OREFICE, F. Toxoplasmosis. **Seminars in Ophthalmology**, v. 20, p. 129-141, 2005.
- BOSCH-DRIESEN, L. E.; BERENDSCHOT, T. T.; ONGKOSUWITO, J. V.; ROTHOVA, A. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. **Ophthalmology**, v. 109, p. 869–878, 2002.
- BROWN, A. S.; SCHAEFER, C. A.; QUESENBERRY Jr., C. P.; LIU, L.; BABULAS, V. P.; SUSSER, E. S. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, p. 767–773, 2005.
- CARME, B; BISSUEL, F.; AJZENBERG, D. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, 4037-4044, 2002.

- CARVALHEIRO, C. G.; MUSSI-PINHATA, M. M.; YAMAMOTO, A. Y.; de SOUZA, C. B.; MACIEL, L. M. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 485-491, 2005.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. **Microbiology Review**, v. 57, p. 953-994, 1993.
- CERMAKOVA, Z.; PRASIL, P.; RYSKOVA, O. Congenital toxoplasmosis: possibilities for laboratory diagnosis. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie**, v. 54, p. 75-77, 2005.
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>>. Acesso em: 28 jun. 2008.
- COLOMBO, F. A.; VIDAL, J. E.; PENALVA DE OLIVEIRA, A. C.; HERNANDEZ, A. V.; BONASSER-FILHO, F.; NOGUEIRA, R. S.; FOCACCIA, R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5044-5047, 2005.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. Taxonomy and life cycles. In: LONG, P. L. **Coccidiosis of man and domestic animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 2-16.
- da SILVA, D. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H.; LEHMANN, T.; DUBEY, J. P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in Southern Brazil highly endemic to humans. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 394-396, 2003.
- DARDÉ, M.L.; BOUTEILLE, B.; PERSTREAL, M. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiologic implications. **Journal of Parasitology**, v. 78, p. 909-912, 1992.
- DEMAR, M; AJZENBERG, D.; MAUBON, D. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 88-95, 2007.
- DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B; BUGNI, F. M.; DE CASTRO, M. V.; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 185-189, 2005.
- dos SANTOS, C. B. DE A.; DE CARVALHO, A. C. F. B.; RAGOZO, A. M. A.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; YAI, L. E. O.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 131, 207-211, 2005.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 1593-1598, 1994.

- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75-77, 1998.
- DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; DA SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, 851-853, 2003.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 56, p. 447-456, 1970.
- DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F. J.; NUNES de OLIVEIRA, L.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 299-305, 2008.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in pigs-The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89-103, 2009.
- DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**: CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988. 220 p.
- DUBEY, J.P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.; BANDINI, L.A.; KWOK, O.C.H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana. South America identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, p. 1559–1566, 2007b.
- DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M.C.B.; BANDINI, L.M.; YAI, L.E.O.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo. Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 60–64, 2007c.
- DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; BLACKSTON, C.R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S.M.; RAGOZO, A.M.A.; NISHI, S.M.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 99–105, 2002.
- DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L.; DOS SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul. Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 182-188, 2007a.
- DURLACH, R. A.; KAUFER, F.; CARRAL, L.; HIRT, J. Toxoplasmic lymphadenitis: clinical and serologic profile. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 625–631, 2003.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2003). Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: 25 jun. 2009.
- FELDMAN, H. A. Epidemiology of toxoplasma infections. **Epidemiologic Reviews**, v. 4, p. 204-213, 1982.
- FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A.; GRAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 22-31, 2006.
- FERREIRA, I. M. R.; VIDAL, J. E.; COSTA-SILVA, T. A.; MEIRA, C. S.; HIRAMOTO, R.M.; de OLIVEIRA, A. C. P; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 118, p. 221-227, 2008.
- FLEGR, J.; PREISS, M.; KLOSE, J.; HAVLICEK, J.; VITAKOVA, M.; KODYM, P. Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis, **Biological Psychology**, v. 63, p. 253–268, 2003.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E. **Toxoplasmose em bovinos e suínos, e a viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em encéfalos suínos no município de Campos dos Goytacazes/RJ**. Dissertação. Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006, 97p.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E., OLIVEIRA, F. C. R., PELISSARI-SANT'ANA, V., LOPES, C.W. *Toxoplasma gondii* in brains of pigs commercialized at the Municipality of Campos dos Goytacazes in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 33-36, 2006.
- FREYRE, A.; DUBEY, J. P.; SMITH, D. D.; FRENKEL, J. K. J. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 750-755, 1989.
- FRICKER-HIDALGO, H.; BRION, J. P.; DURAND, M.; CHAVANON, O.; BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H. Disseminated toxoplasmosis with pulmonary involvement after heart transplantation. **Transplant Infectious Disease**, v. 7, p. 38-40, 2005.
- FUENTES, I.; RUBIO, J.M.; RAMIREZ, C.; ALVAR, J. Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Human Toxoplasmosis in Spain: Direct Analysis from Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1566-1570, 2001.
- GARWEG, J. G.; VENTURA, A. C.; HALBERSTADT, M.; SILVEIRA, C.; MUCCIOLI, C.; BELFORT, R. J.; JACQUIER, P. Specific antibody levels in the aqueous humor and serum of two distinct populations of patients with ocular

- toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 287-295, 2005.
- GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, p. 161–165, 2001.
- HOGHOOGHI-RAD, N.; AFRAA, M. Prevalence of toxoplasmosis in humans and domestic animals in Ahwaz, capital of Khoozestan Province, south-west Iran. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 163-168, 1993.
- HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 136, p. 973–988, 2003.
- HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561–1566, 1995.
- HOWE, D.K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L.D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, 1997.
- HOWE, D.K.; SUMMERS, B.C.; SIBLEY, L.D. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 5193-5198, 1996.
- HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 206, p. 961-962, 1965.
- KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 942-949, 2006.
- KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G. A.; CLIFFORD, D. B.; SIBLEY, L. D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5881-5887, 2005.
- LEHMANN, T.; MARCET, P. L.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E. R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 11423–11428, 2006.
- LEWEKE, F. M.; GERTH, C. W.; KOETHE, D.; KLOSTERKOTTER, J.; RUSLANOVA, I.; KRIVOGORSKY, B.; TORREY, E. F.; YOLKEN, R. H. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 254, p. 4–8, 2004.

- LUFT, R. Z.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 157, p. 1-6, 1988.
- McALLISTER M. M. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p. 241-247, 2005.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (on organisme voisins) du gondi. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.
- NOBREGA ODE, T.; KARNIKOWSKI, M. G. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 358-360, 2005.
- NOVOTNA, M.; HANUSOVA, J.; KLOSE, J.; PREISS, M.; HAVLICEK, J.; ROUBALOVA, K. Probable neuroimmunological link between Toxoplasma and cytomegalovirus infections and personality changes in the human host. **Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 54, 2005.
- OLIVEIRA, B. C. **Toxoplasmose: perfil sorológico durante a gravidez e repercussões neonatais em maternidade pública de referência na cidade de Belém do Pará**. Tese. São Paulo, SP, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2002, 90 p.
- PASHANINA, T. P.; NAPALKOVA, G. M.; SOMOVA, V. V.; KORSAKOVA, I. I. Role of toxoplasmas in pathology of the vision organ. **Meditsinskaia Parazitologia i Parazitarnye Bolezni**, v. 3, p. 29-31, 2005.
- PENA, H.F.G.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; AND C. SU. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 561-569, 2008.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. Taxonomy and life cycles. In: LONG, P. L. **Coccidiosis of man and domestic animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 2-16.
- PEREIRA, M. G. Amostras de conveniência. In: Pereira, M. G. **Epidemiologia teoria e prática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 16.
- PINKERTON, H.; WEINMAN, D. *Toxoplasma* infection in man. **Archives of Pathology**, v. 30, p. 374-392, 1940.
- SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, p. 660-663, 1948.
- SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d'une malattiache ricorda in moltopunti il Kalazar dell'uomo. Nota

- preliminaire pel. **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.
- STANFORD, M. R.; SEE, S. E.; JONES, L. V.; GILBERT, R. E. Antibiotics for toxoplasmic retinochoroiditis: an evidence-based systematic review. **Ophthalmology**, v. 110, p. 926-931, 2003.
- SU, C.; HOWE, D. K.; DUBEY, J. P.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Identification of quantitative trait *loci* controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 10753-10758, 2002.
- SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841-848, 2006.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- TORRES, C. M. Sur une nouvelle maladie de l'homme caractérisée para la presence d'un parasite intracellulaire très proche du toxoplasma et de l'encephalitozoon, dans le tissu musculaire cardiaque, les muscles du squelet, le tissu cellulaire sous-cutané et le tissu nerveux. **Social Biology**, v. 97, 1778-1781, 1927.
- VALLOCHI, A.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M.; SILVEIRA, C.; BELFORT Jr., R.; RIZZO, L. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, p. 350-351, 2005.
- VELMURUGAN, G. V.; DUBEY, J. P.; SU, C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 314-318, 2008.
- VIDAL, J. E.; HERNANDEZ, A. V.; DE OLIVEIRA, A. C.; DAUAR, R. F.; BARBOSA, S. P. Jr.; FOCACCIA, R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. **AIDS Patient Care STDS**, v. 19, p. 626-634, 2005.
- WOLF, A.; COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an Encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. **Bulletin of the Neurology Institute of New York**, v. 6, p. 306-335, 1937.
- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis: verification by transmission to animals. **Science**, v. 89, p. 226-227, 1939.

- WOLF, A.; COWEN, D.; PAIGE, B. Toxoplasmic encephalomyelitis. IV – Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. **Journal of Experimental Medicine**, v. 71, p. 187-214, 1940.
- WULF, M. W. H.; VAN CREVEL, R.; PORTIER, R.; TER MEULEN, C. G.; MELCHERS, W. J. C.; VAN DER VEN, A.; GALAMA, J. M. D. Toxoplasmosis after Renal Transplantation: Implications of a Missed Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3544-3547, 2005.
- YOLKEN, R. H.; BACHMANN, S.; ROUSLANOVA, I.; LILLEHOJ, E.; FORD, G.; TORREY, E. F.; SCHROEDER, J. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in individuals with first-episode schizophrenia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 842–844, 2001.
- ZAKI, M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic animals in Pakistan. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 45, p. 4-5, 1995.