

Milena de Medeiros Clementino Andrade

**Prevalência da toxoplasmose em ovinos e caracterização
molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle &
Manceaux, 1909) obtidos de animais de produção no Estado
do Rio Grande do Norte**

**Belo Horizonte
Minas Gerais
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Pós-Graduação em Parasitologia

MILENA DE MEDEIROS CLEMENTINO ANDRADE

**Prevalência da toxoplasmose em ovinos e caracterização
molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle &
Manceaux, 1909) obtidos de animais de produção no Estado
do Rio Grande do Norte**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida
Vitor
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade
Neto
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte

Belo Horizonte
2012

Andrade, Milena de Medeiros Clementino.

Prevalência da toxoplasmose em ovinos e caracterização molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) obtidos de animais de produção no Estado do Rio Grande do Norte. [manuscrito] / Milena de Medeiros Clementino Andrade. – 2012.

123 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ricardo Wagner de Almeida Vitor. Co-orientador: Valter Ferreira de Andrade Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. *Toxoplasma gondii* - Teses. 2. Teste imunoenzimático – Teses. 3. Ovino - Parasito - Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 5. Parasitologia – Teses. 6. Parasitologia molecular – Teses. 7. Caracterização molecular. 8. Estudos soropidemiológicos. 9. Polimorfismo de fragmento de restrição. I. Vitor, Ricardo Wagner de Almeida. II. Andrade Neto, Valter Ferreira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. IV. Título.

CDU: 576.88/.89:577.2

COLABORAÇÃO:

Dra. Ana Carolina de Aguiar Vasconcelos Carneiro – ICB, UFMG
Dra. Mariângela Carneiro – ICB, UFMG

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus amados **Esposo** e **Pais**, presentes de Deus em minha vida, que investiram no meu sonho acreditando que era possível torná-lo em realidade. A vocês, todo o meu amor e gratidão!

Dedico.

“Ainda que eu ...conheça todos os mistérios e
toda a ciência... se não tiver amor, nada serei.”

I Carta aos Coríntios cap.13,vs. 2

PEGADAS NA AREIA

"Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando com o Senhor, e através do céu passavam cenas da minha vida. Para cada cena que se passava percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era o meu e o outro do Senhor. Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que, muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia. Notei, também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver.

Isso entristeceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor: - Senhor, Tu me disseste que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo, mas notei que, durante as maiores atribulações do meu viver, havia na areia dos caminhos da vida apenas um par de pegadas. Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de Ti. Tu me deixaste.

O Senhor me respondeu: - Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e do teu sofrimento. Quando viste na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que Eu, nos braços te carreguei..."

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fortaleceu em todos os eixos para a conclusão deste trabalho. Sem Ele, com certeza, nada poderia fazer. A Nossa Senhora Aparecida pela proteção.

Ao meu esposo, Everson Queiroz de Andrade, a pessoa que mais me incentivou a fazer o doutorado na UFMG, companheiro em todos os momentos da minha vida, pelos maravilhosos momentos que compartilhamos durante esses 11 anos, pelo seu amor e carinho. Te Amo!

Aos meus pais, Francisco e Ivaneide, por tudo o que eles fazem e representam para mim. Pelos conselhos, pela minha formação e ensinamentos, apoio, amor, dedicação e companheirismo incondicional. Agradeço a Deus por ter me dado pais tão maravilhosos... Amo muito vocês;

Ao meu amado sobrinho e afilhado, Pedro Henrique, que trouxe mais alegria a minha vida.

Aos meus irmãos pelo amor.

A minha avó, Inácia (*in memorian*) pelo carinho, exemplo de força e coragem.

Ao meu Orientador, professor Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, pela oportunidade, paciência e disposição em ensinar-me; Contigo aprendi muitas coisas além da toxoplasmose, agradeço pelo amigo generoso que encontrei todas as vezes que precisei desabafar. Você faz parte deste capítulo da minha vida, serei eternamente grata!

Ao meu co-orientador, professor Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto, pela amizade e segurança com que primeiramente me conduziu pelos caminhos da toxoplasmose. A admiração que tenho por ti é grande e o carinho e amizade ficam para sempre.

À Rosálida Estevan Nazar Lopes, a flor do nosso laboratório, não só pela essencial ajuda técnica neste trabalho, mas pelo seu dom especial em acolher com amor. O seu carinho de mãe foi essencial nessa minha caminhada, sem o seu apoio, até poderia ter concluído este trabalho, mas com toda certeza, o caminho teria sido muito mais árduo. Rosa, o afeto que tenho por ti é grande e sincero. Por tudo isso, sou muito grata a você minha amiga.

À secretária da pós-graduação de parasitologia, Sumara Aparecida Ferreira, pela valiosa amizade, conselhos e incentivo constante. O meu sincero reconhecimento e gratidão.

Ao técnico Edson Santana, um grande amigo, estando sempre disposto incondicionalmente a ajudar-me durante as coletas nas fazendas e abatedouros. Passamos por muitas dificuldades durante as viagens para coleta, várias vezes eu tive vontade de chorar, mas sua força e dedicação me ajudavam a seguir em frente. O meu “muito obrigada”!

À professora Dra. Maria de Fátima de Souza por ter me aberto às portas para o mundo da pesquisa.

À professora Dra. Antônia Cláudia Jácome da Câmara pelo incentivo e ensinamentos preciosos na fase de seleção para o doutorado. Sou muito grata!

À colaboradora, professora Dra. Mariângela Carneiro pela contribuição na análise estatística, leitura cuidadosa, sugestões e críticas fundamentais na elaboração do documento final e artigo.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa da Dra. Érika Martins Braga, pela grande oportunidade de realizar este trabalho de doutorado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, pela enorme contribuição à minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Toxoplasmose, Alice, Anderson, Breno, Carlos, Carol, Júlia, Letícia, Mariana e Renata, pela convivência agradável e pelos bons momentos que passamos.

Mais uma vez aos amigos, Carol, Breno e Mari, vocês foram essenciais para tudo isso acontecer. Aprendi e cresci com todos vocês. Muito obrigada. A amiga Lê, muito obrigada pela viagem de Aparecida do Norte que fizemos. Em especial a amiga Renata Andrade, por me acolher com carinho abrindo as portas da sua casa e de sua família.

Aos amigos de doutorado, especialmente a Luiza e Paula, por estar ao meu lado nos dias difíceis e pelos bons momentos que compartilhamos.

A funcionária Ellen Márcia da Silva pela colaboração na manutenção carinhosa com os camundongos.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação, Profa. Dra. Marilene Suzan Marques Michalick e Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo, pelas valiosas críticas e sugestões ao presente trabalho.

Aos membros integrantes da banca examinadora da defesa, Profa. Dra. Maria Regina Amendoeira, Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo e Profa. Dra. Solange Maria Gennari, por aceitarem o convite honrando-nos com suas presenças, pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar o trabalho.

Aos proprietários e funcionários das fazendas e abatedouros estudados, em especial a Idalécio, por terem acreditado na importância deste projeto e disponibilizarem alguns animais para este estudo.

Aos amigos, Dora, Cassinha e Arnaldo pela forma carinhosa como me acolheram quando cheguei em Belo Horizonte.

Ao Centro de Biociências (UFRN), na pessoa da Dra. Maria de Fátima Freire de Melo Ximenes, por ter disponibilizado a estrutura e transporte indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos do LABMAT, Aline, Andrea, Cecília, Cláudio Bruno, Graciele, Lis, Magaly, Norma, Thalles, Valéria e Ywliane.

As minhas amigas Bianca, Patrícia, Renata e Silvinha, por todo companheirismo, carinho e amizade.

A Fisioterapeuta Lycia, pelas ótimas sessões de Pilates que me proporcionaram uma melhor qualidade de vida, essenciais para o desenvolvimento deste documento.

A CAPES pelo apoio fundamental.

Aos demais colegas do Departamento de Parasitologia-ICB-UFMG, aqui não mencionados, mas que durante esses anos cruzaram esses corredores sempre com um sorriso e conversas descontraídas que me faziam bem.

A todos que contribuíram para realização deste sonho, o meu “muito obrigada”!

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
LISTA DE TABELA.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xx
LISTA DE QUADROS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRICO.....	1
1.2. O AGENTE ETIOLÓGICO.....	2
1.2.1. TAXONOMIA.....	2
1.2.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS.....	2
1.2.2.1. TAQUIZOÍTOS.....	2
1.2.2.2. BRADIZOÍTOS.....	3
1.2.2.3. OOCISTOS.....	3
1.2.3. BIOLOGIA DO <i>T. gondii</i>	5
1.3. MECANISMOS DE TRANSMISSÃO.....	6
1.4. TOXOPLASMOSE HUMANA.....	7
1.5. TOXOPLASMOSE EM OVINOS.....	8
1.6. DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE OVINA.....	11
1.7. SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE OVINA.....	12
1.8. ISOLAMENTO E VIRULÊNCIA DE CEPAS DE <i>T. gondii</i>	17
1.9. DIVERSIDADE BIOLÓGICA E GENÉTICA DE <i>T. gondii</i>	19
1.9.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. gondii</i> Em OVINOS.....	24
1.9.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. gondii</i> Em CAPRINOS.....	26
1.9.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. gondii</i> Em GALINHAS CAIPIRA.....	26
1.9.4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. gondii</i> Em SUÍNOS.....	28
1.9.5. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. gondii</i> De OUTROS ANIMAIS E HUMANOS.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. OBJETIVO GERAL.....	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCOS PARA TOXOPLASMOSE EM OVINOS PROCEDENTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE.....	36
4.1.1. ÁREA DE ESTUDO.....	36
4.1.2. PROCEDÊNCIA DOS OVINOS.....	37
4.1.3. AMOSTRAGEM DOS OVINOS.....	37
4.1.4. QUESTIONÁRIOS.....	38
4.1.5. COLETA DE SANGUE.....	38
4.1.6. <i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA).....	40
4.1.6.1. PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO.....	40
4.1.6.2. TESTE IMUNOENZIMÁTICO ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. gondii</i>	40
4.1.6.3. ENSAIO DE AVIDEZ DE IgG.....	41
4.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4.2. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>T. gondii</i> ISOLADO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE.....	43
4.2.1. PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS.....	43

4.2.2. LOCAL DO EXPERIMENTO.....	43
4.2.3. COLETA DE SANGUE.....	44
4.2.4. COLETA DE ÓRGÃOS.....	44
4.2.5. PROVAS SOROLÓGICAS.....	44
4.2.5.1. OVINOS.....	44
4.2.5.2. CAPRINOS.....	44
4.2.5.3. SUÍNOS.....	45
4.2.5.4. GALINHAS CAPIRA.....	45
4.2.6. ISOLAMENTO DE <i>T. gondii</i> Em CAMUNDONGOS.....	45
4.2.6.1. DIGESTÃO PÉPTICA.....	45
4.2.6.2. BIOENSAIO POR INOCULAÇÃO EM CAMUNDONGOS.....	46
4.2.6.3. MANUTENÇÃO DOS NOVOS ISOLADOS DE <i>T. gondii</i>	46
4.2.6.4. OBTENÇÃO DE TAQUIZOÍTOS.....	47
4.2.7. DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>T. gondii</i>	47
4.2.8. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE <i>T. gondii</i>	48
4.2.8.1. EXTRAÇÃO DO DNA.....	48
4.2.8.2. ANÁLISE GENÉTICA POR POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR – RFLP).....	48
4.2.8.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE GENOTIPAGEM.....	49
5. RESULTADOS.....	51
5.1. SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE EM OVINOS.....	51
5.1.1. CARACTERÍSTICAS POPULACIONAIS DAS AMOSTRAS ESTUDADAS PARA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i>	51
5.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS PROPRIEDADES PRODUTORAS DE OVINOS.....	52
5.1.3. SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE.....	55
5.1.4. AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG ANTI- <i>T. gondii</i>	57
5.1.5. ANÁLISE DE FATORES DE RISCO.....	59
5.1.5.1. ANÁLISE UNIVARIADA.....	59
5.1.5.2. ANÁLISE MULTIVARIADA.....	59
5.2. BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS E ISOLAMENTO DE <i>T. gondii</i>	64
5.2.1. OVINOS.....	64
5.2.2. CAPRINOS.....	64
5.2.3. SUÍNOS.....	65
5.2.4. GALINHAS CAPIRA.....	66
5.3. DETERMINAÇÃO DA VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>T. gondii</i> OBTIDOS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	67
5.4. ANÁLISE GENOTÍPICA.....	68
6. DISCUSSÃO.....	73
6.1. PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> EM REBANHOS OVINOS DE DUAS MESORREGIÕES DO RIO GRANDE DO NORTE.....	73
6.2. DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS ANTI- <i>T. gondii</i> Em OVINOS.....	76
6.3. FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i>	77
6.4. ISOLAMENTO DE <i>T. gondii</i> EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	79
6.5. VIRULÊNCIA DE <i>T. gondii</i>	82
6.6. GENOTIPAGEM DE <i>T. gondii</i>	83
7. CONCLUSÕES.....	88
8. REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS.....	106

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estimar a soroprevalência e fatores de risco para toxoplasmose em ovinos do estado do Rio Grande do Norte, bem como caracterizar os isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de animais de produção (ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira) naturalmente infectados do Estado. Foram testados através da técnica de ELISA soros de 930 ovinos provenientes de duas mesorregiões com características climáticas distintas, além da aplicação de dois questionários com dados da propriedade e individuais de cada animal. Anticorpos anti- *T. gondii* foram encontrados em 205 (22,1%) dos 930 ovinos testados. Os fatores de riscos para a infecção por *T. gondii* foram: presença de gatos, idade dos ovinos e a utilização de fonte de água não exposta para estes animais, caracterizando a existência de transmissão da infecção associada a oocistos esporulados de *T. gondii* no meio ambiente. A avaliação da avidéz de anticorpos IgG em 205 amostras positivas pelo ELISA convencional, mostrou que 168 (81,95%) dos animais apresentaram anticorpos IgG de alta avidéz e 37 (18,05%) anticorpos de baixa avidéz. Estes resultados sugerem a presença de ovinos em fase aguda da toxoplasmose no Estado do Rio Grande do Norte. Para isolamento de *T. gondii*, amostras de soros de 223 ovinos de 4 municípios, 50 caprinos de 3 municípios, 18 suínos de três municípios e 43 galinhas caipira de um município, abatidos para consumo humano no Estado do Rio Grande do Norte, foram testadas através do ELISA para detectar a presença de anticorpos anti-*T. gondii*. Dos animais soropositivos realizou-se o bioensaio em camundongos e foram obtidos 19 isolados, sendo 1 de caprino, 5 de suínos e 13 de galinhas caipira. *T. gondii* não foi isolado de ovinos. Os isolados foram divididos em dois grupos de acordo com o fenótipo de virulência para camundongos. Dezesete isolados (89,5%) foram caracterizados como virulentos e apenas dois (10,5%) foram identificados como avirulentos. Não foram observados isolados com fenótipo de virulência intermediária. A variabilidade genética dos isolados foi analisada por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) em 11 loci (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, *PK1* e Apico). As cepas RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como cepas de referência. Seis genótipos diferentes foram identificados, sendo três novos genótipos.

Não foi identificado nenhum genótipo arquetipo tipo I, II ou III nos isolados estudados. Não foi observada associação entre virulência e genotipagem dos isolados. Este estudo confirma a variabilidade genotípica do parasito no Brasil.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, ovinos, ELISA, soroprevalência, isolados, caracterização molecular, animais de produção, PCR-RFLP.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the seroprevalence and risk factors for toxoplasmosis in sheep from the state of Rio Grande do Norte, Brazil, as well as to characterize the isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from production animals (sheep, goats, swine, and free-range chickens) naturally infected in the state. Thus, serum samples of 930 sheep originated from two mesoregions with distinct climatic characteristics were tested by ELISA. In addition, two questionnaires requesting information from the farm and each individual animal were applied. Anti *T. gondii* antibodies were found in 205 (22.04%) of the 930 sheep tested. The risk factors associated to the infection were: presence of cats, age of sheep, and use of source of water not exposed to these animals, characterizing the existence of transmission of the infection associated to sporulated oocysts of *T. gondii* in the environment. Evaluation of avidity of IgG antibodies in 205 positive samples by conventional ELISA showed that 168 (81.95%) of the animals presented high-avidity IgG antibodies, and 37 (18.05%) low-avidity antibodies. These results suggest the presence of sheep in acute phase of toxoplasmosis in the state of Rio Grande do Norte. To isolate *T. gondii*, serum samples of 223 sheep of 4 municipalities, 50 goats from 3 municipalities, 18 swine from 3 municipalities and 47 free-range chickens from one municipality, slaughtered for human consumption in the state of Rio Grande do Norte, were tested through ELISA to detect the presence of anti-*T. gondii* antibodies. Of the seropositive animals, a bioassay was carried out in mice and 19 isolates were obtained: 01 isolate from goats, 05 from swine, and 13 from free-range chickens. *T. gondii* was not isolated from sheep. The isolates were divided into two groups according to the phenotype of virulence for mice. Seventeen isolates (89.5%) were characterized as virulent and two (10.5%) were identified as non-virulent. No isolates with phenotype of intermediary virulence were identified. The genetic variability of the isolates was analyzed by Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 11 *loci* (SAG1, 5'3'SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, *PK1* and Apico). The strains RH (Type I), ME49 (Type II) and VEG (Type III) were used as reference strains. Six different genotypes were identified, with three new genotypes. No type I, II, or III archetype genotype was identified in the isolates studied. No association between virulence and isolate genotyping of the isolates was observed. This study confirms the genotypic variability of *T. gondii* in Brazil.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, sheep, ELISA, seroprevalence, isolates, molecular characterization, production animals, PCR-RFLP.

LISTA DE TABELA

TABELA 1	Composição do rebanho ovino de duas Mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte, associado com as variáveis sexo, faixa etária e tipo racial, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.....	51
TABELA 2	Características das 25 unidades produtoras de Ovinos do Estado do Rio Grande do Norte.....	53
TABELA 3	Concordância observada e índice Kappa em 10% das amostras utilizando como reação de referência o primeiro teste de ELISA em 95 soros de ovinos provenientes do Estado do Rio Grande do Norte.....	56
TABELA 4	Fatores individuais e mesorregiões de procedência associados com soroprevalência de infecção de <i>T. gondii</i> em ovinos no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.....	56
TABELA 5	Frequência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em soros de ovinos naturalmente infectados, oriundos de diferentes municípios do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.....	57
TABELA 6	Determinação dos fatores de risco através da análise univariada para avaliação dos aspectos soroepidemiológicos da toxoplasmose ovina no estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.....	60
TABELA 7	Fatores de risco associados a infecção causada por <i>Toxoplasma gondii</i> em ovinos de duas mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.....	63
TABELA 8	Bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de ovinos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.....	64
TABELA 9	Bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de caprinos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.....	65
TABELA 10	Bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de suínos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.....	66
TABELA 11	Bioensaios realizados e isolados de <i>T. gondii</i> obtidos de galinhas caipira no município de João Câmara, Estado do Rio Grande do Norte.....	67

TABELA 12	Mortalidade de camundongos inoculados com amostras de tecidos de suínos, galinhas caipira e caprinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, para isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> por bioensaio.....	70
TABELA 13	Genótipos dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> de animais de produção obtidos do Estado do Rio Grande do Norte.....	71
TABELA 14	Associação entre os genótipos dos isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> com o município de origem, a virulência e similaridade com outros isolados já descritos.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> com as várias fontes de infecção humana e animal.....	4
FIGURA 2	Mapa do Rio Grande do Norte com suas Mesorregiões.....	39
FIGURA 3	Distribuição dos ovinos por grupo etário de acordo com a avidéz apresentada pelos anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	58
FIGURA 4	Distribuição dos ovinos por sexo de acordo com a avidéz apresentada pelos anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Soroprevalência da infecção em ovinos por <i>T. gondii</i> de 1987 a 2009.	13
QUADRO 2	Soroprevalência da Infecção em ovinos por <i>Toxoplasma gondii</i> em diferentes estados do Brasil de 1980 a 2011.....	14
QUADRO 3	Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, com os respectivos iniciadores para amplificação e endonucleases de restrição de polimorfismo.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOSC	- Associação dos Criadores de Ovinos e Caprinos do Sertão do Cabugi
ANCOC	- Associação Norte-Rio-Grandense de Criadores de Ovinos e Caprinos
AIDS	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
CETEA	- Comitê de ética em experimentação animal
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
dATP	- 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	- 2'-deoxicitosina 5'-trifosfato
dGTP	- 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
d.p.i	- dia(s) pós infecção
dTTP	- 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> : teste imunoenzimático
HIV	- vírus da imunodeficiência humana
HCl	- Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	- Água Oxigenada
H ₂ SO ₄	- Ácido Sulfúrico
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
IC	- Intervalo de Confiança
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
i.p.	- intraperitonal
M	- Molar
MAT	- Teste de aglutinação modificado
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
mg	- Miligrama(s)
mL	- Mililitro(s)
mm	- Milímetro(s)
mM	- Milimolar
NaCl	- Cloreto de sódio
NaHCO ₃	- Bicarbonato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NH ₄ Cl	- Cloreto de amônio
OR	- <i>Odds</i> Relativa
pb	- Pares de bases
PBS	- Solução de fosfato tamponada
PBS-T	- Solução de fosfato tamponada Tween 20
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pmol	- Picomol(s)
q.s.p	- Quantidade suficiente para
RFLP	- Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
RIFI	- Reação de imunofluorescência indireta
SST	- solução salina contendo Tween 20 a 0,05%
Taq	- <i>Thermophilus aquaticus</i>
µg	- Micrograma(s)
µL	- Microlitro(s)
µm	- Micrômetro(s)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Em 1908, Charles Nicolle e Louis Manceaux, comunicaram a Academia de Ciências Francesa a descoberta de um parasito intracelular no baço e no fígado de um roedor proveniente do norte da África e comumente empregado em pesquisas de laboratório no Instituto Pasteur, o *Ctenodactylus gundi*. Estes pesquisadores acreditaram que o organismo encontrado tratava-se de uma forma particular de *Leishmania*, denominando-o *Leishmania gondii*. No mesmo ano, Afonso Splendore observou o mesmo parasito em um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil. Algumas amostras então foram enviadas a Mesnil (1909), o qual relatou ao pesquisador que o protozoário era similar ao recém descoberto por Nicolle & Manceaux. Em 1909, estes autores retificaram sua posição denominando-o *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux 2009; Splendore 2009).

A primeira descrição de toxoplasmose humana corresponde a Junku em 1923, que relacionou o parasito à ocorrência de cistos oculares e hidrocefalia em uma criança com menos de um ano (Garrido 1978). Pouco depois, no Rio de Janeiro, Torres descreveu a presença deste protozoário em cortes histológicos de músculo cardíaco e esquelético e tecido nervoso de um recém-nascido falecido com quase um mês de vida, iniciando as especulações acerca da possibilidade de doença congênita (Amato Neto et al. 1995). Em 1937, Wolf & Cower descreveram a doença congênita causada pelo *T. gondii* e, na década de 40, Pinkerton & Weinman relataram a toxoplasmose aguda em adultos. Entretanto a frequência da infecção humana só foi conhecida a partir de 1948 com a introdução do clássico teste do corante de Sabin & Feldam, que contribuiu tanto para realização de inquéritos epidemiológicos quanto para o diagnóstico sorológico de toxoplasmose. Desde então, foi estimado que até um terço da população mundial foi exposta ao parasito (Garrido 1978).

1.2. O Agente etiológico

1.2.1. Taxonomia (Current et al. 1990; Levine 1988).

REINO	Protista
SUBREINO	Protozoa
FILO	Apicomplexa
CLASSE	Conoidasida
SUBCLASSE	Coccidiasina
ORDEM	Eucoccidiorida
FAMÍLIA	Sarcocystidae
SUB-FAMÍLIA	Toxoplasmatinae
GÊNERO	<i>Toxoplasma</i>
ESPÉCIE	<i>Toxoplasma gondii</i>

1.2.2. Características biológicas

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório de baixa especificidade, pois infecta provavelmente quaisquer animais homeotérmicos (Dubey et al. 1970; Dubey & Beattie 1988; Hashemi-Fesharki 1996; Esteban-Redondo & Innes 1997; Innes 1997), invadindo vários tecidos, células nucleadas e líquidos orgânicos. É prevalente na maioria das regiões do mundo e tem uma significativa importância médica e veterinária, por causar aborto ou doença congênita em seus hospedeiros intermediários (Tenter et al. 2000).

Há três formas infectivas para o *T. gondii*: os taquizoítos, os bradizoítos, e os esporozoítos (Dubey 2004; Montoya & Liesenfeld 2004). Estas formas, dentre outras, fazem parte de um ciclo de vida bastante complexo (Figura 1).

1.2.2.1. Taquizoítos

O taquizoíto é a forma de multiplicação rápida (Gross et al. 1996; Montoya & Liesenfeld 2004) produzida pelo ciclo assexuado do parasito em células dos hospedeiros intermediários. Apresenta forma de arco com uma extremidade afilada e outra

arredondada, medindo aproximadamente, 4 a 8 μm de comprimento por 2 a 4 μm de diâmetro (Montoya & Liesenfeld 2004). Constitui a forma menos resistente do parasito, sendo facilmente destruída pelas condições ambientais adversas, pela desidratação, variáveis osmóticas e são menos resistentes a tripsina ou pepsina (Jacobs et al. 1996). Representam um papel principal na transmissão vertical da toxoplasmose (Tenter et al. 2000).

1.2.2.2. Bradizoítos

Os bradizoítos são formas assexuadas, com metabolismo lento, medindo cerca de 7 a 9 μm por 1,5 a 2 μm . Estão presentes no interior de cistos teciduais, os quais variam em tamanho de 5 a 70 μm (Gross et al. 1996; Dubey et al. 1998) podendo chegar em alguns casos a 300 μm de diâmetro com centenas a milhares de bradizoítos (Montoya & Liesenfeld 2004). Os cistos contendo bradizoítos possuem membrana dupla sendo resistente às enzimas proteolíticas (Jacobs et al. 1996) e ao esfriamento à 4°C por 30 dias. Esta forma de apresentação do parasito é, segundo alguns autores, a principal responsável pela transmissão desta zoonose através do carnivorismo e ingestão de carne crua ou mal cozida (Dubey 1998; Bonametti et al. 1997; Skjerve et al. 1998; Tenter et al. 2000; El-On & Peiser 2003).

1.2.2.3. Oocistos

O oocisto é a forma infectante proveniente da reprodução sexuada do parasito (gametogonia) no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos. São esféricos com aproximadamente 12 μm de diâmetro (Dubey et al. 1998). Resistem por longos períodos em condições ambientais adversas, podendo sobreviver por meses a anos em solo úmido (Dubey & Beattie 1988) e ser transportado mecanicamente por moscas, baratas, besouros e outros artrópodes ou ser veiculados pela água de consumo. Os oocistos são, portanto, uma forma de resistência e de disseminação ambiental dessa parasitose.

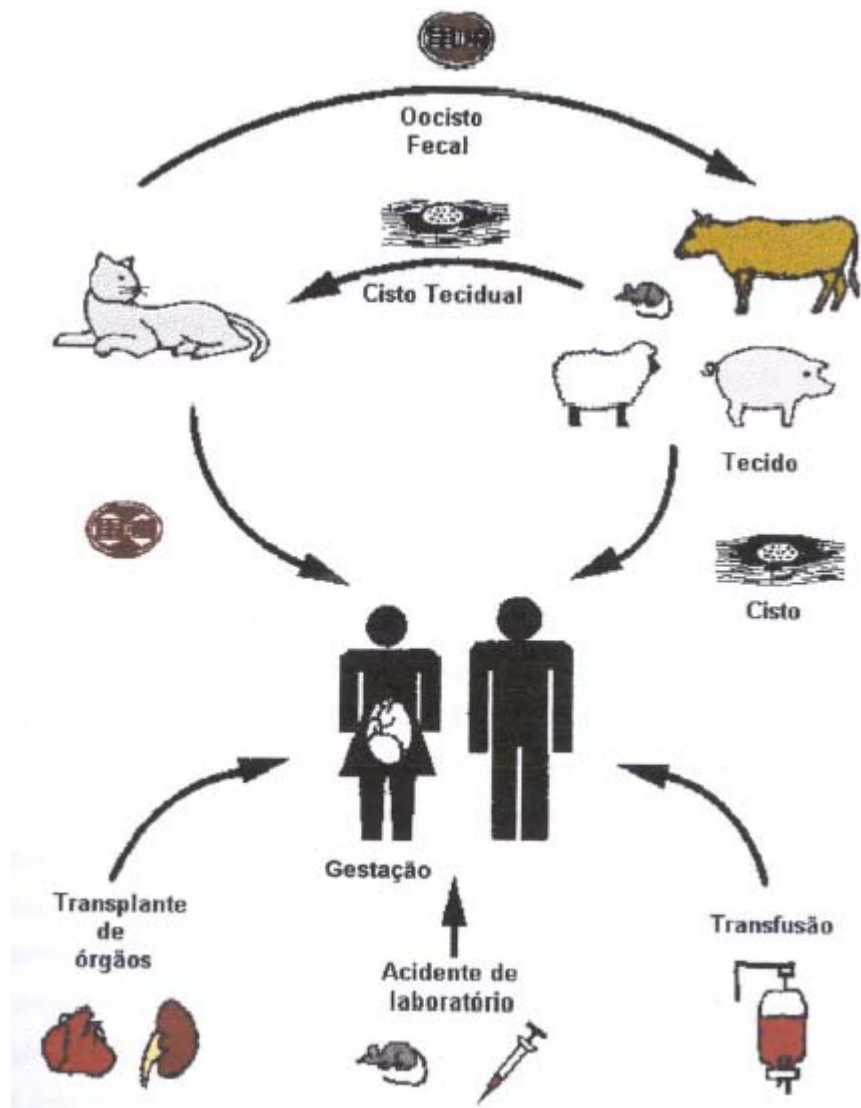


FIGURA 1: Ciclo de vida de *T. gondii* com as várias fontes de infecção humana e animal (Fonte: Meireles 2001).

1.2.3. Biologia de *T. gondii*

O ciclo de vida do protozoário é heteroxeno facultativo, tendo como hospedeiros definitivos representantes da família Felidae, entre eles o gato doméstico. Os animais de produção, bem como os homens, são os hospedeiros intermediários (Dubey & Beattie 1988; Esteban-Redondo & Innes 1997; Duncanson 2001; Dubey 2004).

A fase assexuada do ciclo evolutivo de *T. gondii* pode ocorrer em mamíferos e aves, nos quais os taquizoítos se multiplicam rapidamente por meio de endodigenia ou endopoligenia. Por esses processos o parasito se reproduz internamente gerando duas ou várias células filhas, que rompem da célula mãe e se disseminam através do sangue ou linfa pelo organismo do hospedeiro, caracterizando a fase aguda da doença, quando é observada a sintomatologia. Após esse período de intensa multiplicação, o sistema imune atua sobre esse protozoário. Alguns taquizoítos sobreviventes se refugiam dentro de células, diferenciando-se em bradizoítos (ou cistozoítos). Estes se multiplicam por endodigenia permanecendo em estado de latência dentro de cistos. Eles são localizados predominantemente no sistema nervoso central (SNC), no olho, como também em músculos esqueléticos e cardíacos, sendo encontrados com menor intensidade em órgãos viscerais como pulmões, fígado e rins, geralmente na fase crônica da infecção (Dubey 1994; Dubey et al. 1998).

Os cistos teciduais, considerados como o estágio final do ciclo de vida nos hospedeiros intermediários, são altamente infecciosos e persistem por longo tempo, talvez por toda a vida do hospedeiro. Foi hipotetizado, que os bradizoítos liberados por ocasional ruptura de alguns cistos teciduais, podem multiplicar-se localmente como taquizoíto. Em indivíduos imunossuprimidos pode resultar em reagudização. Estes reinvasam células hospedeiras e novamente transformam-se em bradizoítos formando novo cisto tecidual. O mecanismo da persistência de cistos nos tecidos é desconhecido (Dubey 1998; Dubey et al. 1998; Dubey 2004).

A fase sexuada ocorre apenas no intestino de membros da família Felidae, onde após uma série de esquizogonias acontece a diferenciação de gametas, fecundação e formação de oocistos. Os felídeos eliminam em suas fezes oocistos imaturos (não esporulados) que, encontrando condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, se tornam infectantes. Os oocistos esporulados contém dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Os oocistos podem permanecer infectantes por meses ou anos no ambiente contaminando a água ou vegetais e

infectando novos hospedeiros definitivos ou intermediários. Os felídeos iniciam a excreção de oocistos de *T. gondii* em suas fezes, 3 a 10 dias depois de ingerir bradizoítos, 13 dias depois de ingerir taquizoítos, e acima de 18 dias depois de ingerir oocistos esporulados. Ao contrário de outros coccídios, oocistos de *T. gondii* são menos infectantes e menos patogênicos para gatos adultos (hospedeiro definitivo), quando comparados a camundongos, porcos, ovinos e humanos (hospedeiros intermediários) (Dubey 1998).

1.3. Mecanismos de transmissão

Todos os três estágios (taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos) são infectantes, tanto para os hospedeiros intermediários como para os hospedeiros definitivos, os quais podem adquirir a infecção por *T. gondii* principalmente através de uma das seguintes rotas: (a) via horizontal por ingestão de oocistos presentes no ambiente ou por ingestão de cistos encontrados em carne e vísceras cruas ou mal cozidas ou (b) via vertical por transmissão transplacentária de taquizoítos (Amendoeira & Coutinho 1982; Dubey 1994; Dubey 1996; Allain et al. 1998; Duncanson et al. 2001; Mozzatto & Procianoy 2003; Dubey 2004; Montoya & Liesenfeld 2004; Sawadogo 2005; Sukthana 2006; Dubey et al. 2009a) ou através da ingestão de leite materno contaminado com taquizoítos (Dubey et al. 1998). Com menos frequência, *T. gondii* pode ser transmitido através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Dubey 1994). Embora taquizoítos tenham sido descritos no homem em outros fluídos do corpo, inclusive saliva, perdigotos, urina, lágrimas e sêmen (Dubey & Beattie 1988), não há atualmente evidências de transmissão horizontal de *T. gondii* para humanos por quaisquer destes mecanismos (Tenter et al. 2000).

A prevalência da infecção de *T. gondii* não é limitada à presença de certa espécie de hospedeiro. Seu ciclo pode continuar indefinidamente por transmissão de hospedeiros intermediários para definitivo, de hospedeiro definitivo para intermediário, entre hospedeiros intermediários (até mesmo na ausência de hospedeiros definitivos) e entre hospedeiros definitivos (até mesmo na ausência de hospedeiros intermediários). Vários autores têm atribuído a ingestão de carne infectada crua ou mal cozida como uma fonte importante para ocorrência de toxoplasmose humana dentro do contexto epidemiológico da doença (Bonametti et al. 1997; Kaneto et al. 1997; Dubey 1998; Skjerve et al. 1998; Cook et al. 2000; Tenter et al. 2000; Aspinall et al. 2002; El-On &

Peiser 2003; Dubey et al. 2005b; Santos et al. 2005; Hamzavi et al. 2007; Vesco et al. 2007; Dubey 2009a; Ragozo et al. 2009). Entretanto já foram descritos surtos de toxoplasmose humana devido a ingestão de água contaminada com oocistos (Bahia-Oliveira et al. 2003; Moura et al. 2006).

1.4. Toxoplasmose Humana

Em humanos, a doença é difundida igualmente em todas as classes sociais, afetando um terço da população mundial (Dubey & Beattie 1988; Tenter et al. 2000). A toxoplasmose aguda em adultos saudáveis é normalmente assintomática em 90% dos casos (Tenter et al. 2000); porém, manifestações graves podem ocorrer nos recém-nascidos e/ou indivíduos imunocomprometidos.

A infecção congênita pode acontecer, e a gravidade da doença depende do tempo em que ocorre a infecção materna durante a gravidez, da competência imunológica da mãe durante a parasitemia ou parasitismo, o número e a virulência dos parasitos transmitidos ao feto e da idade que o feto se encontra no momento da infecção, podendo causar aborto, mortalidade neonatal ou anormalidades (Tenter et al. 2000). Quando infectado, o feto geralmente apresenta toxoplasmose grave quando a mãe se infecta durante a primeira metade da gestação (Dubey 2004).

Vários sinais clínicos podem acontecer em crianças infectadas pela via congênita. Quando a doença se manifesta com moderada morbidade ocorre uma ligeira diminuição da acuidade visual, porém crianças gravemente doentes podem ter sintomas variados, como microcefalia, retinocoroidite, epilepsia, retardamento mental e psicomotor (Montoya & Liesenfeld 2004), comumente enquadrados dentro da “Síndrome ou tetrade de Sabin”, assim caracterizada: retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação cerebral. Estes sintomas caracterizam a toxoplasmose congênita em humanos e até o presente momento não são observados em outros animais (Dubey 2004). Os sinais descritos nos nascidos com doença congênita nem sempre são diagnosticados como toxoplasmose e podem ser confundidos com infecção congênita causada por outros patógenos, incluindo citomegalovírus, herpes, rubéola e sífilis (Montoya & Liesenfeld 2004).

Por ser uma infecção oportunista (Esteban-Redondo & Innes 1997; Cantos et al. 2000), manifestações clínicas mais graves podem acontecer nos indivíduos imunocomprometidos sendo a meningoencefalite, um dos principais acometimentos

clínicos causados pela toxoplasmose em pacientes HIV positivos (Dubey 1996; Sell et al. 2005; Sorrentino 2005; Vesco et al. 2007). Passos et al. (2000) fizeram uma análise retrospectiva em pacientes com encefalite por *Toxoplasma* do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, o principal hospital de SIDA / AIDS em São Paulo, durante 1988 e 1991, em diferentes níveis da epidemia de HIV, encontrando uma taxa de mortalidade aguda conjunta nos dois períodos de 25,4%. Aproximadamente 10% dos pacientes com SIDA/AIDS nos EUA e até 30% na Europa morreram de toxoplasmose (Hill & Dubey 2002).

Alguns trabalhos sugerem que os fazendeiros e tratadores de animais apresentam um maior risco de contraírem a infecção com *T. gondii* (Weigel et al. 1999; Clementino et al. 2009). Sanchez et al. (1994) consideram que em zona rural, os hábitos de higiene pessoal e fatores ambientais podem facilitar a transmissão da toxoplasmose.

Do ponto de vista epidemiológico, dentre as vias de transmissão da toxoplasmose ao homem, como já foi citada, aquela que tem sido incriminada com maior frequência é a veiculada pela ingestão de carnes, principalmente aquelas sem tratamento térmico adequado. Entre os animais de produção, *T. gondii* foi achado encistado em tecidos de porcos, ovinos e caprinos com mais frequência que em tecidos de outros animais domésticos (Dubey 1996). Vários trabalhos apresentam evidências de que a toxoplasmose humana estaria co-relacionada com os costumes alimentares de uma determinada população.

Tais fatos podem ser extrapolados para algumas regiões brasileiras, bem como para determinados grupos étnicos de nosso país, em que o manuseio e o consumo de carne ou vísceras de animais de produção, crus ou cozidos inadequadamente são, provavelmente, os responsáveis pela ocorrência da zoonose (Larsson et al. 1980).

1.5. Toxoplasmose em Ovinos

A toxoplasmose em ovinos tem merecido a atenção dos pesquisadores que se dedicam à medicina veterinária e a saúde pública desde a década de cinquenta, com uma série de relatos na Nova Zelândia, onde *T. gondii* foi demonstrado em tecido placentário de ovelhas que abortaram e nos tecidos fetais (Hartley et al. 1954; Hartley & Marshall 1957 apud Innes et al., 2009). A toxoplasmose ovina passou, desde então, a ser objeto de estudo em vários países, sob diversos aspectos: estudos sorológicos (Savio & Nieto 1995; Hashemi-Fesharki 1996; Marca et al. 1996; Gorman et al. 1999; Van der Puije et

al. 2000; Masala et al. 2003; Sawadogo et al. 2005; Bártoová et al. 2009; Soares et al. 2009), isolamento do protozoário (Pereira-Bueno et al. 2004) e infecções experimentais (Marques & Costa 1985; Esteban-Redondo & Innes 1998).

A importância atribuída a esta protozoose em termos veterinários consiste nas verdadeiras epizootias de aborto e natimortalidade em cordeiros (Dubey 1994; Moraes et al. 2011). Se a infecção materna ocorrer em até dois meses de gestação, há morte e expulsão do pequeno feto, algo que só raramente pode ser observado (Urquhart 1998). Nas fases mais adiantadas da gestação, tanto pode haver aborto como sobrevivência do feto, mas neste caso, o cordeiro poderá apresentar patologias de ordem geral e sistêmica (Esteban-Redondo & Innes 1997; Freyre et al. 1997; Buxton 1998; Duncanson et al. 2001; Masala 2003; Dubey 2004; Pereira-Bueno et al. 2004).

O fato da doença ocorrer de forma esporádica e as matrizes geralmente não apresentarem sintomatologia clínica característica até o momento do aborto, permite que a preocupação dos fazendeiros seja maior com as infecções de etiologia bacteriana e/ou viral (Cavalcante 2004). Desta forma, a perda econômica devido à toxoplasmose ainda permanece desconhecida e os abortos em ruminantes são atribuídos de forma generalizada a outras doenças como bruceloses (Hurtado et al. 2001; Sawadogo et al. 2005), clamidioses e salmoneloses (Hurtado et al. 2001).

Freyre et al. (1997), acompanhando rebanhos de ovinos no Uruguai, registraram uma taxa inicial de 28,7% de soropositivos para toxoplasmose entre 1613 ovinos estudados. Esta frequência se elevou para 38,5% após 2,5 anos, indicando incidência de 9,8% no período, com perdas reprodutivas variando de 1,4 a 3,9%, o que representaria um prejuízo anual para o rebanho uruguaio de US\$ 1,4 a 4,7 milhões.

As perdas atuais de cordeiros devido à toxoplasmose são difíceis de serem calculadas uma vez que (i) a doença é normalmente esporádica, (ii) só um pequeno número de cordeiros abortados é encaminhado para diagnóstico, (iii) estes, quando submetidos ao diagnóstico, podem ser examinados inadequadamente, (iv) o material enviado para o diagnóstico pode ser inadequado, (v) o teste sorológico pode não ser específico, e (vi) a toxoplasmose geralmente não produz doença clínica nos ovinos adultos (Dubey 2009a).

Como o aborto é um evento fisiológico de grande importância na pecuária, a toxoplasmose deve ser considerada relevante para que este atinja níveis ótimos de produtividade (Cavalcante 2004).

Esta infecção não só resulta em significantes perdas econômicas (Dubey & Beattie 1988), mas também tem implicações para saúde pública já que a presença do parasito na carne e no leite dos ovinos, quando inadequadamente preparados, constituem-se em uma fonte de infecção para o homem (Tenter et al. 2000; Jittapalpong et al. 2005).

A prevalência de anticorpos para *T. gondii* entre ovinos é geralmente maior que em outros herbívoros domésticos, embora muitas vezes, as outras espécies apresentam as mesmas taxas de infecção. Esta diferença provavelmente está associada aos graus de susceptibilidade das diferentes espécies à infecção. Os ovinos são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* e como tendem a manter títulos de anticorpos por período prolongado, a detecção destes no soro dos animais são indicadores válidos das taxas de infecção (Blewett & Watson 1983).

Embora a infecção por *T. gondii* em ovelha seja extensamente prevalente (Marca et al. 1996), a importância em saúde pública nas ovelhas adultas é desconhecida; nos Estados Unidos, a maior parte da carne de ovelha adulta não é usada para consumo humano. Em estudo conduzido por Dubey (1990), 65% das ovelhas em 33 fazendas tinham anticorpos contra *T. gondii* a uma diluição de 1:64, como determinado através do teste de aglutinação modificado. Em um surto de toxoplasmose em uma fazenda ao Sul de Dakota, (Dubey & Kirkbride 1989) 80 ovelhas pariram 144 cordeiros e 30 dos cordeiros nasceram mortos. O *Toxoplasma gondii* foi encontrado em 11 dos 30 cordeiros natimortos. Os 114 cordeiros sobreviventes cresceram normalmente, mas 68 (59.6%) eram soropositivos para *T. gondii*; 66 dos 68 cordeiros apresentaram anticorpos para *T. gondii* em títulos \geq 1:256. Oito cordeiros sacrificados com 7 meses de idade tiveram cistos de *T. gondii* em seus tecidos comestíveis.

No Brasil, a literatura sobre toxoplasmose em ovinos é limitada, restringindo-se aos inquéritos sorológicos (Larsson et al. 1980; Pita Gondim et al. 1999; Meireles 2001; Silva et al. 2003; Figliuolo et al. 2004; Luciano et al. 2011). Além destes levantamentos sorológicos foi realizado um estudo por Bonametti et al. (1997) visando determinar a transmissão de toxoplasmose através da ingestão de carne de ovinos crua ou mal cozida. Nesse estudo, 17 casos de toxoplasmose aguda sintomática foram atribuídos a ingestão de carne crua de carneiro, servida em uma festa à qual todos os pacientes compareceram. Os sintomas observados foram febre, cefaléia, mialgia e artralgia. Todos apresentavam títulos séricos de anticorpos específicos (IgG e IgM) pela reação de imunofluorescência indireta.

1.6. Diagnóstico de Toxoplasmose Ovina

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado por métodos parasitológicos ou sorológicos. Contudo os métodos parasitológicos apresentam limitações como baixa sensibilidade, demanda de um maior período de tempo para a realização de infecções experimentais em camundongos ou cultura de células, que os tornam bastante laboriosos; além da necessidade de um observador altamente experiente. A pesquisa de parasitos em amostras biológicas através de técnicas moleculares como a PCR ainda apresenta dificuldades relacionadas à baixa sensibilidade e custo elevado. Em contrapartida, a pesquisa de anticorpos séricos é extremamente eficiente se observarmos sua praticidade e rapidez quando comparada aos ensaios biológicos (Venkatesa & Wakelin 1993).

Levantamentos sorológicos da toxoplasmose animal tem sido realizados pela pesquisa de anticorpos, principalmente da classe IgG, utilizando uma variedade de testes entre os quais o de Sabin-Feldman (Larsson et al. 1980), a hemaglutinação indireta-HAI (Gorman et al. 1999), a aglutinação do látex-LAT (Pita Gondim et al. 1999), a reação imunoenzimática (Sawadogo et al. 2005; Clementino et al. 2007; Bártová et al. 2009; Carneiro et al. 2009a), a imunofluorescência indireta-RIFI (Figliuolo et al. 2004; Fusco et al. 2007; Soares et al. 2009) e o método de aglutinação direta-MAD (Silva et al. 2002).

Um marcador sorológico capaz de distinguir entre infecção aguda e crônica, diz respeito à avidéz dos anticorpos IgG específicos (Bahia et al. 1995). Na fase inicial das infecções pelo *T. gondii*, uma alta percentagem de anticorpos IgG apresenta baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Decorrido esse período, que pode ser de semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que em infecções crônicas, são detectados anticorpos de alta avidéz (Camargo et al. 1991). Nos últimos anos, estudos mostram que a avidéz de anticorpos IgG permite estimar de maneira indireta o tempo de infecção, utilizando a técnica de ELISA, a mesma usada para a determinação de anticorpos específicos (Camargo et al. 1991; Bertozzi et al. 1999). Clementino et al. (2007) avaliaram a avidéz de anticorpos IgG como marcador sorológico de infecção recente e crônica de ovinos pelo *T. gondii* através da dissociação do complexo antígeno-anticorpo, com uréia.

Além da sorologia, técnicas moleculares estão sendo utilizadas para a realização do diagnóstico da toxoplasmose ovina e caprina. Masala et al. (2003) analisaram 9639

amostras de soro pela RIFI e 815 amostras biológicas obtidas de fetos abortados (630 fetos e 145 placentas) pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR), procedentes de ovinos e caprinos localizados em Sardenha na Itália. Os autores demonstraram pela RIFI uma prevalência de toxoplasmoses alta em ovinos e caprinos, além de indicar através da PCR que *T. gondii* desempenha um importante papel nos casos de aborto nessas espécies.

1.7. Soroprevalência da toxoplasmose Ovina

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais difundida no mundo. Em ovinos tem sido detectada em vários países, reafirmando o seu carácter cosmopolita e susceptibilidade destes animais, como espécie hospedeira do parasito. A soroprevalência da toxoplasmose ovina revisada por Dubey em 2009 mostra frequências de reações positivas bastante variáveis, oscilando de 3% no Paquistão a 95,7% na Turquia em Kars (Quadro 1). Esse é um dado importante para saúde pública, visto que foram achados cistos no tecido de muitas partes comestíveis de ovinos em diferentes países (Dubey & Kirkbride 1989; Ludén & Ugglá 1992).

A prevalência da toxoplasmose entre os ovinos é avaliada principalmente, por inquéritos soropidemiológicos e as taxas de infecção variam principalmente de acordo com o teste sorológico utilizado, a região e a idade dos animais estudados (Dubey 1990).

No Brasil, os inquéritos sorológicos realizados em diferentes estados no período de 1980 a 2011, mostram uma frequência variando entre 18,6% em São Paulo a 61% em Minas Gerais (Quadro 2).

Quadro 1. Soroprevalência da infecção em ovinos por *T. gondii* de 1987 a 2009.

Localização	Referência	Teste	No. exam	% Pos.	Ponto corte	de	Nota
Austria	Edelhofer and Aspöck (1996)	IFA	4079	66.4	40		a
Canada	Waltner-Toews et al. (1991)	ELISA	3872	57.6	NS		a,c,d
Chile	Gorman et al. (1999)	IFA	408	28	16		a,g
Ethiopia	Bekele and Kasali (1989)	IHA	899	22.9	64		b
France	Dumètre et al. (2006)	MAT	93	65.6	20		b,h
Mexico	García-Vázquez et al. (1990)	IFA	495	30	16		a
Pakistan	Zaki (1995)	LAT	40	3	64		
South Africa	Abu Samra et al. (2007)	IFA	600	5.6	64		a,b,c,g
Spain	Moreno et al. (1991)	IFA	550	34.9	40		a,g
Sweden	Lundén et al. (1992)	ELISA	704	19	NS		a,d
Turkey							
Samsun	Babür et al. (1997)	DT	62	88.7	16		
Ka Yseri	Inci et al. (1999)	DT	154	33.8	16		a
Afyon	Çiçek et al. (2004)	DT	172	54.6	16		a
Kars	Mor and Arslan (2007)	ELISA	460	95.7	NS		a
Uruguay	Savio and Nieto (1995)	IFA	526	32.5	8		a,d,g
USA							
New York	Dubey and Welcome (1988)	MAT	592	73.8	50		a,d,e
North central	Dubey and Kirkbride (1989a)	MAT	1564	65.5	64		a,d
Northeastern	Malik et al. (1990)	ELISA	654	58.6	NS		b,g
Maryland, Virginia	Dubey et al. (2008)	MAT	383	27.1	25		b,h
Zimbabwe	Pandey and van Knapen (1992)	ELISA	216	6	NS		b,e,g

DT = Dye test. ELISA = Ensaio Imunoenzimático. IFA = Imunofluorescência Indireta. IHA = Hemaglutinação Indireta. LAT = Teste de aglutinação do Latex. MAT = Teste de aglutinação modificado. PCR = Reação em cadeia da Polimerase. NS = Não declarado.

* a = fazenda, b = abatedouro, c = autores analisam fatores de riscos, d = aborto, e = idade, g = comparação de testes sorológicos, h = isolamento de *T. gondii*. **Fonte:** Dubey 2009 (modificada).

Quadro 2. Soroprevalência da Infecção em ovinos por *Toxoplasma gondii* em diferentes estados do Brasil de 1980 a 2011.

Fonte	Ano	Estado	Nº de amostras examinadas	Método ^a	Reagente(%)
Larsson et al.	1980	Rio Grande do Sul	100	RSF	39
Pita gondim et al.	1999	Bahia	240	TAL	18,75
Meireles	2001	São Paulo	200	ELISA	31
Silva et al.	2002	São Paulo	100	RIFI e MAD	23 e 27
Silva et al.	2003	Pernambuco	173	RIFI	35,3
Figliuolo et al.	2004	São Paulo	597	RIFI	34,7
Clementino et al.	2007	Rio Grande do Norte	102	ELISA	29,41
Ragozo et al.	2008	São Paulo	120	MAT	24,2
Carneiro et al.	2009a	Minas Gerais	711	ELISA e RIFI	31 e 43
Pinheiro Jr et al.	2009	Alagoas	432	RIFI	32,9
Soares et al.	2009	Rio Grande do Norte	409	RIFI	20,7
Soccol et al.	2009	Paraná	167	ELISA	25,75
Ueno et al.	2009	Distrito Federal	1028	RIFI	38,22
Lopes et al.	2010	São Paulo	488	RIFI	52
Langoni et al.	2011	São Paulo	382	RIFI e MAT	18,6
Luciano et al.	2011	Rio de Janeiro	360	RIFI	38,05
Rossi et al.	2011	Minas Gerais	155	RIFI, ELISA, WB	61

^a; RSF, reação de Sabin-Feldman; TAL, teste de aglutinação do látex; ELISA, ensaio imunoenzimático; RIFI, reação de imunofluorescência indireta; MAD, teste de aglutinação direta; MAT, teste de aglutinação modificado, WB = Western blot.

Larsson et al. (1980) estudaram a soroprevalência de toxoplasmose ovina em soros de 100 animais, provenientes de Uruguaiana, RS e abatidos em Bragança Paulista, SP. Através da Reação de Sabin-Feldman (RSF), obtiveram 39 soros reagentes. Foi observado maior percentual de soropositivos entre as ovelhas adultas.

Na Bahia, Pita Gondim et al. (1999) avaliaram pelo teste de aglutinação do látex (TAL), amostras de soro de 240 ovinos provenientes de duas regiões com características climáticas distintas: região A “recôncavo” situada perto da Costa Atlântica e região B “caatinga”, no interior do Estado. Os valores percentuais observados nesse estudo foram 26,92% para a região A e 12,5% para a região B. A diferença de soropositividade entre as duas regiões indica que os ovinos criados na região A eram mais expostos a um ambiente contaminado com oocistos de *T. gondii*, quando comparadas às criadas na região B.

Em São Manuel, São Paulo, Meireles (2001) obteve uma frequência de 31% de reagentes a *T. gondii* em 200 amostras de ovinos testadas através do ELISA. A autora cita que a alta prevalência de ovinos deve-se ao manejo extensivo onde estariam mais expostos à pastagem e a água contaminada.

No mesmo estado, 100 amostras de soro foram analisadas utilizando as técnicas de RIFI e MAD. A frequência de anticorpos anti- *T. gondii* no rebanho foi de 23% e

27% respectivamente. Este resultado, como os de outros autores, aponta para pequenas diferenças entre RIFI e MAD. Com isto os autores sugerem a utilização do MAD para triagem e titulação de anticorpos anti-*T. gondii* em soros de animais, com resultados semelhantes aos obtidos na reação de imunofluorescência indireta, prescindindo de reagente espécie-específico e equipamentos sofisticados. Eles também relatam que o ELISA é aceito por muitos autores como opção mais prática, devido à facilidade de automação e ser muito sensível, porém, necessita ainda de melhores estudos quanto aos procedimentos e padronização dos antígenos utilizados (Silva et al. 2002).

Em Pernambuco, foram examinadas 173 amostras de soro de ovinos localizados em duas regiões através da RIFI, onde os pesquisadores verificaram um percentual de positividade de 35,3%. Foram encontradas associações significativas para sexo e raça, mas não para a região, tipo de manejo ou falha reprodutiva (Silva et al. 2003).

Em São Paulo, Figliuolo et al. (2004) testaram 597 ovinos para determinar a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* usando a RIFI, onde a frequência de reagentes foi de 34,7%. Foram encontradas associações entre soropositividade e idade indicando transmissão horizontal através de ingestão de oocistos esporulados no ambiente, porém não foi encontrada associação para a outra variável analisada, soropositividade e presença de felídeos.

Amostras de soro de 102 ovinos destinados para consumo no município de Lajes, Estado do Rio Grande do Norte, foram testados através de ELISA para detectar anticorpos IgG específicos anti- *T. gondii*. Do total testado, 30 (29,41%) ovinos foram positivos, sendo observado um acréscimo da prevalência de acordo com o aumento da idade. Nosso grupo avaliou ainda a avidéz de IgG através do ELISA nas 30 amostras positivas e observou que 6 (20%) tinham anticorpos de baixa avidéz e 24 (80%) apresentaram anticorpos de alta avidéz (Clementino et al. 2007).

Ragozo et al. (2008) avaliaram os soros de 495 ovinos de 36 municípios do estado de São Paulo, Brasil, utilizando o teste de aglutinação modificado (MAT título \geq 1:25), 120 ovinos (24,2%) foram positivos. A soroprevalência foi maior nas fêmeas, nos adultos e nos animais criados no sistema semi-intensivo. Não foi verificada associação entre raça e prevalência de anticorpos anti-*T. gondii*.

Em Minas Gerais, Carneiro et al. (2009a) avaliaram soros de 711 ovinos provenientes das regiões Centro, Oeste e Sul do Estado. Foi encontrada uma prevalência de 31% através do ELISA e 43% utilizando a RIFI. O único fator de risco

encontrado para infecção por *T. gondii* foi a idade. Foi observado que 19% dos ovinos positivos possuíam anticorpos IgG de baixa avidéz para *T. gondii*.

Com o objetivo de avaliar a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* e identificar fatores de risco associados à infecção nas três meso-regiões do Estado de Alagoas, Brasil, Pinheiro Jr et al. (2009) examinaram 432 amostras. A taxa de prevalência foi de 32,9%. Na análise estatística multivariada, houve associação significativa para as seguintes variáveis: idade, o tamanho da propriedade, sistema de criação semi-intensivo, fonte de água e presença de gatos.

Soares et al. (2009) realizaram um estudo para avaliar a prevalência da toxoplasmose na cidade de Mossoró-RN, onde 409 amostras de ovinos adultos (364 fêmeas e 45 machos) foram testadas pela RIFI. Das 35 propriedades examinadas, 23 (65,7%) tiveram pelo menos um animal soropositivo para *T. gondii*. A prevalência de animais soropositivos para *T. gondii* foi 20,7%. Não houve associação entre a prevalência de anticorpos em relação ao gênero, problemas reprodutivos e presença de gatos.

Para avaliar a ocorrência de infecção por *T. gondii* em ovinos das regiões periurbana e urbana do município de Curitiba (Paraná), Soccol et al. (2009) coletaram amostras de sangue de 167 ovinos, de três rebanhos. O teste de ELISA foi utilizado para determinar anticorpos anti-*T. gondii*. Do total de ovinos, 43 (25,75%) apresentaram anticorpos anti- *T. gondii*. O estudo mostrou que o parasito estava presente nos ovinos da região metropolitana e periurbana de Curitiba, podendo atuar como possíveis fontes de infecção de *T. gondii* para os seres humanos.

No Distrito Federal, 1028 amostras de soros de ovinos de 32 rebanhos foram examinadas por RIFI para a detecção de anticorpos contra *T. gondii*. A prevalência observada foi de 38,22%, sendo significativamente maior entre machos que nas fêmeas e cada fazenda tinha pelo menos um animal positivo. Estes dados mostram que a infecção estava presente e de distribuição generalizada, na população de ovinos da região (Ueno et al. 2009).

Foram determinados a soroprevalência e os fatores de risco para a toxoplasmose em ovinos de diferentes propriedades da microrregião de Jaboticabal (SP). Anticorpos anti- *T. gondii* foram achados em soros de 52% dos 488 ovinos testados pela RIFI. A toxoplasmose em ovinos soropositivos foi significativamente associada com o sexo, o sistema extensivo, a presença de gatos, a alimentação nas pastagens e a falta de suplementação mineral (Lopes et al. 2010).

Langoni et al. (2011) objetivaram investigar a presença de *T. gondii* em amostras de soro de rebanhos ovinos da região leste do estado de São Paulo. Para isso coletaram amostras de sangue de 382 ovinos de oito propriedades rurais para serem analisadas através dos testes MAT e RIFI. Foram reagentes 71 (18,6%) ovinos. Os autores afirmaram que ovinos desempenham um importante papel econômico tanto regional quanto nacional.

Luciano et al. (2011) estudaram a soroprevalência da infecção por *T. gondii*, por meio da RIFI em ovinos de três municípios do estado do Rio de Janeiro. A prevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi de 38,05% (137/360), sendo observada uma associação ($p < 0,05$) entre positividade e as seguintes variáveis: sexo (fêmeas), idade adulta, sistema de criação extensivo, dieta de pastagem e água de beber de açude.

Considerando a escassa informação sobre a ocorrência de infecções por *T. gondii* em ovinos de Uberlândia, Minas Gerais, Rossi et al (2011), desenvolveram estudo com o objetivo de investigar a frequência de anticorpos contra esse parasito em soros de 155 ovinos da região através da RIFI e ELISA para detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii*. A soropositividade foi de 80% pela RIFI e 75% através do ELISA. O resultado discordante pelos dois testes foi analisado por Western blot, e mostraram 61% de soropositividade. Encontrou-se uma associação significativa ($P < 0,001$) entre a soropositividade para *T. gondii* e idade superior a um ano.

Deste modo, os diversos estudos acima citados concluem, de modo geral, que programas de controle e medidas profiláticas específicas devem ser tomados visando melhorar o sistema de criação conjuntamente com a implantação de programas de educação em saúde com o intuito de bloquear os possíveis mecanismos de transmissão da doença.

1.8. Isolamento e virulência de cepas de *T. gondii*

Para isolamento de *T. gondii*, duas metodologias principais tem sido utilizadas: a inoculação do material suspeito em cultura celular e o bioensaio. Este último é o método mais usado, consistindo da inoculação de material suspeito em camundongos (*Mus musculus*). Quando o material biológico é suspeito de conter cistos teciduais de *T. gondii*, recomenda-se a digestão prévia do tecido seguido de bioensaio em camundongos. A digestão dos tecidos de um hospedeiro em pepsina ou tripsina permite a dissolução da parede dos cistos, liberando os bradizoítos e aumentando a eficácia do

isolamento (Dubey 1998a; Dubey 2010). O inóculo de tecido digerido pode ser pelas vias sub-cutânea (SC), intraperitoneal (IP) ou oral (*per gavage*). Cada um destes métodos tem suas vantagens. A rota IP é a mais útil para isolar *T. gondii* a partir de amostras estéreis; a via SC é melhor para isolar em amostras com possível contaminação bacteriana, já a oral é ideal para isolar de fezes de gatos (Dubey 2010).

Além da obtenção dos isolados, os camundongos também têm sido utilizados como modelo experimental para avaliação da virulência. Um dos critérios para esta avaliação é a porcentagem de mortalidade de camundongos isogênicos (preferencialmente BALB/c) infectados com inóculos graduais de parasitos e o tempo de sobrevivência daqueles que resistiram à infecção. Com base nesses critérios, os isolados de *T. gondii* têm sido definidos como virulentos, avirulentos ou de virulência intermediária. Os isolados são considerados como virulentos quando a injeção intraperitoneal de 1 a 10 taquizoítos de *T. gondii* causa sintomas agudos e mortalidade para camundongos. Já os isolados avirulentos são aqueles em que o inóculo intraperitoneal com doses elevadas de 10^3 a 10^4 taquizoítos não matam os camundongos, desenvolvendo desse modo, a toxoplasmose crônica (Johnson 1997).

Dubey et al. (2002) propõem, em nova metodologia, a avaliação da virulência dos isolados de *T. gondii* durante o próprio isolamento primário em camundongos. A mortalidade e o tempo decorrido até a morte dos camundongos devem ser observados por um período de 30 dias. Os isolados virulentos apresentam 100% de mortalidade entre os camundongos infectados; os isolados não virulentos apresentam 100% de sobrevivência entre os camundongos infectados, enquanto os de virulência intermediária apresentam taxas de sobrevivência intermediárias.

A maioria dos isolados de *T. gondii* de fontes humanas e animais na América do Norte e Europa foram agrupados em uma de três linhagens clonais: tipo I, II ou III. Mesmo que as diferenças entre esses três genótipos ao nível de sequência do genoma seja inferior a 1% eles têm fenótipos de virulência muito diferente em camundongos. Os isolados do tipo I são associados ao fenótipo virulento em camundongos, causando alta parasitemia, aumento do risco de transmissão placentária e gravidade de infecção fetal. Já os isolados do tipo II e III são considerados avirulentos levando a infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos (Howe & Sibley 1995).

Recentemente, Pena et al. (2008), no estudo de genótipos atípicos de *T. gondii*, associaram a PCR-RFLP do marcador CS3 com a virulência em camundongos através da análise da taxa de mortalidade de camundongos infectados. Estes pesquisadores

definem a virulência durante o isolamento primário, sendo considerados isolados virulentos aqueles que causam 100% de mortalidade em camundongos infectados durante as quatro semanas de observação; virulência intermediária quando a mortalidade dos camundongos infectados é superior a 30% mas inferior a 100%, e não virulentos se a mortalidade dos camundongos infectados for inferior ou igual a 30%. Através deste critério, identificaram o genótipo BrI como virulento, genótipos BrII e BrIV de virulência intermediária e o genótipo BrIII como avirulento.

O fato de alguns isolados de *T. gondii* serem altamente virulentos enquanto outros são menos virulentos para camundongos não foi surpreendente, dada a grande variedade geográfica e diversidade de hospedeiros que o parasito pode infectar, algumas variações dentro da espécie são esperadas, como subpopulações adaptadas a diferentes nichos (Boothroyd & Grigg 2002).

A virulência de isolados de *T. gondii* para camundongos depende de vários fatores, incluindo o estágio do parasito utilizado para a infecção, rota de infecção, a dose do inóculo, a via de inoculação, a linhagem do camundongo, imunidade do hospedeiro entre outros fatores (Dubey et al. 2003).

Apesar das diferentes propostas para avaliação da virulência de isolados de *T. gondii* em modelo murino, a correlação entre a virulência para camundongos em comparação com a virulência para outras espécies ainda não está clara, principalmente a correlação com as manifestações clínicas da doença (Boothroyd & Grigg 2002; Frazão-Teixeira et al. 2011).

1.9. Diversidade Biológica e Genética de *T. gondii*

T. gondii é considerado como sendo espécie única. A partir da década de 80 foram realizados vários estudos com o objetivo de caracterizar os diferentes isolados deste parasito usando técnicas biológicas, bioquímicas e moleculares. O estudo da diversidade populacional de um parasito pode colaborar para o entendimento das diferenças na transmissão de doenças e suas manifestações clínicas e ao mesmo tempo gerar conhecimento para a melhoria do diagnóstico, tratamento e controle (Howe & Sibley 1995; Pena 2004).

Várias técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a diversidade genotípica dos isolados de *T. gondii*, como a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por

enzimas de restrição (PCR-RFLP) e marcadores microssatélites (sequências simples repetidas- SSR) (Howe & Sibley 1995; Ferreira et al. 2004; Yai et al. 2009; Zhou et al. 2009; Silva et al. 2011). A PCR-RFLP é a metodologia mais usada para tipagem genética de *T. gondii* na atualidade, por ser uma ferramenta simples e prática (Su et al. 2006).

Diversos estudos moleculares na Europa e América do Norte utilizando PCR-RFLP do gene SAG2 (que codifica o antígeno de superfície p22 localizado no cromossomo VIII do parasito) demonstram que *T. gondii* compreende três linhagens clonais denominadas como tipos I, II e III. As linhagens do tipo I são altamente virulentas, enquanto as dos tipos II e III têm baixa virulência para camundongos. No que se refere à correlação entre genótipo do parasito e o hospedeiro de origem, os isolados dos tipos I e II tem sido mais freqüente em humanos e os do tipo III predominantes em animais (Howe & Sibley 1995).

Cepas de *T. gondii* classificadas como tipo I estão normalmente associadas a casos de toxoplasmose aguda. O genótipo tipo II é predominante em pacientes imunossuprimidos (HIV/AIDS) e em casos de toxoplasmose congênita e ocular em humanos. É importante salientar que na maioria das vezes as amostras de *T. gondii* provenientes de casos humanos se originam da forma sintomática da doença, enquanto que grande parte dos isolados provenientes de animais é responsável por infecções crônicas e assintomáticas (Howe & Sibley 1995).

Os organismos que possuem uma estrutura genética populacional clonal consistem de linhagens clonais que se propagam independentemente, em sua maioria geneticamente divergentes, de origem tipicamente ancestral, onde o sexo possui pouca ou nenhuma influência, para a variação encontrada em populações naturais (Tibayrenc et al. 1991; Ayala 1998; Tibayrenc & Ayala 2002). De acordo com Boothroyd & Grigg (2002), dois detalhes importantes do ciclo de vida de *T. gondii* possibilitam a existência de uma estrutura populacional predominantemente clonal. Primeiro, a transmissão entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos pode ser realizada eficientemente, dispensando por um determinado período o ciclo sexuado. Mesmo sem passar por um felídeo e sofrer recombinação sexual, *T. gondii* pode se reproduzir assexuadamente e se disseminar na natureza, fazendo com que cepas particularmente bem sucedidas obtenham sucesso evolutivo.

O segundo aspecto que pode contribuir para essa estrutura populacional incomum é o fato de *T. gondii* ser haplóide em parte significativa de seu ciclo biológico.

Dessa forma, um felídeo infectado com apenas uma cepa produz oocistos contendo progênies geneticamente idênticas à cepa infectante parental. A recombinação ocorreria se um felídeo se infectasse com duas cepas ao mesmo tempo. Isso poderia acontecer se ele se alimentasse de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerisse duas presas, cada uma abrigando uma cepa diferente. A ingestão de duas presas, entretanto, deveria acontecer dentro de um intervalo de tempo muito curto para permitir o cruzamento efetivo, uma vez que os gametas são abundantes por apenas um período muito breve após a primeira infecção do felídeo (Boothroyd & Grigg, 2002).

Embora os estudos realizados anteriormente descrevam *T. gondii* com a estrutura clonal de baixa variabilidade genética, essas informações foram provenientes de amostras procedentes principalmente da Europa e América do Norte. Recentes estudos, com isolados de outras regiões como a América Central e do Sul, revelam que *T. gondii* apresenta alta porcentagem de genótipos atípicos ou recombinantes, fato que anteriormente não havia sido descrito (Ajzenberg et al. 2004; Ferreira et al. 2006). Já em 2002, Ajzenberg e cols, enfatizaram a necessidade da utilização de vários genes para a tipagem de *T. gondii*, considerando a utilização de um único gene como uma limitação nos estudos de caracterização do parasito.

A genotipagem dos isolados deve ser simples, rápida, reprodutível, podendo ser utilizada em larga escala e ser capaz de detectar a diversidade genotípica de uma determinada espécie (Ajzenberg et al. 2005). Seguindo estes critérios, para a genotipagem de *T. gondii*, muitos estudos utilizam a técnica de PCR-RFLP. Essa ferramenta molecular é um método que detecta variações mínimas em um gene, onde uma única substituição de bases pode criar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido por uma endonuclease de restrição. As endonucleases de restrição são uma classe de enzimas bacterianas que cortam ou digerem DNA apenas quando ocorre uma seqüência específica de quatro ou mais bases. No caso de PCR-RFLP, a PCR é utilizada para amplificar uma região de um gene que contém uma ou múltiplas substituições de bases e o produto da PCR é submetido à digestão por uma ou mais enzimas de restrição (Singh 1997).

Até bem pouco tempo, a maioria dos estudos de genotipagem de *T. gondii* por PCR-RFLP disponha de poucos marcadores e o poder de resolução e discriminativo de identificação dos isolados eram bastante baixos. Não havia um consenso de quais conjuntos de marcadores poderiam ser usados para genotipar isolados de *T. gondii* e desta forma, não era possível comparar resultados de diferentes laboratórios. Contudo,

Su et al. (2006) desenvolveram nove marcadores, cada um deles capaz de distinguir os três alelos arquetípicos de *T. gondii* em uma reação de PCR-RFLP. A genotipagem de 46 isolados de *T. gondii* de diferentes origens utilizando esses marcadores mostraram que eles poderiam facilmente distinguir os arquetípicos de tipos atípicos e revelar a diversidade genética dos parasitos. Além disso, as cepas mistas nas amostras poderiam ser facilmente detectadas por estes marcadores. O uso destes marcadores mostrou-se útil e poderá facilitar a identificação de isolados de *T. gondii* em estudos epidemiológicos e de genética populacional. Recentemente, Su et al. (2010) sugeriram mais dois marcadores adicionais (SAG1 e alt. SAG2).

O aumento do número de marcadores genéticos utilizados para a genotipagem pode revelar polimorfismos únicos ou mistura de alelos clássicos em isolados anteriormente classificados como uma das três cepas clássicas (Dardé 2008). Alguns destes genótipos atípicos podem corresponder a novas linhagens clonais bem-sucedidas (Pena et al. 2008).

No Brasil existem linhagens clonais, porém, diferentes dos três tipos clássicos descritos (Pena et al. 2008 e Dubey & Su 2009). Recentemente, Khan et al. (2011) através da análise de cepas atípicas da América do Norte, revelam uma quarta linhagem clonal (tipo 12, além das tradicionais, tipo I, II e III) circulante nessa região.

Dubey & Su (2009) estudando populações diferentes de *T. gondii* percebem que a estrutura populacional dos parasitos presentes na América do Norte é clonal sendo que no Brasil a variabilidade genética do parasito é mais evidenciada. Os autores citam três observações importantes sobre os isolados de *T. gondii* obtidos no Brasil: (i) há ausência de isolados do tipo II em nosso país - já contestada em duas publicações (Dubey et al., 2010; Silva et al. 2011); (ii) os isolados do tipo I são raros; e por fim, (iii) a maioria dos isolados em nosso meio não são clonais, sugerindo recombinação e transmissão eficiente por oocistos. Os autores discutem ainda que as diferenças estruturais entre as populações de *T. gondii* entre Brasil e EUA se deve principalmente a diferenças nas rotas de transmissão e infecção, que é de interesse para compreender a epidemiologias do parasito.

Acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética dos isolados brasileiros de *T. gondii* (Ferreira et al. 2006). Outros estudos com isolados de toda a América do Sul confirmam as divergências destes com as populações de *T. gondii* da Europa e

América do Norte. Foram encontrados polimorfismos únicos nessas cepas e até mesmo novos alelos (Dardé 2008).

A circulação de múltiplos genótipos na América do Sul permite a ocorrência de infecção mista (mais de uma cepa no mesmo hospedeiro) e a grande diversidade de hospedeiros intermediários com infecções mistas poderá levar a uma maior diversidade genética entre diferentes linhagens do parasito, uma vez que esses hospedeiros desempenham importante função na cadeia trófica servindo de presas para os hospedeiros definitivos (Dubey et al. 2006c; Su et al. 2006). Observa-se que o número de estudos relatando isolados obtidos a partir de infecção mista em uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo gatos, aumentou desde que técnicas de genotipagem mais sensíveis foram aplicadas (Wendte et al. 2011)

A maioria das infecções humanas estudadas na América do Norte e Europa é causada por cepas do tipo II, que também são comuns em animais usados para consumo nestas regiões. Em contraste, vários genótipos diferentes de *T. gondii* estão associados com a infecção grave em seres humanos na América do Sul (Sibley et al. 2009). Em relação ao curso clínico da toxoplasmose, alguns estudos demonstram uma maior gravidade da doença na América do Sul quando comparado a Europa e América do Norte. A doença ocular é cinco vezes mais comum em crianças com toxoplasmose congênita identificadas pela triagem neonatal no Brasil do que em crianças identificadas pela triagem pré-natal ou neonatal na Europa (Gilbert 2009). Acredita-se que o polimorfismo genético detectado entre cepas brasileiras de *T. gondii* poderia ser uma possível explicação para as diferenças observadas na apresentação clínica da doença (Cristina et al. 1995).

Em contrapartida, Ajzenberg et al. (2009) através da associação entre os genótipos de 88 isolados de indivíduos imunocomprometidos e os aspectos clínicos desses pacientes, sugerem que, para os casos de imunossupressão, os fatores do hospedeiros (sistema imunológico e genética) estão mais envolvidos com a resistência ou susceptibilidade à infecção pelo *T. gondii* do que as características genéticas do parasito. Wendte et al. (2011) enfatizam que muitos fatores podem influenciar ou não a ocorrência da doença, incluindo a dose, o estágio evolutivo, genótipo do parasito e vários fatores que influenciam o estado imune do hospedeiro, especialmente a infecção concomitante com outros agentes patogênicos.

Ao longo desses anos, a caracterização genotípica de diferentes isolados de *T. gondii* através de métodos moleculares tem sido feita com amostras do parasito obtidas de humanos, animais de produção e silvestres.

1.9.1. Isolamento e Caracterização genotípica do *Toxoplasma gondii* em ovinos

No Reino Unido, Owen e Trees (1999) detectaram *T. gondii* em 13 placentas de ovelhas que abortaram e duas amostras de coração de cordeiros soropositivos. A caracterização genotípica encontrada por PCR-RFLP em todas as amostras foi do tipo clonal II.

Dumètre et al. (2006), coletaram amostras de sangue e tecidos de ovinos em abatedouros provenientes da França. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 22,0% (36) dos cordeiros e 65,5% (61) das ovelhas. Dentre os soropositivos foram realizados 30 bioensaios sendo obtidos oito isolados de *T. gondii*. Os autores utilizaram cinco marcadores microssatélites (TUB2, TgM-A, W35, B17, B18). Todos os isolados foram avirulentos para camundongos e apresentaram um genótipo clonal do tipo II.

Foi realizada genotipagem de 53 isolados de *T. gondii* obtidos de 68 cordeiros soropositivos destinados para consumo humano nos EUA usando PCR-RFLP a partir da amplificação de segmentos específicos dos genes SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, PK1 e Apico (descritos por Su et al. 2006) revelando 57 isolados com 15 genótipos. Quatro cordeiros tiveram infecções com dois genótipos de *T. gondii*; 26 (45.6%) isolados pertencem a linhagem clonal do tipo II (estes isolados podem ser divididos em dois grupos baseado em alelos no locus Apico); oito (15.7%) isolados pertencem a linhagem do tipo III; 23 foram caracterizadas em 12 genótipos atípicos. Os resultados indicam uma alta diversidade genética de *T. gondii* em cordeiros e desta forma, importantes implicações para saúde pública (Dubey et al. 2008).

Ragozo et al. (2008) realizaram bioensaio em camundongos com amostras de cérebro, coração e diafragma de 82 ovinos soropositivos procedentes do Brasil. *T. gondii* foi isolado a partir de 16 (19,5%) ovinos soropositivos e foram designados TgShBr 1 a TgShBr 16. Nove dos 16 isolados foram virulentos e mataram todos os camundongos inoculados. Desta forma, os ovinos assintomáticos podem abrigar *T. gondii* virulento para camundongos, e possivelmente servir como fonte de infecção para os seres humanos. A tipagem usando os genes SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, PK1 e Apico, revelou a ocorrência dos genótipos BrI e BrIII

(descritos anteriormente por Pena et al., 2008) além de novos genótipos não descritos na literatura (Ragozo et al. 2010).

Halos et al. (2010) realizaram um estudo na França com o objetivo de avaliar a prevalência e genotipagem de *T. gondii* em carnes de ovinos. Para garantir a representatividade do consumo local, metade das amostras era proveniente da França (433 diafragmas e corações de ovinos) e a outra metade foi importada do Reino Unido, Irlanda, Países baixos e Espanha (398 carcaças de ovinos). Foram realizados testes sorológicos dos fluídos dos corações e diafragmas, bioensaio em camundongos e posteriormente, genotipagem por PCR-RFLP e marcadores para microsatélite. A soroprevalência de *Toxoplasma* foi de 17,7% para cordeiros (animais com menos de 12 meses) e 89% para adultos (com mais de 12 meses). Nenhuma diferença significativa foi observada entre carne francesa e importada. O genótipo clonal tipo II foi predominante neste estudo. Este é o genótipo frequentemente identificado em humanos na França e em animais da Europa. Entretanto, uma amostra apresentou o genótipo do tipo III, que é raro na França, mas parece ser freqüente em Portugal e Espanha. O isolado era proveniente de um ovino da área montanhosa de Pyreneus, na borda espanhola. Esses pesquisadores acreditam que este é o primeiro genótipo que não é do tipo II encontrado em ovinos na Europa.

Em estudo recente, Silva et al. (2011) determinaram a taxa de infecção por *T. gondii* em ovinos provenientes de dois abatedouros na região de Botucatu-SP, que recebem animais do sul e sudeste brasileiro, bem como o genótipo dos isolados. Foram detectados anticorpos para *T. gondii* em 66/602 (10,96%) amostras de soro através de MAT e RIFI. No bioensaio em camundongos, foram detectados parasitos em 30% (22/66) dos ovinos sorologicamente positivos. Através da PCR-RFLP, utilizando 11 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, Apico, PK1 e CS3); foram analisados treze isolados e nove genótipos foram identificados. Quatro destes genótipos foram únicos. Dois dos 13 isolados pertenciam à linhagem clonal do tipo II, com o alelo I apenas no locus Apico. Estes achados comprovam pela primeira vez a presença de linhagem clonal do tipo II no Brasil. Além disso, também foi demonstrada uma alta diversidade do parasito em ovinos.

1.9.2. Isolamento e Caracterização genotípica de *T. gondii* em caprinos

Com o objetivo de isolar *T. gondii* a partir de fragmento de tecido cardíaco de caprinos procedentes do Ceará, Cavalcante et al. (2007) obtiveram dois isolados, denominados isolados G1 e G2. O isolado G1 apresentou alta virulência, sendo observadas mortalidades de 100% em camundongos inoculados com 10^1 , 10^2 e 10^3 taquizoitos. Por outro lado, o isolado G2 apresentou baixa virulência e nenhuma das doses testadas causou mortalidade em camundongos. A análise por PCR-RFLP mostrou que os dois isolados são recombinantes do tipo I/III, mas diferem na combinação dos haplótipos para os diferentes genes analisados.

Ragozo et al. (2009) pesquisaram anticorpos anti- *T. gondii* no soro de 143 caprinos de 3 estados brasileiros, utilizando o teste de aglutinação modificado (MAT título $\geq 1:25$). Quarenta e seis (32,2%) apresentaram resultado positivo. Amostras de cérebro, coração, diafragma, masseter dos animais soropositivos foram agrupados, digeridos em pepsina, e realizados os bioensaios em camundongos. *T. gondii* foi isolado de 12 caprinos, e designados TgGtBr 1 a TgGtBr 12. Dez dos 12 isolados provocaram a morte de 100% dos camundongos infectados, indicando que os caprinos podem abrigar *T. gondii* virulento para camundongos e, servir como fonte de infecção para os seres humanos. A genotipagem destes isolados revelou a ocorrência dos genótipos BrI em quatro caprinos além de novos genótipos não descritos na literatura. Foi identificada infecção mista por parasitos isolados de um caprino de São Paulo (Ragozo et al. 2010).

1.9.3. Isolamento e Caracterização genotípica de *T. gondii* em galinhas caipira

No Brasil, a maioria dos estudos sobre isolamento e tipagem de *T. gondii* foram realizados com isolados obtidos de galinhas caipira. Estes animais foram escolhidos em virtude do íntimo contato com o ambiente domiciliar e peridomiciliar no momento que se alimentam, podendo ser considerados sentinelas de contaminação ambiental. Usando apenas o marcador SAG2, Dubey et al. (2002, 2003, 2007) identificaram, em galinhas, isolados pertencentes aos tipos I e III nos estados do São Paulo, Paraná, Pará, Rio Grande do Sul. Estes autores não observaram isolados do tipo II no Brasil. A predominância de isolados do tipo I em aves também foi observado por Brandão et al. (2006) em Minas Gerais. Silva et al. (2003), em Campos de Goitacazes, Rio de Janeiro, observaram que 77,6% dos isolados de galinhas eram do tipo I e 22,4% do tipo III.

Resultados semelhantes usando o locus SAG2 também foram encontrados no Perú, México e Colômbia, não sendo observada a ocorrência do genótipo tipo II (Dubey et al. 2004a; Dubey et al. 2004b; Dubey et al. 2005a). Alguns isolados de *T. gondii* do tipo I obtidos de galinhas do Brasil e caracterizados por PCR-RFLP através do marcador SAG2 não foram virulentos para camundongos, enquanto alguns isolados de linhagem III eram virulentos para esses animais.

Ao contrário do que é visto no Brasil, em isolados obtidos de galinhas de diferentes países, como Argentina, Granada, Congo e Nicarágua, pela PCR-RFLP, pode-se observar a ocorrência dos três genótipos (Dubey et al. 2003a; Dubey et al. 2005; Dubey et al. 2005c; Dubey et al. 2006c). Já em países como Israel, Venezuela e Portugal, a tipagem genética dos isolados comportou-se como para as amostras dos EUA e outros países europeus, não ocorrendo o tipo I (Dubey et al. 2004c; Dubey et al. 2005d; Dubey et al. 2006d).

Dubey et al. (2008a) refizeram a genotipagem de vários isolados utilizando desta vez, 10 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-2, Apico, PK1) em 151 isolados obtidos de galinhas caipiras do Brasil, incluindo as 117 amostras recém isoladas em 11 estados (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Sergipe e Rondônia) e 34 isolados do Pará e Rio Grande do Sul. A análise identificou 58 genótipos. Metade destes genótipos (29/58) eram únicos, e a outra metade foram caracterizados com dois ou mais isolados. Apenas um isolado pertencia a linhagem clonal tipo I e cinco isolados foram identificados como clonais tipo III. Dois isolados foram obtidos de animais com infecções mistas. Não foram encontradas linhagens clonais tipo II.

Recentemente, Dubey et al. (2010) estudaram a prevalência de *T. gondii* em 50 galinhas caipira da ilha de Fernando de Noronha, Brasil, utilizando o MAT, encontrando 42 (84%) amostras positivas. Através da PCR-RFLP utilizando 10 marcadores, verificaram seis genótipos, incluindo o tipo II (com o alelo do tipo I apenas no locus Apico), o tipo III (clonal) e quatro genótipos novos. Os resultados deste estudo indicam que *T. gondii* presente na ilha de Fernando de Noronha é constituído de genótipos originais, bem como genótipos clonais que são dominantes na Europa e América do Norte.

1.9.4. Isolamento e Caracterização genotípica de *T. gondii* em suínos

Aspinall et al. (2002) examinaram 71 produtos alimentícios a base de carne ovina, bovina ou suína, provenientes de mercados do Reino Unido. Foram detectadas 27 amostras positivas através da PCR-RFLP (SAG2), sendo que 21 apresentavam o genótipo tipo I e seis tinham alelos do tipo I e do II. Estes resultados sugerem que uma proporção significativa de carnes disponíveis comercialmente no Reino Unido está contaminada com o *T. gondii*.

Dubey et al. (2005b) observaram a presença de cistos viáveis de *T. gondii* em carne de várias origens (bovina, suína e ave) provenientes de 28 áreas dos EUA e oferecidas para consumo humano. Obtiveram somente sete isolados de amostras de carne suína, os quais foram caracterizados genotipicamente através do RFLP no locus SAG2 e cinco loci microssatélites hipervariáveis, sendo encontradas duas amostras tipo I, duas tipo II e três tipo III. Os pesquisadores alertam para o fato de que, embora a prevalência de *T. gondii* viável na carne tenha sido baixa, os consumidores, especialmente as mulheres grávidas, podem adquirir a infecção por *T. gondii* pela ingestão de carne mal cozida, e, em especial, carne de porco. Ressaltam ainda, que cozinhar a carne a uma temperatura interna de 66° C destrói o *T. gondii*.

Santos et al. (2005) realizaram genotipagem por PCR-RFLP do locus SAG2 de sete isolados de suínos procedentes do Estado de São Paulo observando dois isolados do tipo I e 5 do tipo III. Todos os isolados foram letais para camundongos. Não houve correlação entre mortalidade de camundongos e o genótipo. Silva et al. (2005) ao analisarem 70 amostras de lingüiças suínas de 55 estabelecimentos do município de Botucatu, encontraram 73,7% amostras do tipo I e 26,3% do tipo III.

Em Portugal, foram encontrados 15,6% (52/333) de suínos destinados ao abate soropositivos através do teste de aglutinação modificado (MAT). Foram feitas tentativas para isolar *T. gondii* do cérebro e/ou coração de 37 suínos soropositivos por bioensaios em camundongos. Foram isolados *T. gondii* viáveis a partir de 15 suínos. A caracterização genotípica por SAG2 resultou em 11 isolados do tipo II e quatro do tipo III. Treze dos 15 isolados foram avirulentos para camundongos. Os resultados indicam que estes isolados de *T. gondii* são fenotipicamente e geneticamente semelhantes aos parasitos isolados de suínos dos EUA (Sousa et al. 2006).

Belfort-Neto et al. (2007) coletaram amostras de língua e diafragma de suínos obtidos de abatedouros e analisaram através de PCR- RFLP. Dezesete entre 50 (34%)

amostras do diafragma e 33 entre 50 (66%) amostras da língua foram positivas para *T. gondii* através da PCR. A caracterização genotípica do locus SAG2 de quatro das amostras positivas revelou o genótipo tipo I. Porém, quando foram analisar outros loci, estes isolados tiveram um genótipo tipo III para os marcadores BTUB, SAG3, e GRA6. Um dos isolados (8T) teve um alelo tipo II no SAG3, indicando uma combinação de alelos normalmente visto nas linhagens clonais. Estes resultados mostram uma prevalência alta de infecção e sugerem que genótipos incomuns de *T. gondii* são achados entre suínos do Brasil.

Foram obtidos cinco isolados de *T. gondii* (TgPgBr1-5) a partir de suínos do mercado de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. A caracterização genotípica usando multilocus PCR-RFLP para 10 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, PK1, c22-8, c29-2 e Apico) identificaram quatro genótipos, sendo um deles clonal do tipo III e 4 isolados foram caracterizados em três genótipos. Quatro dos cinco isolados foram altamente virulentos para camundongos. Os dados sugerem que as amostras de *T. gondii* que circulam em suínos destinados ao consumo humano são distintas daquelas previamente isoladas de gatos e galinhas no Brasil (Frazão-Teixeira et al. 2011).

Foram coletadas amostras de sangue de 488 suínos em um abatedouro na Sérvia. A soroprevalência foi de 9,2%. Os bioensaios foram realizados com sangue coagulado de 22 dos 45 suínos soropositivos. Um total de 16 (72,7%) foram positivos, sendo 12 deles positivos pela observação de cistos de *T. gondii*, 7 pela soropositividade em camundongos (incluindo 3 que não foram encontrados cistos) e 12 por PCR real-time (incluindo uma outra amostra negativa). A presença de parasitos viáveis em parte das amostras indica que alguns porcos apresentavam uma parasitemia ativa no momento do abate, apontando para uma fonte potencial de infecção humana na Sérvia. Este é o primeiro trabalho mostrando parasitemia por *T. gondii* em suínos naturalmente infectados (Klun et al. 2011).

1.9.5. Isolamento e Caracterização genotípica de *T. gondii* de outros animais e humanos

Fux et al. (2003) realizaram genotipagem do isolado P-Br de *T. gondii*, obtido de um cão procedente de São Paulo, observando genótipo recombinante do tipo I/III. Em Minas Gerais, num estudo de genotipagem do parasito pelo marcador SAG2 em

isolados obtidos de oito cães cronicamente infectados, encontrou-se os genótipos I (6 cães) e III (2 cães) (Brandão et al. 2006). Ainda em nosso laboratório, Ferreira et al. (2006) realizaram PCR-RFLP para oito *loci* (SAG1, SAG2, SAG3, B1, cB21-4, cS10-A6, GRA6 e L363), visando identificar os genótipos de *T. gondii* isolados no Brasil. A análise permitiu caracterizar todos os isolados como recombinantes naturais I/III.

Amostras de DNA provenientes de 46 isolados de *T. gondii* obtidos de gatos de São Paulo foram caracterizadas geneticamente através da PCR-RFLP utilizando 11 marcadores (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, Apico e CS3). Este último (CS3), usado com o objetivo de verificar a sua associação com a virulência em camundongos. A genotipagem dos 46 isolados revelou uma alta diversidade genética, com 20 genótipos. Combinando os dados de genotipagem no presente estudo com os resultados recentemente divulgados pelo mesmo grupo a partir de isolados obtidos de galinhas, cães e gatos no Brasil (totalizando 125 isolados) foram identificados 48 genótipos. Quatro dos 48 genótipos encontrados em vários isolados, identificados a partir de diferentes hospedeiros e localidades, foram consideradas as linhagens clonais comuns no Brasil. Essas linhagens foram designados como tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. Estes resultados indicam que a população de *T. gondii* no Brasil é altamente diversificada, no qual a troca genética freqüente tem gerado uma série de recombinantes e algumas linhagens clonais bem sucedidas expandiram-se para grandes áreas geográficas. (Pena et al. 2008).

Zhou et al. (2009) relatam a caracterização genética de isolados de *T. gondii* de diferentes hospedeiros da China usando o multilocus PCR-RFLP para 10 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, PK1, c22-8, c29-2 e Apico). Foram obtidos 17 isolados de *T. gondii* (3 isolados de humanos, 1 isolado de ovino, 5 isolados de suínos e 8 isolados de gatos). Estes isolados foram agrupados em 4 genótipos. Três isolados pertencem à linhagem clonal tipo I, um isolado a linhagem tipo II, e os 13 isolados restantes são agrupados em 2 genótipos, sendo um deles descrito pela primeira vez. Estes resultados apontam implicações para futuros estudos de genética populacional de *T. gondii* na China, bem como para a prevenção e controle de *T. gondii* em humanos e animais naquele país.

Amostras de gatos selvagens de St Kitts, Índia Ocidental, foram examinadas para infecção pelo *T. gondii*. Anticorpos anti- *T. gondii* foram encontrados em 71 (73,9%) dos 96 gatos. Foram realizados bioensaios de tecidos de 10 gatos, usando modelo murino, sendo obtidos 7 isolados avirulentos para camundongos. A

genotipagem através de 10 loci por multi-locus PCR-RFLP (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, PK1, c22-8, c29-2 e Apico), identificaram quatro genótipos. Cinco dos 7 isolados apresentaram 2 genótipos distintos, indicando uma alta frequência de infecção mista na população de gatos na ilha de St Kitts (Dubey et al. 2009).

Foram identificados os genótipos de 36 isolados de *T. gondii* de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de seis municípios do estado de São Paulo, Brasil. Dezesesseis genótipos foram identificados utilizando 11 marcadores genéticos, incluindo SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, Apico e CS3. Não foram encontrados isolados clonais clássicos do tipos I e II. Oito dos 36 isolados foram agrupados em três linhagens clonais comuns no Brasil, previamente descritas como tipos BrI, BrII e BrIII. Sete dos 16 genótipos foram relatados pela primeira vez nesse estudo. Três dos 36 isolados eram consequência de infecções mistas. A análise das taxas de mortalidade em camundongos infectados indicou que isolados do tipo BrI são altamente virulentos, Tipo BrII são medianamente virulentos e Tipo BrIII não são virulentos, o que está de acordo com trabalhos anteriores. Os tipos de alelos no locus CS3 estão fortemente ligados à virulência do parasito no camundongo. Estes resultados de genotipagem apoiam descobertas anteriores de que a população de *T. gondii* é altamente diversificada no Brasil (Yai et al. 2009).

Análise semelhante foi realizada na Tunísia, África, com isolados de *T. gondii* obtidos de casos humanos congênitos. A análise de cinco marcadores genéticos (SAG2, SAG3, BTUB, GRA6 e Apico) indicou apenas um isolado clonal clássico tipo I e o domínio de linhagens recombinantes I/II e I/III (Boughattas et al. 2010). O caso descrito por Elbez-Rubinstein et al. (2009) na França mostra uma situação onde uma grávida se reinfectou pelo *T. gondii* ocorrendo o envolvimento de dois isolados distintos. A mãe foi reinfectada, provavelmente pela ingestão de carne eqüina mal cozida ou mal passada importada da América do Sul durante a gravidez. A amostra isolada do recém nascido e responsável pela infecção congênita foi genotipada com marcadores de microsatélite e exibiu um genótipo atípico, que é extremamente incomum na Europa, mas que já foi descrito na América do Sul.

A recente genotipagem de 20 amostras clínicas humanas utilizando os 11 marcadores descritos por Su et al. (2009) permitiu que, nestes pacientes, *T. gondii* fosse agrupado em três genótipos distintos. Dezoito amostras pertencem ao genótipo ToxoDB 65 enquanto as outras duas amostras foram identificadas como genótipos

ToxoDB 6 e 71 (<http://toxodb.org/toxo/>). Pacientes que apresentavam os genótipos 6 e 71 apresentavam sinais graves de toxoplasmose cerebral (Ferreira et al. 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, na qual pequenos ruminantes assumem papel importante na cadeia epidemiológica desta infecção. Em ovinos tem sido assinalada em diversos países, uma prevalência entre 3 e 95,7% (Dubey 2009). No Brasil, os inquéritos sorológicos mostram prevalência entre 18,6 e 61%. A infecção por *T. gondii* em ovinos implica em problemas na saúde pública uma vez que o consumo de carne contaminada pode facilitar a transmissão zoonótica deste protozoário.

Em ovinos, a toxoplasmose resulta ainda, em perdas reprodutivas e econômicas dos rebanhos. A principal repercussão clínica e econômica da toxoplasmose para este pequeno ruminante é o aborto, que pode ocorrer em matrizes de todas as idades, sendo mais freqüente nas fêmeas que adquirem a infecção durante a gestação, podendo ocorrer ainda, em gestações subseqüentes. Embora seja grande o número de perdas nos rebanhos potiguares por abortos e natimortos, as causas não estão bem esclarecidas.

No Nordeste brasileiro, detentor do maior rebanho ovino do País, são bastante escassos os estudos sistematizados acerca da toxoplasmose nestes animais. Nossos dados preliminares da soroepidemiologia da toxoplasmose ovina em três unidades produtoras no Município de Lajes no Estado do Rio Grande do Norte mostraram uma prevalência de 29,41% (Clementino et al. 2007). Deste modo, dando continuidade a essa linha de pesquisa, realizamos um estudo mais abrangente, visando quantificar a prevalência dessa enfermidade em duas diferentes Mesorregiões do Rio Grande do Norte. Além disso, é importante também a possibilidade de correlacionar estes dados com os diferentes níveis tecnológicos dos criatórios para determinar os fatores de risco para a infecção.

Os outros animais constituem possibilidades para a infecção pelo *Toxoplasma gondii* dada a sua característica eurixênica. Estudos realizados com isolados do parasito provenientes da Europa e América do Norte demonstraram que *T. gondii* é constituído de três linhagens clonais clássicas denominadas tipo I, II e III (Howe & Sibley 1995). Recentes estudos, com isolados da América Central e do Sul, revelam que *T. gondii* apresenta alta prevalência de genótipos atípicos.

Até o momento, poucos estudos de caracterização de isolados de *T. gondii* foram realizados no Rio Grande do Norte, incluindo quatro isolados de galinhas caipira (Dubey et al. 2009) e dois isolados de caprinos (Ragozo et al. 2009). Deste modo, numa

abordagem complementar, buscaremos caracterizar um maior número de linhagens do parasito presentes em ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira do Rio Grande do Norte.

A genotipagem de cepas de *T. gondii* em animais bem como o estudo da estrutura populacional desse parasito são altamente relevantes na área de saúde e clínica médica, uma vez que a possibilidade de correlação entre o genótipo do parasito e a manifestação da doença pode fornecer marcadores que definam o seu prognóstico, levando ao tratamento apropriado dos pacientes com infecção por *T. gondii* além de possíveis associações com diversos potenciais biológicos à espécie, como, por exemplo, virulência, susceptibilidade a drogas e possibilidades de vacinas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar a soroprevalência da toxoplasmose ovina no Estado do Rio Grande do Norte, bem como caracterizar os isolados de *T. gondii* obtidos de animais de produção (ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira) naturalmente infectados do Estado.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência da toxoplasmose ovina em duas diferentes mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte.
- Determinar a avidéz de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* em soro de ovinos correlacionando com as variáveis individuais dos animais testados.
- Identificar fatores de riscos relacionados à infecção de ovinos pelo *T. gondii* no Estado do Rio Grande do Norte.
- Isolar *T. gondii* a partir de tecido cardíaco e cérebro de animais de produção (ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira) procedentes do Estado do Rio Grande do Norte e determinar a virulência dos isolados obtidos pela mortalidade de camundongos.
- Caracterizar os isolados de *T. gondii* obtidos sob o ponto de vista molecular, pela análise de Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), utilizando 11 marcadores denominados SAG1, 5'3'SAG2, SAG2 alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Soroprevalência e Fatores de riscos para toxoplasmose em ovinos procedentes do Estado do Rio Grande do Norte

4.1.1. Área de Estudo

O Estado do Rio Grande do Norte, localizado na Região Nordeste do Brasil, está situado entre os paralelos de 4°49'53'' e 6°58'57'' latitude sul, e os meridianos de 35°58'03'' e 38°36'12'' a oeste de Greenwich. Apresenta uma extensão territorial de 53.077,3 Km², o que representa 3,41% de área da Região Nordeste e cerca de 0,62% do território nacional. A distância entre os pontos extremos Norte-Sul é de 233 km e entre os pontos extremos Leste-Oeste, 403 km. Limita-se ao Norte e a Leste com o Oceano Atlântico; ao Sul com o Estado da Paraíba e a Oeste com o Estado do Ceará. A temperatura média anual do estado é de 25,5⁰C, com máxima de 31,3⁰C e mínima de 21,1⁰C. Em cerca de 60% do Estado predomina o clima semi-árido, avançando até o Litoral Norte. Sua pluviometria é bastante irregular, caracterizada por baixa precipitação pluviométrica, em torno de 400 a 600 mm por ano, sendo as chuvas distribuídas nos meses de janeiro a abril. O Estado é dividido em quatro mesorregiões geográficas (Figura 2): Agreste Potiguar, Leste Potiguar, Central Potiguar e Oeste Potiguar (IDEMA 2010).

Na Mesorregião Leste Potiguar, caracterizada por uma região úmida, predominam os seguintes tipos de clima: Clima úmido localizado no Litoral Oriental com pluviosidade média acima de 1.200mm anuais e Clima sub-úmido localizando-se no litoral Oriental, com pluviosidade média de 800 a 1.200 mm anuais. A vegetação dominante é a Mata Atlântica; Esse bioma abriga uma flora e fauna autóctone, com espécies raras, endêmicas e/ou em processo de extinção. Os ventos alísios e úmidos do sudeste predominam no Litoral, umidade relativa do ar de 80% (IDEMA 2010).

Na Mesorregião Central Potiguar, caracterizada por uma região seca, predomina os seguintes climas: Clima semi-árido, de forma quase contínua, em todo o interior do Estado, com pluviosidade média de 400 a 600 mm anuais e o Clima árido localizado na parte central do Estado, com pluviosidade média abaixo de 400 mm anuais; A vegetação dominante é a Caatinga (em tupi), que significa “mato branco” ou esbranquiçado, é o tipo de vegetação que caracteriza o Nordeste semi-árido. Sua fisiologia é bastante

interessante, pois durante o período de seca (julho a dezembro) aparenta estar totalmente morta, mas aos primeiros sinais de chuva torna-se exuberante. É a vegetação mais característica do Estado. Trata-se de uma formação vegetal resistente a grandes períodos de estiagem. Apresenta umidade relativa do ar entre 60-70% (IDEMA 2010).

4.1.2. Procedência dos ovinos

Foi realizado um contato com a Associação dos Criadores de Ovinos e Caprinos do Sertão do Cabugi (ACOSC) e com a Associação Norte-Rio-Grandense de Criadores de Ovinos e Caprinos (ANCOC), as quais forneceram os endereços de proprietários de fazendas. As fazendas foram selecionadas por um processo de amostragem não probabilística, onde foram coletadas amostras de sangue dos ovinos para estimar a soroprevalência e fatores associados a infecção por *T. gondii*.

4.1.3. Amostragem dos ovinos

No estado do Rio Grande do Norte tem um efetivo de 599.925 ovinos (IBGE 2009). Os ovinos testados no estudo de soroprevalência foram provenientes de duas mesoregiões com características climáticas distintas: Leste Potiguar (clima tropical úmido) e Central Potiguar (clima semi-árido). Para selecioná-las foi utilizada amostragem não probabilística, uma vez que, não há uma listagem representativa dos produtores de ovinos do Estado, tornando impossível uma amostragem ao acaso. Como universo amostral, foram selecionadas propriedades listadas pela ACOSC e ANCOC. Estas associações de criadores serviram para identificar, nos municípios que compõem a região em estudo, as principais áreas de produção e para estabelecer contatos locais. A prevalência esperada de toxoplasmose ovina no Rio Grande do Norte foi baseada na prevalência em Lajes (29,41%) segundo Clementino et al. (2007). Para o cálculo da amostra mínima necessária, definiram-se os seguintes parâmetros: (i) prevalência esperada de toxoplasmose ovina de 29,41%; (ii) variação aceitável de erro de 0,05; (iii) efeito de desenho de 2,0 (as amostras não são independentes, animais agrupados por propriedades); (iv) nível de confiança de 95%. Utilizando o software Epi-Info, versão 6,0, o tamanho da amostra foi estimado em, no mínimo, 461 ovinos em cada mesoregião. Foram coletadas 19 a 51 amostras de sangue por propriedade, utilizando,

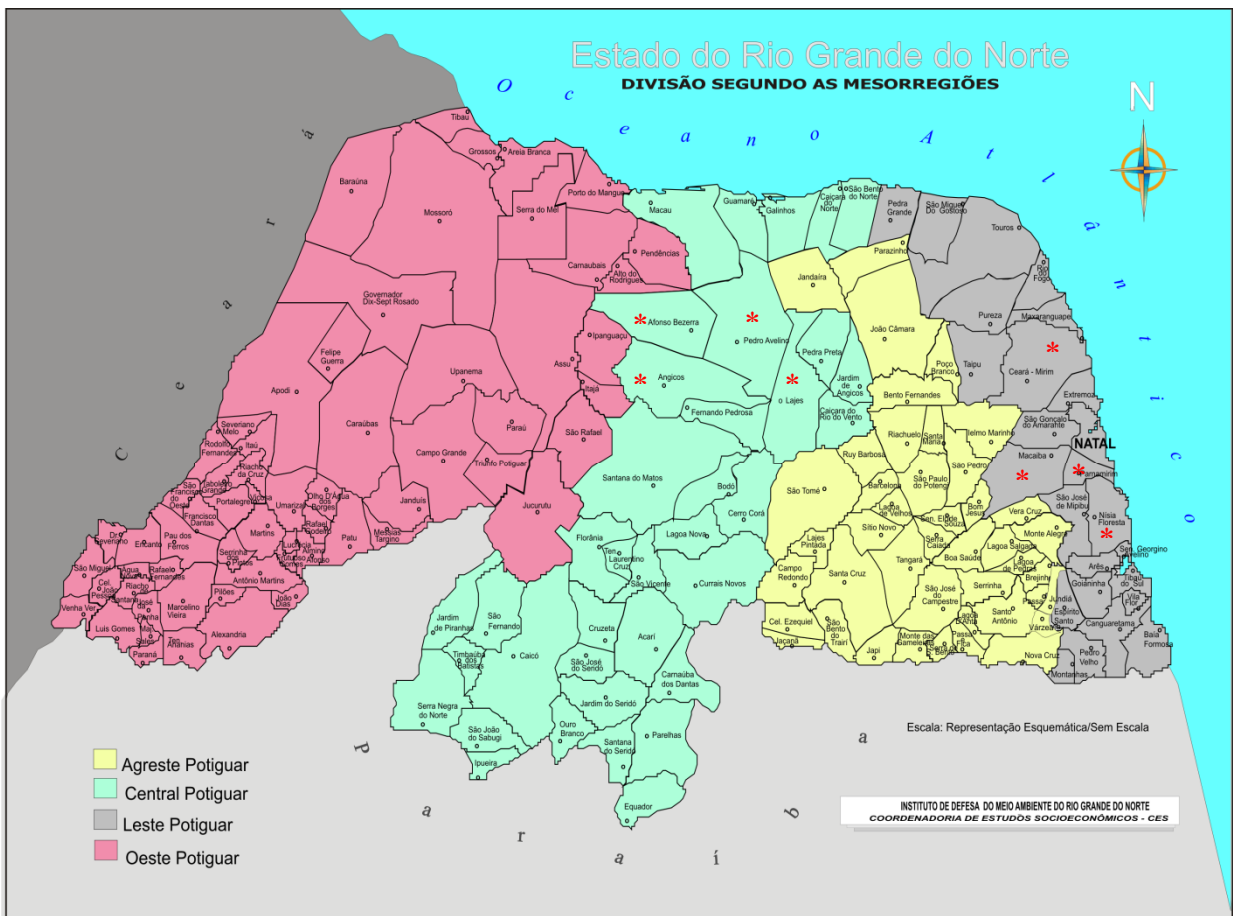
sempre que possível, a proporção de duas matrizes, um jovem e um reprodutor (2:1:1). Estes animais foram selecionados aleatoriamente em cada rebanho.

4.1.4. Questionários

Foram aplicados dois questionários durante a coleta de sangue nas fazendas selecionadas. O primeiro abordou dados da propriedade como: mesorregião, fonte de água, tipo de exploração, objetivo de exploração, instalações de alimentos, existência de acompanhamento técnico, presença de comedouro, tipo de comedouro, presença de bebedouro, tipo de bebedouro, presença de gatos em cada propriedade, ocorrência de aborto ou má formação fetal no rebanho (Anexo 1). O segundo questionário continha informações sobre idade, sexo e raça de cada animal selecionado para coleta de sangue (Anexo 2).

4.1.5. Coleta de Sangue

A coleta de sangue foi realizada entre junho de 2008 e dezembro de 2009 e os animais foram selecionados de 25 fazendas. As amostras de sangue de 930 ovinos foram coletadas através da venipunctura da jugular, usando tubos tipo *vacutainer*[®] sem anticoagulante. Após a coagulação, os tubos foram centrifugados para a obtenção do soro, que foi alíquotado e armazenado a -20⁰C até a realização dos testes laboratoriais.



*Municípios amostrados.

Figura 2. Mapa do Rio Grande do Norte com suas Mesoregiões.

4.1.6. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Os soros foram testados através do teste imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG específicos anti- *T. gondii*. Para avaliar a reprodutibilidade do ELISA, amostras de aproximadamente 10% dos soros estudados foram selecionadas aleatoriamente e processadas em duplicata, utilizando diferentes códigos de identificação.

4.1.6.1. Preparação do Antígeno

O antígeno foi preparado no laboratório de Toxoplasmose do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), a partir de taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) obtidos por lavagem da cavidade peritoneal, usando solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2, em camundongos *swiss* previamente infectados. O material foi centrifugado por 30 segundos a 160g para separação das células do camundongo. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi lavado por centrifugação. Foram realizadas duas lavagens em PBS pH 7,2 por 10 minutos a 2.000g e ao sedimento foi adicionado 10 mL de PBS pH 7,2. Em seguida foi realizada a contagem das formas parasitárias em câmara hemocitométrica e o número de parasitos ajustados para a concentração final de $1,0 \times 10^9$ taquizoítos/mL. Esta suspensão de parasitos foi submetida ao Ultrasonic Homogeneizer- 4710 Coler-Palmer Instrument, em cinco ciclos de 40 hertz (em banho de gelo), durante um minuto e com intervalos de um minuto entre cada ciclo, sendo o rompimento dos parasitos acompanhado em microscópio óptico. Após este processamento, o material foi centrifugado a 15.000g sob refrigeração de 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20°C até o momento do uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951).

4.1.6.2. Teste Imunoenzimático ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*

O ELISA foi realizado segundo Clementino et al. (2007). As placas de poliestireno de 96 orifícios com fundo chato foram sensibilizadas com 100µL de suspensão de antígenos em cada poço na concentração de 1µg de proteína/mL diluído

em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6), seguindo-se incubação *overnight* a 4°C. No momento do uso o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada quatro vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (SST).

Após secagem das placas por inversão sobre papel de filtro absorvente, os soros foram diluídos em PBS-T (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7,2), na diluição de 1:400, e distribuídos 100µL por orifício da placa, seguida da incubação a 37°C por 45 minutos. Os soros foram ensaiados em duplicata. Após este período de incubação, foram realizadas uma série de quatro lavagens com SST.

Foram adicionados a cada poço da placa 100µL de conjugado anti-IgG de ovinos marcado com peroxidase (SIGMA, produto nº A-3415) diluído a 1:7500 em PBS-Tween 20, e posteriormente incubada por 45 minutos a 37°C. Após este período as placas foram lavadas, em uma série de quatro lavagens com SST.

A reação foi revelada por adição de 100µL do substrato (3µg de o-phenilenodiamino (SIGMA) em 15 mL de solução de ácido cítrico e 3µL de H₂O₂) por orifício.

A reação foi interrompida após 20 minutos com 30µL de H₂SO₄ (4 N) por poço e a leitura realizada em leitor de ELISA (BIO RAD Modelo 3550 com filtro de 490nm). Foram utilizados como controles brancos, poços de cada placa em número de quatro, com antígeno, conjugado e substrato, sem soro.

O ponto de corte para o ELISA foi a média de absorbância de seis amostras de soro de ovinos negativos para *T. gondii* mais três desvios padrão testados em cada placa. A média de absorbância dos soros testados em duplicata foi dividida pelo valor do ponto de corte da placa para determinar o índice de reatividade (IR). Soros com valores de $IR \geq 1$ foram considerados positivos. A reprodutibilidade do ELISA para ovinos foi avaliada em ensaio mascarado em 10% da amostra de soros para evitar tendenciosidade.

4.1.6.3. Ensaio de Avidéz de IgG

O ELISA para avaliação da avidéz de anticorpo IgG nas amostras de ovinos identificados previamente como positivos pelo ELISA convencional foi realizada utilizando a uréia como agente dissociante da ligação antígeno/anticorpo (Bahia et al. 1995; Suárez-Aranda et al. 2000). Este teste foi padronizado em caprinos por Bahia et al. (1995) e utilizado posteriormente por diferentes pesquisadores na toxoplasmose animal (Clementino et al. 2007; Carneiro et al. 2009a; Carneiro et al. 2009b).

A técnica foi realizada de acordo com protocolo descrito por Clementino et al. (2007). As placas foram sensibilizadas e lavadas como já descrito. Após secagem das placas, os soros foram diluídos em PBS-T, na diluição de 1:400, e distribuídos nos orifícios da placa, seguida da incubação a 37°C por 45 minutos. Os soros foram testados em séries duplicadas na mesma placa, de tal forma que nas colunas 1 a 6, os soros processados foram os mesmos das colunas de 7 a 12, de tal forma que uma metade da placa era uma réplica idêntica da outra metade.

Após este período de incubação foi realizada uma série de três lavagens. Na primeira lavagem, uma das séries (coluna de 1 a 6) foi lavada com PBS-T (240µL/orifício) e a outra série (colunas 7 a 12) com uréia 6M em PBS-T (240µL/orifício) sob agitação por 5 minutos. As outras duas lavagens foram feitas com PBS-T (240µL/orifício) sob agitação, também em dois ciclos de cinco minutos.

Foi adicionado então a cada orifício da placa 100µL de conjugado na diluição de 1:7500 em PBS-T. A partir da adição do conjugado o procedimento foi idêntico ao descrito para o ELISA convencional.

A avidéz de anticorpos IgG foi calculada como a razão entre a absorbância média para cada soro obtida nos orifícios tratados com uréia (AU) e a absorbância média de orifícios não tratados com úreia (A) expressos em percentagem: $AU/A \times 100$ (Cozon et al. 1998). Segundo Suárez-aranda et al. (2000), valores de avidéz $\geq 50\%$ indicam toxoplasmose crônica, enquanto valores $< 50\%$ sugerem infecção recente.

4.1.7. Análise estatística

As informações coletadas nas entrevistas e os resultados dos exames sorológicos foram digitados utilizando o software Excel versão 2007. Para análise de dados foram utilizados os programas STATA versão SE 10 e Excel 2007, através das seguintes etapas:

- A soroprevalência de *T. gondii* foi estimada com Intervalo de Confiança a 95%.
- Realizou-se a comparação entre a soroprevalência de *T. gondii* com as variáveis individuais (sexo, idade e tipo racial) e a mesoregião de origem, utilizando-se o teste de qui-quadrado.
- A frequência de anticorpos IgG de baixa e alta avidéz foi comparada com variáveis individuais (sexo, idade, tipo racial) e mesoregião utilizando-se o teste de qui-quadrado.

- Análise univariada: comparação de frequências entre ovinos infectados e não infectados por *T. gondii*, utilizando-se o teste do qui-quadrado. O efeito de covariáveis (variáveis individuais, características das fazendas, manejo, presença de gatos, bebedouro, comedouro etc.) em relação à infecção por *T. gondii* foi realizada por meio de regressão logística. A medida de associação utilizada foi a *Odds* Relativa (OR) e Intervalo de Confiança de 95%.
- Análise multivariada: As variáveis que na análise univariada apresentaram nível de significância $p < 0,25$ e algumas variáveis que não apresentaram diferenças significativas, mas que são consideradas relevantes como fatores de risco para infecção por *T. gondii* foram selecionadas para análise logística multivariada.
- Para a construção do modelo final considerou-se o valor $p < 0,05$ e utilizou-se o teste da razão da verossimilhança para definição do modelo que melhor ajustasse os dados.

4.2. Caracterização genotípica de *T. gondii* isolado de animais de produção do Estado do Rio Grande do Norte

4.2.1. Procedência dos animais

As associações ACOSC e ANCOC forneceram endereços de alguns abatedouros do Estado do Rio Grande do Norte, responsáveis pelo abate de animais de produção (ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira). No período de janeiro a setembro de 2010, foram coletadas amostras de sangue e fragmentos cardíacos de 223 ovinos, provenientes dos municípios de Lajes, São Rafael, Campestre e Ceará-Mirim; de 50 caprinos, dos municípios de Lajes, Pedro Avelino e São Rafael; de 18 suínos, dos municípios de Lajes, Monte Alegre e Natal; bem como, sangue e cérebro de 43 galinhas caipira do município de João Câmara.

4.2.2. Local do experimento

O procedimento experimental foi realizado em dois laboratórios. Os testes sorológicos foram feitos no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose, Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os experimentos de isolamento e genotipagem foram realizados no Laboratório de Toxoplasmose, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2.3. Coleta de Sangue

As amostras de sangue de ovinos e caprinos foram coletadas momentos antes do abate através da venipunctura da jugular, usando tubos tipo *vacutainer*[®] sem anticoagulante. As amostras de sangue de suínos e galinhas caipira foram obtidas no momento do abate. Após a coagulação, os tubos foram centrifugados para a obtenção do soro, que foi alíquotado e armazenado a -20⁰C até a realização do ELISA.

4.2.4. Coleta de Órgãos

Foram coletados fragmentos de coração de 223 ovinos, 50 caprinos e 18 suínos e cérebro de 43 galinhas caipira. Depois de abatidos, o coração de caprinos, ovinos e suínos e o cérebro de galinhas, foram colhidos e acondicionados em sacos plásticos devidamente etiquetados e lacrados, armazenados em caixa térmica com refrigeração e enviados por via aérea para o laboratório de Toxoplasmose da UFMG. Os soros dos animais abatidos foram testados pelo ELISA no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte enquanto os tecidos eram transportados de Natal até Belo Horizonte.

4.2.5. Provas Sorológicas

Os soros obtidos de ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira, foram testados através do ELISA para a detecção de anticorpos IgG específicos de *Toxoplasma gondii*.

4.2.5.1. Ovinos

O ELISA foi realizado segundo Clementino et al. (2007) como descrito anteriormente.

4.2.5.2. Caprinos

O ELISA para identificação de caprinos positivos foi realizado de acordo com Cavalcante et al. (2008). Os soros foram testados na diluição de 1:100. O conjugado utilizado foi uma imunoglobulina anti-IgG de caprino marcada com peroxidase (SIGMA, produto n^o A-5420) diluído a 1:5000.

4.2.5.3. Suínos

O ELISA para identificação de suínos positivos foi realizado de acordo com Wingstrand et al (1997) com modificações. Os soros foram testados na diluição de 1:100. O conjugado utilizado foi anti-IgG de suíno marcado com peroxidase (SIGMA, produto n° A- 7042), diluído a 1:6000.

4.2.5.4 Galinhas Caipira

O ELISA para identificação de galinhas caipira positivas foi realizado de acordo com Zhu et al (2008) com modificações. Os soros foram testados na diluição de 1:50. O conjugado utilizado foi uma imunoglobulina anti-IgG de galinha, marcada com peroxidase (SIGMA, produto n° A-9046), diluído a 1:10000.

4.2.6. Isolamento de *T. gondii* em camundongos

Para o isolamento de *T. gondii*, foram utilizados apenas tecidos de animais soropositivos para o parasito.

4.2.6.1. Digestão péptica

Os tecidos (coração e cérebro) foram mantidos refrigerados até o resultado do ELISA. Fragmentos de aproximadamente 30g de cada coração de ovinos, caprinos e suínos soropositivos e todo o cérebro de galinhas caipira soropositivas foram triturados separadamente em triturador elétrico de uso doméstico e submetido à digestão péptica (pepsina 1,3g; NaCl 2,5g; HCl 2,5g; H₂O destilada q.s.p. 500mL) à 37°C por 60 minutos com agitação a cada 15 minutos de acordo com Dubey et al. (2002). Em seguida, o material foi filtrado em gase dupla, centrifugado a 700g por 15 minutos, suspenso em PBS pH 7,2 e novamente centrifugado por duas vezes para remoção da pepsina. Ao sedimento final de aproximadamente 2,5 mL foi adicionado 2,5 mL de PBS contendo aproximadamente 5000 unidades de penicilina e 1 mg de estreptomicina/mL.

4.2.6.2. Bioensaio por inoculação em camundongos

Após uma hora de repouso a 4⁰C, com os antibióticos, o material proveniente de cada órgão foi inoculado em camundongos *Swiss* fêmeas com aproximadamente um mês de idade, provenientes de uma colônia isenta de infecção pelo *T. gondii* do Biotério do ICB/UFMG. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo 128/2010-CETEA apresentado no anexo 3).

Para os tecidos de ovinos, caprinos, suínos e galinhas, cada amostra foi inoculada em cinco camundongos, individualmente identificados e alojados na mesma caixa. Por motivos técnicos, algumas amostras de galinhas foram inoculadas em apenas dois camundongos. Cada camundongo foi inoculado pela via intraperitoneal (i.p.) com 1,0 mL da amostra de tecidos digeridos e observados diariamente até 30 dias.

Os camundongos inoculados foram examinados de acordo com os critérios de infectividade estabelecidos por Vitor et al. (1992):

1. Camundongos que apresentaram ascite nos primeiros dias após inoculação dos tecidos digeridos: pesquisa de taquizoítos na cavidade peritoneal.
2. Camundongos mortos naturalmente até o 30^o. dia após o inóculo: pesquisa de cistos cerebrais e taquizoítos no peritoneo.
3. Camundongos sobreviventes após o 30^o. dia de inóculo: pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* no soro por ELISA e, caso positivo, pesquisa de cistos no cérebro.

O ELISA foi realizado de acordo com Elsaid et al (2001), com modificações: Os soros foram diluídos 1:100, e o conjugado utilizado foi anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (SIGMA, n^o A-9046) diluído a 1:5000. A coleta de sangue foi feita pelo plexo retro-orbital, usando tubo capilar para microhematócrito.

Os cérebros dos camundongos soropositivos por ELISA foram retirados, macerados e em seguida adicionado 1 mL de PBS pH 7,2. Os animais foram eutanaziados através de deslocamento cervical. Para cada cérebro retirado foram examinadas duas preparações entre lâmina e lamínula para a pesquisa de cistos.

4.2.6.3. Manutenção dos novos isolados de *T. gondii*

Foi realizada a sub-inoculação em novos camundongos *swiss*, pela via oral, com emulsão de cérebro positivo (com cistos) ou intraperitoneal (taquizoítos) para manutenção dos novos isolados. A manutenção destes novos isolados foi feita por

passagens a cada 6 meses em novos camundongos *swiss* fêmeas inoculados pela via oral com 5 cistos teciduais encontrados nos cérebros dos animais previamente infectados, após a homogeneização do órgão em PBS pH 7,2.

Quando se tratava de isolados virulentos, os camundongos foram tratados com sulfadiazina (1mg/mL) na água da mamadeira oferecida aos animais, a partir do 3°. dia até o 10°.dia após a infecção (Dubey & Beattie, 1988). Os taquizoítos dos novos isolados também foram mantidos congelados em nitrogênio líquido segundo Dubey & Beattie (1988) utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% como criopreservante.

4.2.6.4. Obtenção de Taquizoítos

Foram obtidos taquizoítos dos novos isolados de *T. gondii* como descrito por Ferreira et al. (2001). Camundongos *Swiss* foram inoculados pela via intraperitoneal com 250 a 500 cistos dos novos isolados. Estes cistos foram previamente digeridos com pepsina 2.6% em solução ácida por 10 minutos em banho-maria. A parede cística é rompida pela pepsina liberando os bradizoítos e otimizando assim a infectividade do inóculo intraperitoneal. A pepsina foi lavada do material por centrifugação com PBS pH 7,2 por três vezes a 2000g e o material contendo bradizoítos foi inoculado i.p. Cinco a oito dias após a infecção o exsudato peritoneal dos camundongos foi coletado, centrifugado a 2.000g por 10 minutos e ressuspendido em 5 mL em PBS pH 7,2. Quando a presença de hemácias era abundante no exsudato peritoneal, era adicionado solução de cloreto de amônia (0,83g de NH₄Cl + 0,1g de NaHCO₃ + 100mL de H₂O destilada) ao material, para lisar as hemácias, seguido de lavagem com PBS pH 7,2. O número de taquizoítos foi contado em câmara hemocitométrica e a massa de parasitos armazenada a -20⁰C até a extração de DNA.

4.2.7. Determinação da virulência de isolados de *T. gondii*

A virulência de cada novo isolado de *T. gondii* foi avaliada pelos critérios adotados por Dubey et al. (2002). Para isso, a mortalidade entre os cinco camundongos *Swiss* inoculados com tecidos de ovinos, caprinos, suínos e galinhas caipira foi avaliada diariamente. A mortalidade e o tempo decorrido até a morte dos camundongos foram observados por um período de 30 dias. Os isolados virulentos apresentaram 100% de mortalidade entre os camundongos infectados, os isolados não virulentos apresentaram

100% de sobrevivência entre os camundongos infectados, enquanto os de virulência intermediária apresentam taxas de sobrevivência intermediárias. Os animais inoculados que morreram durante o período de observação foram avaliados pela pesquisa de taquizoítos na cavidade peritoneal e de cistos cerebrais.

4.2.8. Caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii*

4.2.8.1. Extração do DNA

Para a extração de DNA dos novos isolados de *T. gondii* foram utilizadas as massas de taquizoítos obtidas previamente e processadas utilizando o kit da Promega, Wizard Genomic DNA Purification (Cat. # A1120), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspendido em água e mantido sob refrigeração a 4°C até a sua utilização.

4.2.8.2. Análise Genética por Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR – RFLP)

A caracterização genotípica dos isolados de *T. gondii* foi realizada por análise de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP), com iniciadores direcionados a 11 diferentes loci (SAG1, SAG2-5'+3', SAG2-alternativo, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c22-9, L358, PK1 e Apico), conforme descrito previamente (Su et al., 2009) (Quadro 3).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µL, contendo 2µL de Tampão 5X green (Promega), 25mM de MgCl₂, 2,5mM de cada deoxinucleotídeo (dATP/dTTP/dGTP/dCTP, Invitrogen), 5u/µL de *Taq* DNA polimerase (Promega), 5pmol de cada iniciador e 1µL de DNA molde. Um controle negativo, sem DNA, foi incluído em cada reação.

A amplificação por PCR foi realizada conforme descrito por Su et al. (2009) em termociclador Eppendorf Mastercycler Personal[®]. O primeiro passo da amplificação foi de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos para a desnaturação; 63°C por 30 segundos para o anelamento e 72°C por 1 minutos para a extensão e 72°C por 5 minutos para a extensão final.

Em cada PCR foram incluídos controles positivo e negativo (sem DNA). Os produtos originados pela PCR, 1 µl de cada amostra, foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, juntamente com fragmentos múltiplos de 100 pares de bases (Promega) em cuba vertical com solução de TBE (Tris base + Ácido bórico + EDTA). Após a eletroforese, o gel foi fixado por 10 minutos em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético, à temperatura ambiente e corado pelo nitrato de prata por 10 minutos, lavados em água destilada e adicionado em solução reveladora (NaOH + formaldeído) e observado sob trasiluminação com luz branca para visualização das bandas (Santos et al. 1993).

Os produtos amplificados foram digeridos utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas (New England[®]) segundo Su et al. (2009). As digestões foram realizadas em um volume final de 10µL, contendo 2µL do produto da PCR, 1µL do tampão correspondente e 2,5U (0,3µL) da enzima, a 37°C, por três horas, segundo o protocolo do fabricante. O DNA dos produtos digeridos foi purificado por extração com igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata e fotografado. As cepas RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III) foram utilizadas como controle dos experimentos (Fux et al. 2003).

Os detalhes sobre os 11 marcadores moleculares, iniciadores e enzimas de restrição utilizados estão demonstrados no quadro 3.

4.2.8.3. Análise dos resultados de genotipagem

Para a caracterização genotípica, foram analisados os perfis de bandas encontrados na digestão utilizando-se as endonucleases de restrição. Os dados obtidos foram analisados em um banco de dados virtual, ToxoDB: *an integrated Toxoplasma gondii database resource* (www.toxodb.org) e comparados com os perfis de cepas de referência (Su et al. 2010).

Quadro 3. Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, com os respectivos iniciadores para amplificação e endonucleases de restrição de polimorfismo.

Marcador	Cromossomo	Iniciadores	PCR (pb)	Enzimas de restrição	Referência
SAG 1	VIII	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	390	Sau96I+HaeII (dupla digestão)	(Grigg et al. 2001)
SAG 2 5'	VIII	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI	(Howe et al. 1997)
SAG2 3'	VIII	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI	(Howe et al. 1997)
SAG2-New	VIII	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: ATTCGACCAGCGGGAGCAC	546	HinfI+TaqI (dupla digestão)	(Khan et al. 2005b; Su et al. 2006)
SAG 3	XII	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	311	Nci I	(Grigg et al. 2001)
BTUB	IX	F: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	411	BsiEI+TaqI (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
GRA6	X	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	344	MseI	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
C22-8	Ib	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	521	BsmAI+MboII (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
C29-2	III	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATAACAT	446	HpyCH4IV+RsaI (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
L358	V	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCTCGAAGACAGG	418	HaeIII+NlaIII (dupla digestão),	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
PK1	VI	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	903	AvaI+RsaI (dupla digestão)	(Khan et al. 2005; Su et al. 2006)
Apico	Plastid	F: TGGTTTTAAACCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	640	AflII+DdeI (dupla digestão)	(Su et al. 2006)

Iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) indicam as extremidades 5' e 3', respectivamente. **Fonte:** Su et al. 2010 (modificada).

5. RESULTADOS

5.1. Soroprevalência da toxoplasmose em Ovinos

5.1.1. Características populacionais das amostras estudadas para presença de anticorpos anti- *T. gondii*

A tabela 1 apresenta a composição dos rebanhos ovinos estudados das duas mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte com características climáticas distintas. Dos 930 soros de ovinos selecionados e testados para presença de anticorpos anti-*T. gondii*, 466 (50,1%) eram procedentes de municípios da Mesorregião Central Potiguar e 464 (49,9%) de municípios localizados na Mesorregião Leste Potiguar. Desse total, o número de fêmeas foi superior ao número de machos, 803 (86,34%) e 127 (13,66%) respectivamente. Os animais foram agrupados por faixas etárias, sendo 226 (24,30%) animais jovens (com idade maior que seis e menor que 12 meses) e 704 (75,70%) animais adultos. Quanto ao tipo racial, 730 (78,49%) dos ovinos foram considerados mestiços (resultante do cruzamento das diferentes raças), 76 (8,17%) puros (raças Santa Inês, Dorper, Soinga), e 124 (13,33%) sem raça definida (SRD).

Tabela 1: Composição do rebanho ovino de duas Mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte, associado com as variáveis sexo, faixa etária e tipo racial, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.

VARIÁVEIS	MESORREGIÕES			
	CENTRAL POTIGUAR		LESTE POTIGUAR	
	N	(%)	N	(%)
SEXO				
Macho	60	(12,9)	67	(14,44)
Fêmea	406	(87,1)	397	(85,56)
IDADE				
Jovens	109	(23,39)	117	(25,22)
Adultos	357	(76,61)	347	(74,78)
TIPO RACIAL				
Mestiços	342	(73,39)	388	(83,62)
Puros	02	(0,43)	74	(15,95)
SRD*	122	(26,18)	2	(0,43)
TOTAL	466	(100)	464	(100)

*SRD- Sem raça definida.

5.1.2 Características físicas das Propriedades Produtoras de Ovinos

Os 930 ovinos eram provenientes de 25 propriedades. Deste total, 15 (60,0%) propriedades encontram-se localizadas na Mesorregião Central Potiguar e 10 (40,0%) na Mesorregião Leste Potiguar. A tabela 2 apresenta as características físicas destas propriedades.

Na grande maioria das propriedades produtoras, os ovinos eram mantidos em regime semi-intensivo (88,0%), com o objetivo de produção de carne (90,48%). Nenhum produtor tinha como objetivo a produção de leite. Os ovinos geralmente eram criados em consórcio com outros animais explorados economicamente (80,95%).

Os tipos de fonte de água mais citados nas entrevistas foram poço profundo (52,0%) e açude (28,0%). Em 8% das propriedades, os animais bebiam água diretamente da fonte, nas demais propriedades eram oferecidas vasilhas dentro das instalações, predominando os bebedouros de pneu/plástico (50,0%) e os de cimento (27,27%). Nessas instalações, além da água era oferecida comida (84,0%), sendo os utensílios de madeira (71,43%), os materiais mais frequentemente utilizados.

A maioria das propriedades (92,0%) apresentava terreno plano, com o aprisco térreo (96,0%), sendo o chão batido o tipo mais utilizado (88,0%). O material mais utilizado para a limpeza do aprisco foi a vassoura e/ou rodo (75%).

A presença de gatos, bem como as instalações para estocagem de alimentos foram observadas em 60,0% e 83,33% das propriedades respectivamente. Verificou-se a possibilidade de acesso destes felinos a estas instalações em 55,0% das unidades produtoras. A maioria desses gatos (95,45%) tinha acesso a água oferecida aos ovinos dentro das baias.

A maioria dos animais (65,22%) teve acompanhamento técnico feito pelo médico veterinário ou zootecnista.

A ocorrência de aborto e má formação fetal foram notificadas em 56% e 36% das propriedades nas Mesorregiões Central Potiguar e Leste Potiguar, respectivamente.

Tabela 2. Características das 25 unidades produtoras de Ovinos do Estado do Rio Grande do Norte.

VARIÁVEIS	n**	%
Objetivo de exploração (N*= 21)		
Carne	19	90,48
Misto	02	09,52
Tipo de exploração (N*= 25)		
Intensivo	01	04
Semi-intensivo	22	88
Extensivo	02	08
Consórcio com outros animais (N*= 21)		
Sim	17	80,95
Não	04	19,05
Fonte de água (N*= 25)		
Açude	07	28
Poço profundo	13	52
Cacimbão	01	04
Outros	04	16
Localização do Bebedouro (N*= 25)		
Vasilha dentro das instalações	23	92
Os animais bebem direto da fonte	02	08
Tipo de Bebedouro (N*= 22)		
Cimento	06	27,27
Pneu/Plástico	11	50,00
Outros	05	22,73
Localização do Comedouro (N*= 25)		
Vasilha dentro das instalações	21	84
Os animais comem direto do pasto	04	16
Tipo de Comedouro (N*= 21)		
Cimento	04	19,05
Madeira	15	71,43
Outros	02	09,52
Tipo de terreno (N*= 25)		
Plano	23	92
Acidentado	02	08

N* = número de unidades produtoras

n**= número de unidades produtoras com respostas, excluídas as não respostas.

Tabela 2. Continuação.

VARIÁVEIS	n**	%
Tipo de Aprisco (N*= 25)		
Suspense	01	04
Térreo	24	96
Piso do Aprisco (N*= 25)		
Chão batido	22	88
Cimento	03	12
Material utilizados na limpeza de Aprisco (N*= 24)		
Vassoura e/ou rodo	18	75,00
Vassourão e fogo	02	08,33
Vassoura, água e sabão	04	16,67
Presença de gatos (N*= 25)		
Sim	15	60
Não	10	40
Instalação para estocagem de alimentos (N*= 24)		
Sim	20	83,33
Não	04	16,67
Acesso de gatos a estas instalações (N*= 20)		
Sim	11	55
Não	09	45
Acesso de gatos a água dos animais (N*= 22)		
Sim	21	95,45
Não	01	04,55
Acompanhamento técnico (N*= 23)		
Médico Veterinário ou zootecnista	15	65,22
Não tem	08	34,78
Ocorrência de mal formação fetal (N*= 25)		
Sim	09	36
Não	16	64
Ocorrência de aborto (N*= 25)		
Sim	14	56
Não	11	44

N* = número de unidades produtoras

n**= número de unidades produtoras com respostas, excluídas as não respostas.

5.1.3 Soroprevalência da Toxoplasmose

Dos 930 ovinos examinados, 205 (22,1%; IC95% 19,5-24,8) foram reativos para presença de anticorpos anti- *T. gondii*. O índice de reatividade calculado a partir dos resultados do ELISA para os soros variou de 0,067 a 14,47, sendo considerados animais positivos aqueles que apresentaram valores maiores ou iguais a 1,00.

A reprodutibilidade do ELISA foi avaliada em ensaio mascarado. Aproximadamente 10% das amostras (95 soros) foram testadas, observando-se uma ótima concordância-índice Kappa=0,93 (Tabela 3).

A tabela 4 resume as variáveis individuais analisadas, bem como a prevalência observada nas duas mesorregiões. Em relação ao sexo, 22,1% (28/127) dos machos foram positivos e 22,0% (177/803) das fêmeas foram positivas. Não foi observada diferença estatística significativa entre machos e fêmeas ($p=0,999$).

Dentre os animais jovens, 12,8% (29/226) foram positivos, já os animais adultos apresentaram soropositividade de 25,0% (176/704). Houve diferença estatística entre as proporções de animais positivos jovens e adultos ($p<0,001$).

Quanto a variável raça, foram soropositivos 22,6% (165/730) dos animais puros, 21,1% (16/76) dos ovinos mestiços e 19,4% (24/124) dos animais SRD. Para esta variável a análise pelo Qui-quadrado não apresentou diferença estatística significativa ($p=0,705$).

Já entre as mesorregiões estudadas, o teste de significância do Qui-quadrado, mostrou que a proporção de animais positivos variou significativamente ($p=0,002$), sendo a Mesorregião Leste Potiguar com maior índice de positividade (26,3%).

Na tabela 5 é apresentada a soroprevalência da toxoplasmose em ovinos nas diferentes mesorregiões por município pesquisado.

Tabela 3 - Concordância observada e índice Kappa em 10% das amostras utilizando como reação de referência o primeiro teste de ELISA em 95 soros de ovinos provenientes do Estado do Rio Grande do Norte.

ELISA 2 (Repetição 10% das amostras)		ELISA 1		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO		29	2	31
NEGATIVO		1	63	64
TOTAL		30	65	95

Concordância observada = 0,97

Índice Kappa = 0,93 (IC 95% 0,73 - 1,13).

Tabela 4 - Fatores individuais e mesorregiões de procedência associados com soroprevalência de infecção de *T. gondii* em ovinos no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.

Fator	Categoria	Nº de examinados	Nº de positividade (%)	P
Sexo	Macho	127	28 (22,1)	0,999
	Fêmea	803	177 (22,0)	
Idade	Jovens	226	29 (12,8)	<0,001
	Adultos	704	176 (25,0)	
Raça	Mestiço	730	165 (22,6)	0,705
	Pura	76	16 (21,1)	
	SRD	124	24 (19,4)	
Mesorregião	Central Potiguar	466	83 (17,8)	0,002
	Leste Potiguar	468	122 (26,3)	
Total		930	205 (22,1)	

Tabela 5 - Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de ovinos naturalmente infectados, oriundos de diferentes municípios do Rio Grande do Norte, Brasil, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.

MESORREGIÃO	MUNICÍPIO	AMOSTRAS EXAMINADAS	AMOSTRAS POSITIVAS (%)
CENTRAL POTIGUAR	Lajes (4)*	160	26 (16,25)
	Angicos (3)	100	21 (21,0)
	Pedro Avelino (3)	112	07 (6,25)
	Afonso Bezerra (5)	94	29 (30,85)
TOTAL		466	83 (17,81)
Leste Potiguar	Macaíba (4)	174	48 (27,59)
	Parnamirim(1)**	51	10 (19,61)
	Ceará Mirim(3)	138	27 (19,56)
	Nísia Floresta(2)	101	37 (36,63)
TOTAL		464	122 (26,29)

*número de fazendas amostradas no município.

** única propriedade do município.

5.1.4 Avidéz de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii*

A determinação do índice de avidéz de anticorpos da classe IgG em soros de ovinos naturalmente infectados por *T. gondii* foi realizada nas 205 amostras positivas previamente pelo ELISA. Deste total, 168 (81,95%) apresentaram anticorpos IgG de alta avidéz (sugestivo de infecção crônica) e 37 (18,05%), anticorpos de baixa avidéz (sugestivo de infecção aguda).

A correlação da avidéz de anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii* com as variáveis individuais foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado. Não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para tipo racial e mesorregião. As variáveis que apresentaram correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foram a idade e o sexo. A distribuição dos animais com IgG de alta e baixa avidéz, de acordo com a idade, está apresentada na figura 3. A frequência de animais jovens que apresentaram anticorpos de baixa avidéz (37,9%) foi maior que em adultos (14,8%) ($p = 0,004$). A distribuição dos animais com IgG de alta e baixa avidéz, de acordo com o sexo, está apresentada na figura 4. A frequência de machos que apresentam anticorpos de baixa avidéz (35,7%) foi maior que de fêmeas (15,3%) ($p = 0,009$).

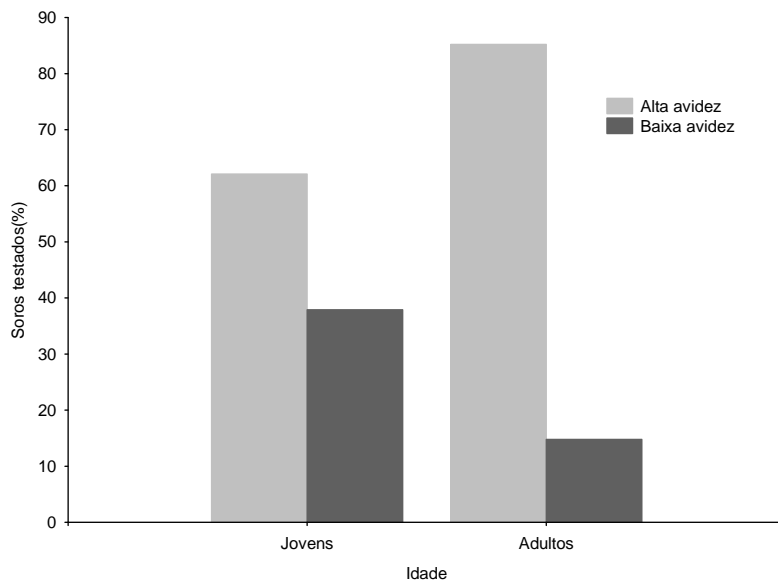


Figura 3- Distribuição dos ovinos por grupo etário de acordo com a avidez apresentada pelos anticorpos IgG anti- *T. gondii* ($\chi^2 = 8,23$ e $p=0,004$).

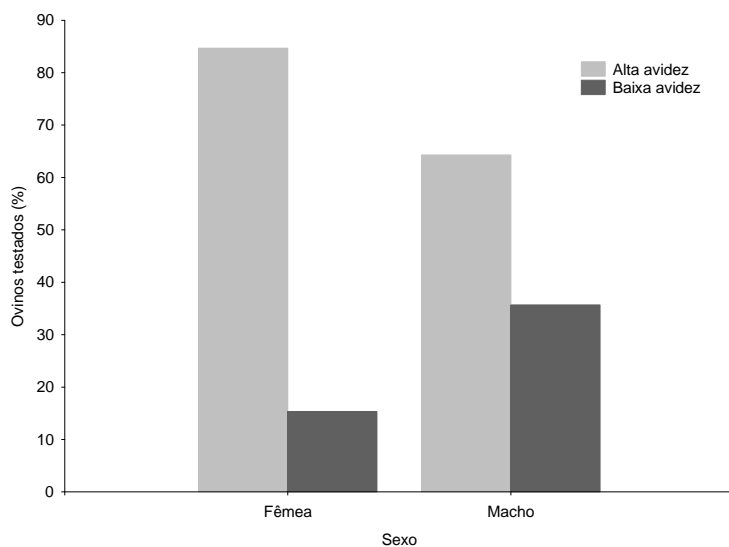


Figura 4- Distribuição dos ovinos por sexo de acordo com a avidez apresentada pelos anticorpos IgG anti- *T. gondii* ($\chi^2 = 6,84$ e $p=0,009$).

5.1.5. Análise de Fatores de Risco

5.1.5.1. Análise Univariada

A tabela 6 apresenta os resultados da comparação entre ovinos infectados e não infectados para as variáveis coletadas (análise univariada) com os valores da Odds Relativa (OR), os intervalos de confiança a 95% e os valores de p.

Foram selecionadas para a análise multivariada as variáveis que apresentaram $p < 0,25$ e outras variáveis que foram consideradas relevantes como fator de risco para infecção por *T. gondii*: idade, mesorregião de origem, fonte de água, piso do aprisco, localização do bebedouro, tipo de bebedouro, tipo de comedouro, material utilizado na limpeza por semana, acompanhamento técnico, ocorrência de má formação fetal, ocorrência de aborto, presença de gatos e instalação para estocagem de alimentos.

5.1.5.2 Análise Multivariada

Na Tabela 7, estão apresentados os fatores de risco para a toxoplasmose ovina, com os valores da Odds relativa encontrados para cada variável analisada, assim como os intervalos de confiança e os valores de p. As variáveis que permaneceram no modelo final foram: presença de gatos, idade dos ovinos e a utilização de fonte água não exposta para estes animais.

A presença de gatos nas unidades produtoras aumenta a chance dos ovinos estarem infectados com *T. gondii* (OR= 1,55; IC=95%; 1,11-2,16). Os animais adultos possuem aproximadamente duas vezes mais chance de se infectarem quando comparados com os ovinos mais jovens (OR= 2,44; IC=95%; 1,58-3,75). Os animais provenientes de propriedades onde a água oferecida não era exposta tiveram um risco maior de ter toxoplasmose que os ovinos de propriedades onde a água consumida era exposta (OR=1,61; IC=95%; 1,25-2,09). Durante a aplicação dos questionários, verificamos que a maioria das unidades produtoras da região que utilizam reservatórios artificiais, citou o poço profundo e o cacimbão como fonte de água, já aquelas que não utilizam desses sistemas e oferecem água diretamente de recursos hídricos naturais, mencionaram os açudes.

Tabela 6 – Determinação dos fatores de risco através da análise univariada para avaliação dos aspectos soropidemiológicos da toxoplasmose ovina no estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.

Variáveis	OR	IC – 95%	P
Objetivo de exploração			
Carne	1	-	-
Misto	1,18	(0,60-2,35)	0,624
Tipo de exploração			
Extensivo	1	-	-
Semi-Intensivo	1,07	(0,48-2,37)	0,864
Intensivo	2,88	(1,07-7,70)	0,035
Consórcio com outros animais			
Não	1	-	-
Sim	1,00	(0,65-1,54)	0,979
Fonte de água			
Água não exposta (poço profundo, cacimbão)	0,43	(0,28-0,65)	0,00
Água exposta (açude)	1	-	-
Tipo de terreno			
Acidentado	1	-	-
Plano	0,96	(0,55-1,69)	0,89
Piso do Aprisco			
Cimento	1	-	-
Chão batido	0,52	(0,35-0,77)	0,001
Localização do Bebedouro			
Vasilha dentro das instalações	9,83	(2,38-40,50)	0,02
Os animais bebem direto da fonte	1	-	-

OR = Odds relativa; IC = Intervalo de confiança

Tabela 6. Determinação dos fatores de risco através da análise univariada para avaliação dos aspectos soropidemiológicos da toxoplasmose ovina no estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009. Continuação.

Variáveis	OR	IC – 95%	P
Tipo de Bebedouro			
Cimento	1	-	-
Pneu/Plástico	1,59	(1,08-2,35)	0,019
Localização do Comedouro			
Vasilha dentro das instalações	1	-	-
Os animais comem direto do pasto	1,09	(0,70-1,71)	0,698
Tipo de Comedouro			
Cimento	1	-	-
Madeira	1,84	(1,15-2,94)	0,011
Material utilizado na limpeza por semana			
Vassourão e fogo	1	-	-
Vassoura, água e sabão	0,57	(0,32-1,00)	0,053
Vassoura e/ou rodo	0,26	(0,16-0,43)	0,000
Acompanhamento Técnico			
Médico Veterinário ou zootecnista	1	-	-
Não tem	0,73	(0,51-1,04)	0,081
Ocorrência de mal formação fetal			
Não	1	-	-
Sim	0,75	(0,54-1,04)	0,081
Ocorrência de aborto			
Não	1	-	-
Sim	1,15	(0,83-1,59)	0,393

OR = Odds relativa; IC = Intervalo de confiança

Tabela 6. Determinação dos fatores de risco através da análise univariada para avaliação dos aspectos soropidemiológicos da toxoplasmose ovina no estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009. Continuação.

Variáveis	OR	IC – 95%	P
Presença de gatos			
Não	1	-	-
Sim	1,42	(1,03-1,97)	0,033
Instalação para estocagem de alimentos			
Sim	1	-	-
Não	0,42	(0,23-0,75)	0,003
Acesso de gatos a estas instalações			
Não	1	-	-
Sim	0,99	(0,70-1,39)	0,953
Acesso de gatos a água dos animais			
Não	1	-	-
Sim	0,98	(0,51-1,87)	0,958

OR = Odds relativa; IC = Intervalo de confiança

Tabela 7. Fatores de risco associados a infecção causada por *Toxoplasma gondii* em ovinos de duas mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2008 a dezembro de 2009.

Variáveis	OR	IC – 95%	P
Fonte de água			
Água exposta	1	-	-
Água não exposta	1,61	(1,25-2,09)	0,000
Presença de gatos			
Não	1	-	-
Sim	1,55	(1,11-2,16)	0,009
Idade dos animais			
Jovens	1	-	-
Adultos	2,44	(1,58-3,75)	0,000

OR = Odds relativa; IC = Intervalo de confiança

5.2. Bioensaio em camundongos e isolamento de *T. gondii*

5.2.1 . Ovinos

Dos 223 ovinos examinados para isolamento de *T. gondii*, 19 (8,5%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Os tecidos destes 19 animais foram selecionados para o isolamento de *T. gondii* por bioensaio em camundongos. Nenhum isolado foi obtido a partir de tecidos de ovinos, o que indica baixo parasitismo tecidual pelo *T. gondii* nestes animais. Todos os camundongos sobreviveram e eram sorologicamente negativos. A tabela 8 apresenta o número de bioensaios em ovinos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.

Tabela 8- Bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de ovinos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.

Município	Nº de bioensaios	Nº de isolados	%
Campestre	1	0	0
Ceará-Mirim	8	0	0
Lajes	2	0	0
São Rafael	8	0	0
Total	19	0	0

5.2.2. Caprinos

Foram testadas amostras de 50 caprinos, sendo 10 (20%) positivos para presença de anticorpos anti-*T. gondii*. Foram realizados bioensaios em camundongos e obtido um isolado no município de São Rafael que foi designado TgGtBrRN1 de acordo com critério definido no "*Toxoplasma* Centennial Congress: From Discovery to Public Health Management" ocorrido em 2008 na cidade de Búzios, RJ. A tabela 9 apresenta o número de bioensaios e de isolados de *T. gondii* obtidos de caprinos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte. O isolado TgGtBrRN1 foi virulento para os camundongos, matando 100% (2/2) dos animais infectados (Tabela 12). Os

outros três camundongos que sobreviveram após o inóculo eram sorologicamente negativos.

Tabela 9- Bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de caprinos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.

Município	Nº de bioensaios	Nº de isolados	%
Lajes	5	0	0
Pedro Avelino	1	0	0
São Rafael	4	1	25
Total	10	1	10

5.2.3. Suínos

Entre os 18 suínos testados, 8 (44,4%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Foi realizado o bioensaio com as oito amostras e obtidos 5 isolados denominados TgPgBrRN1 a TgPgBrRN5. Três dos cinco isolados de *T. gondii* obtidos de suínos foram de três municípios distintos. A tabela 10 apresenta o número de bioensaios e de isolados de *T. gondii* obtidos de suínos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte. Quatro dos 5 isolados foram virulentos, matando todos os camundongos infectados (Tabela 12). O isolado TgPgBrRN5 é avirulento pois infectou todos os 5 camundongos inoculados (anticorpos anti-*T. gondii* e cistos cerebrais presentes em todos camundongos) mas não foi letal para nenhum deles. Para os isolados TgPgBrRN1, TgPgBrRN3 e TgPgBrRN4, os camundongos que sobreviveram ao bioensaio foram sorologicamente negativos, indicando que não foram infectados.

Tabela 10- Bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de suínos por Município de procedência no Estado do Rio Grande do Norte.

Município	Nº de bioensaios	Nº de isolados	%
Lajes	1	1	100
Monte Alegre	1	1	100
Natal	6	3	50
Total	8	5	62,5

5.2.4. Galinhas caipira

Foram obtidas 43 amostras de galinhas caipira em duas coletas realizadas com intervalo de uma semana. Em 18 destas (1ª. coleta), não foi possível fazer a sorologia e desta forma todos os cérebros foram inoculados em camundongos, independente do “status” sorológico das galinhas. Nestes 18 casos, diferente do que aconteceu nos outros bioensaios, foram utilizados apenas dois camundongos para cada amostra, sendo obtidos dez isolados. No restante das amostras, 25 galinhas caipira (2ª. coleta) foram pesquisados previamente anticorpos anti-*T. gondii* e detectados 12 (46,15%) soropositivas. Deste segundo grupo foram obtidos três isolados. A tabela 11 apresenta o número de bioensaios e de isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas caipira do município de João Câmara/ RN. No total foram obtidos 13 isolados, todos de galinhas abatidas no município de João Câmara e designados TgCkBrRN1 a TgCkBrRN13. Dos 13 isolados, doze foram virulentos para camundongos, pois mataram 100% dos camundongos infectados. O isolado TgCkBrRN13 é avirulento pois infectou todos os 5 camundongos inoculados (anticorpos anti-*T. gondii* e cistos cerebrais presentes em todos) mas não foi letal para nenhum deles (Tabela 12).

Tabela 11- Bioensaios realizados e isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas caipira no município de João Câmara, Estado do Rio Grande do Norte.

Município	Nº de bioensaios	Nº de isolados	%
João Câmara (1ª. coleta)	18	10	55,55
João Câmara (2ª. coleta)	12	3	25,00
Total	30	13	43,33

5.3. Determinação da virulência dos isolados de *T. gondii* obtidos de animais de produção

Foram realizados 67 bioensaios em camundongos sendo obtidos 19 (28,35%) isolados de *T. gondii*. Dentre eles, como citado anteriormente, um isolado foi de caprino, cinco de suínos e 13 de galinhas caipira. Neste estudo, não foi obtido isolado de *T. gondii* a partir de fragmentos cardíacos de ovinos soropositivos.

Os camundongos inoculados que sobreviveram e encontravam-se negativos por ELISA, foram considerados não infectados. Nos grupos de camundongos infectados foram observados óbitos por toxoplasmose desde o 9º até o 25º dia pós infecção (d.p.i.), com média de 17 d.p.i. (Tabela 12).

Ocorreu uma predominância de isolados com fenótipo virulento (89,5%). Dos 19 isolados testados, 17 (TgCkBrRN1, TgCkBrRN2, TgCkBrRN3, TgCkBrRN4, TgCkBrRN5, TgCkBrRN6, TgCkBrRN7, TgCkBrRN8, TgCkBrRN9, TgCkBrRN10, TgCkBrRN11, TgCkBrRN12, TgPgBrRN1, TgPgBrRN2, TgPgBrRN3, TgPgBrRN4, TgGtBrRN1) foram caracterizados como virulentos, pois todos os camundongos infectados morreram. Apenas dois isolados (TgCkBrRN13 e TgPgBrRN5), foram caracterizados como avirulentos, já que todos os animais infectados sobreviveram após o período de 30 dias de observação. Nestes camundongos foram encontrados anticorpos anti-*T. gondii* e cistos nos cérebros. Neste estudo, não foram observados isolados com fenótipo de virulência intermediária.

5.4. Análise Genotípica

Todos os 19 isolados obtidos por bioensaio foram genotipados com sucesso em pelo menos 10 dos 11 marcadores estudados. Não foi possível realizar a genotipagem completa em seis amostras (TgCkBrRN5, TgCkBrRN6, TgCkBrRN7, TgCkBrRN8, TgCkBrRN9 e TgCkBrRN11) pela ocorrência de produtos de digestão extremamente polimórficos ou ausência de produtos de digestão para o marcador c29-2.

Os resultados da análise dos 11 marcadores: SAG1, SAG2 (3'SAG2 e 5'SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, SAG2 new e Apico, estão apresentados no Anexo 4 e sumarizados na tabela 13.

Nenhum isolado apresentou genótipo clonal (Tipo I, II ou III) ou linhagem clonal do Brasil (BrI, BrII, BrIII e BrIV). Todos os seis genótipos encontrados (#1-6) são considerados atípicos.

Dos seis genótipos identificados pela PCR-RFLP, um é caracterizado por treze isolados (#1), um é caracterizado por dois isolados (#4) e os demais genótipos apresentaram apenas um isolado (tabela 14).

Três genótipos inéditos foram detectados e denominados (#1, #4 e #6). O genótipo #1, que apresentou mais de um isolado, teve comportamento biológico divergente em camundongos. Os isolados #1 (TgCkBrRN1 a TgCkBrRN12) foram virulentos enquanto o isolado TgCkBrRN13 foi fenotipicamente diferente comportando-se como as cepas avirulentas. Em contrapartida, os isolados do genótipo #4 (TgPgBrRN3 e TgGtBrRN1) apresentaram a mesma virulência, sendo classificados como virulentos. O genótipos #6, representado por apenas um isolado, mostrou ser avirulento.

O isolado TgPgBrRN1 (genótipo #2) foi idêntico a genótipo já descrito. Este isolado é proveniente do município de Natal/RN e igual ao isolado ToxoDB Genótipo TgCkBr177 encontrado por Oliveira et al. (2009) no estado do Ceará, também situado na região Nordeste do Brasil. Este genótipo apresentou fenótipo virulento.

O isolado TgPgBrRN2 (genótipo #3), encontrado neste estudo e proveniente do Município de Monte Alegre/RN, é similar ao isolado ToxoDB Genótipo TgCkBr130 achado no estado de Rondônia por Dubey et al. (2006). O genótipo #3 também é virulento.

O isolado TgPgBrRN4 (genótipo #5), também achado neste estudo é proveniente do município de Natal/RN e mostrou genótipo igual aos isolados ToxoDB Genótipos

TgCkBr185 e TgCkBr184, TgCkBr183, TgCkBr179, TgCkBr180, TgCkBr176, TgCkBr174, TgCkBr167, TgCkBr170, TgCkBr165 (Nordeste brasileiro), caracterizados por Dubey et al. (2008) e TgCatstk7 (St. Kitts - India) encontrado por Dubey et al. 2009. O genótipo #5 também é virulento.

A tabela 14 apresenta os isolados agrupados de acordo com os genótipos identificados, o município de origem, virulência em camundongos e similaridade com outros isolados já descritos.

Tabela 12. Mortalidade de camundongos inoculados com amostras de tecidos de suínos, galinhas caipira e caprinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, para isolamento de *Toxoplasma gondii* por bioensaio.

Doador do órgão para bioensaio				Bioensaio em camundongos		
Animal	Número	Órgão avaliado	Município	N ^o de camundongos mortos/ N ^o de infectados	Dia da morte	Nome do isolado
Suíno	33	coração	Natal	2/2*	14	TgPgBrRN1
Suíno	34	coração	Monte Alegre	5/5*	11, 12	TgPgBrRN2
Suíno	73	coração	Lajes	1/1*	13	TgPgBrRN3
Suíno	95	coração	Natal	2/2*	9	TgPgBrRN4
Suíno	94	coração	Natal	0/5*	***	TgPgBrRN5
Galinha	44	cérebro	João Câmara	2/2**	9	TgCkBrRN1
Galinha	45	cérebro	João Câmara	2/2**	9	TgCkBrRN2
Galinha	57	cérebro	João Câmara	5/5*	9, 10	TgCkBrRN3
Galinha	55	cérebro	João Câmara	2/2**	10, 12	TgCkBrRN4
Galinha	38	cérebro	João Câmara	2/2**	12	TgCkBrRN5
Galinha	42	cérebro	João Câmara	2/2**	12, 16	TgCkBrRN6
Galinha	43	cérebro	João Câmara	1/1**	11	TgCkBrRN7
Galinha	70	cérebro	João Câmara	4/4*	11	TgCkBrRN8
Galinha	39	cérebro	João Câmara	2/2**	12	TgCkBrRN9
Galinha	50	cérebro	João Câmara	2/2**	13	TgCkBrRN10
Galinha	51	cérebro	João Câmara	2/2**	12	TgCkBrRN11
Galinha	69	cérebro	João Câmara	2/2**	11	TgCkBrRN12
Galinha	49	cérebro	João Câmara	0/5*	***	TgCkBrRN13
Caprino	91	coração	São Rafael	2/2*	16, 25	TgGtBrRN1

* Bioensaio realizado com cinco camundongos.

** Bioensaio realizado com apenas 2 camundongos.

*** Todos os camundongos sobreviveram até 30 d.p.i.

Tabela 13- Genótipos dos isolados de *Toxoplasma gondii* de animais de produção obtidos do Estado do Rio Grande do Norte.

Isolados	Marcadores PCR-RFLP										
	SAG1	5'+3' SAG2	SAG2 NEW	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico
RH	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ME49	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II
VEG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
TgCkBrRN1	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgCkBrRN2	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgCkBrRN3	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgCkBrRN4	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgCkBrRN5	I	III	III	III	III	III	II	ND	III	III	III
TgCkBrRN6	I	III	III	III	III	III	II	ND	III	III	III
TgCkBrRN7	I	III	III	III	III	III	II	ND	III	III	III
TgCkBrRN8	I	III	III	III	III	III	II	ND	III	III	III
TgCkBrRN9	I	III	III	III	III	III	II	ND	III	III	III
TgCkBrRN10	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgCkBrRN11	I	III	III	III	III	III	II	ND	III	III	III
TgCkBrRN12	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgCkBrRN13	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III
TgPgBrRN1	I	I	II	III	III	III	III	I	III	III	III
TgPgBrRN2	I	III	III	III	I	III	II	III	III	III	III
TgPgBrRN3	I	III	III	III	I	III	I	I	III	III	I
TgPgBrRN4	I	I	I	I	I	III	II	III	III	I	III
TgPgBrRN5	I	III	III	III	I	III	I	I	III	II	III
TgGtBrRN1	I	III	III	III	I	III	I	I	III	III	I

ND – Não determinado

Tabela 14- Associação entre os genótipos dos isolados de *Toxoplasma gondii* com o município de origem, a virulência e similaridade com outros isolados já descritos

Isolados	Município	Virulência	Genótipo	Semelhante
TgCkBrRN1	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN2	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN3	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN4	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN5	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN6	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN7	João Câmara	Virulento	#1	Único
TgCkBrRN8	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN9	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN10	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN11	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN12	João Câmara	Virulento		
TgCkBrRN13	João Câmara	Avirulento		
TgPgBrRN1	Natal	Virulento	#2	TgCkBr177
TgPgBrRN2	Monte Alegre	Virulento	#3	TgCkBr130
TgPgBrRN3	Lajes	Virulento		
TgGtBrRN1	São Rafael	Virulento	#4	Único
TgPgBrRN4	Natal	Virulento	#5	TgCkBr185, TgCkBr184, TgCkBr183, TgCkBr179, TgCkBr180, TgCkBr176, TgCkBr174, TgCkBr167, TgCkBr170, TgCkBr165, TgCatstk7
TgPgBrRN5	Natal	Avirulento	#6	Único

6. DISCUSSÃO

6.1. Prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em rebanhos ovinos de duas mesorregiões do Rio Grande do Norte

A taxa de prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* observada nos rebanhos ovinos de duas mesorregiões do estado do Rio Grande do Norte foi de 22,1%. Este valor é próximo aos valores observados em dois trabalhos realizados anteriormente no mesmo estado, com prevalência de 29,41% no município de Lajes (Clementino et al. 2007) e 20,7% observados no município de Mossoró (Soares et al. 2009). Esses valores também são similares aos encontrados recentemente na Itália - 28,5% (Fusco et al. 2007), no México - 29,1% (Caballero-Ortega et al. 2008a), na Finlândia - 24,6% (Jokelainen et al. 2010), na China - 29,8% (Liu et al. 2010). Entretanto, foi superior aos 6,7% encontrados na Nigéria (Kamani et al. 2010) e inferiores aos observados em outras regiões da Itália - 49,9% (Vesco et al. 2007), na República Tcheca - 59% (Bártová et al. 2009) e na Índia - 44,1% (Chikweto et al. 2011).

No Brasil foram observados valores de prevalência da toxoplasmose ovina variando de 18,6% em São Paulo a 61% em Minas Gerais (Langoni et al. 2011; Rossi et al. 2011). As diferenças observadas entre as regiões podem estar relacionadas às técnicas utilizadas, ao regime de exploração, presença de hospedeiros definitivos e as variáveis climáticas.

Em relação às duas mesorregiões do Estado do Rio Grande do Norte, que foram incluídas neste estudo, a maior prevalência de animais com toxoplasmose foi observada na mesorregião Leste Potiguar e pode ser explicada, em parte, pelas condições climáticas. Nesta mesorregião o clima é do tipo sub-úmido a úmido e a precipitação pluviométrica média está acima de 1200 mm anuais. Por outro lado, a mesorregião Central Potiguar, onde foi encontrada baixa positividade entre os animais, apresenta dois tipos de clima: semi-árido a semi-árido rigoroso. O primeiro com pluviosidade média de 400 a 600 mm anuais e o último com pluviosidade média abaixo de 400 mm, sendo desta forma regiões sujeitas a períodos de seca contantes (IDEMA 2010). Deste modo, a frequência de ovinos sororeativos encontrados nessas duas mesorregiões sugere que as diferenças climáticas, podem estar influenciando a dispersão da toxoplasmose

nos rebanhos, considerando que a mesorregião Leste Potiguar é mais favorável ao desenvolvimento e manutenção dos oocistos de *T. gondii* no meio ambiente.

Estudos realizados em outras regiões do mundo também associam a presença de anticorpos anti- *T. gondii* a indicadores ambientais (Fayer 1981; Pita Gondim et al. 1999; Van der Puije et al. 2000; Jokelainen et al. 2010; Kamani et al. 2010), mostrando a sua influência em relação a prevalência.

A elevada umidade e a temperatura em torno de 25⁰ C contribuem para a formação de um ambiente favorável a alta viabilidade dos oocistos no solo e estes são as principais formas de transmissão para os herbívoros (Fayer 1981; Pita Gondim et al. 1999; Van der Puije et al. 2000; Silva et al. 2003; Jittapalapong et. 2005).

Van der Puije et al. (2000) em estudo em Gana, usando o método de ELISA, verificaram que a prevalência de toxoplasmose em ovinos varia de 20%, em uma zona seca, para 39% em litoral e zona de floresta. Este dado também foi evidenciado no na Bahia por Pita Gondim et. al. (1999), onde foi encontrada uma prevalência de 12,5% numa região de “caatinga” e 26,92% em área limítrofe com a Costa Atlântica. Este fato sugere que as características climáticas de regiões secas provavelmente diminuem a chance de sobrevivência do parasito o que resulta, geralmente, numa baixa prevalência.

Recentemente, Kamani et al. (2010), trabalhando com a toxoplasmose ovina na Nigéria, verificaram que a prevalência na Zona Sul do estado, onde o clima é mais ameno, com maior prevalência de chuvas e maior umidade relativa do ar, foi significativamente maior que a da Zona Norte com clima árido.

Na Mesorregião Central Potiguar, onde foi observada menor prevalência, um dado inesperado foi encontrado, dos quatro municípios trabalhados, dois apresentaram resultados surpreendentes, a prevalência no município de Pedro Avelino foi de cerca de cinco vezes menor que no município de Afonso Bezerra. A análise dos dados pluviométricos acumulados de 2008 destes municípios, ano em que coletamos as amostras nos meses de setembro e outubro, verificamos que em Pedro Avelino, onde ocorreu pluviosidade média de aproximadamente 605,8 mm, foi observada uma pluviosidade de 601,1, desvio de 4,7mm (0,8%). Em contrapartida, Afonso Bezerra que anualmente apresenta uma pluviometria de 536,6, apresentou naquele ano 844mm, desvio de 307,4 (57,3%). O aumento ocasional de umidade, em alguns períodos do ano, pode ter aumentado a viabilidade dos oocistos eliminados por felídeos presentes nestas localidades, sendo responsável pelo aumento da prevalência.

Sawadogo et al. (2005) realizaram um estudo de prevalência da toxoplasmose ovina em Marrakech (Marrocos), situada em uma zona onde a precipitação pluviométrica anual oscilou em torno de 360mm. Estes pesquisadores sugerem que em regiões secas ocorre diminuição da chance de sobrevivência do parasito e como consequência resulta em baixas prevalências.

No que diz respeito à faixa etária dos ovinos, foi encontrada diferença significativa entre a infecção por *T. gondii* e a idade dos animais, sendo crescente o número de animais positivos com o aumento da idade. Isto se deve provavelmente a maior possibilidade de contato com o agente infeccioso (Larsson et al. 1980; Gorman et al. 1999; Van der Puije et al. 2000; Figliuolo et al. 2004; Clementino et al. 2007; Vesco et al. 2007; Caballero-Ortega et al. 2008a; Ragozo et al. 2008; Pinheiro jr et al. 2009; Halos et al. 2010; Kamani et al. 2010; Anderlini et al. 2011; Luciano et al. 2011; Rossi et al. 2011; Villena et al. 2012).

No presente estudo, os ovinos que foram incluídos no grupo etário < 12 meses, tinham idade superior a seis meses, e desta forma não se encontravam anticorpos maternos adquiridos passivamente pelo colostro. O encontro de 29 (12,83%) animais positivos nesta faixa etária indica infecção recente, no entanto não podemos descartar a possibilidade de casos de infecção congênita. A ocorrência de infecção recente em ovinos com 6-12 meses de vida foi também mostrada pela maior frequência de animais nesta faixa etária apresentando anticorpos IgG de baixa avidéz (sugestivo de toxoplasmose aguda).

Não foi encontrada correlação entre o sexo dos ovinos e o índice de positividade para toxoplasmose. Este dado corrobora aos encontrados por Gorman et al. (1999), Caballero-Ortega et al. (2008a), Carneiro et al. (2009a), Pinheiro jr et al. (2009), Soares et al. (2009). Alguns estudos mostram uma maior prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em animais machos (Silva et al. 2003; Ueno et al. 2009; Lopes et al. 2010). Outros autores atribuem a maior prevalência de toxoplasmose no sexo feminino a diferenças hormonais, fisiológicas e de manejo (Van der Puije et al. 2000; Ragozo et al. 2008).

O parâmetro raça não tem sido avaliado na maioria dos estudos sobre a toxoplasmose ovina. Na análise da proporção de animais apresentando anticorpos anti-*T. gondii* relacionado ao tipo racial, não foi encontrada diferença significativa entre as três categorias raciais analisadas. Nossos resultados corroboram os dados de Van der Puije et al. (2000) e Ragozo et al. (2008). Entretanto, no estado de Pernambuco foi

observada maior prevalência nos animais mestiços 40,48% ($\chi^2= 4,72$; OR= 2,52). Provavelmente, este fato deve-se ao manejo higiênico-sanitário adotado nessas criações de ovinos mestiços (Silva et al. 2003).

6.2. Determinação da avidéz de anticorpos anti- *T. gondii* em ovinos

Na fase inicial das infecções pelo *T. gondii*, uma alta percentagem de anticorpos IgG apresentam baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Decorrido esse período, que pode ser de semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando sua avidéz, de modo que em infecções crônicas, são detectados anticorpos de alta avidéz (Camargo et al. 1991). Nos últimos anos, estudos mostram que a avidéz de anticorpos do tipo IgG permite estimar de maneira indireta o tempo de infecção, utilizando a mesma técnica imunológica usada para a determinação de anticorpos específicos (Camargo et al. 1991; Bertozzi et al. 1999). Sendo o diagnóstico da fase aguda da infecção pelo *T. gondii* em ovinos (Clementino et al. 2007; Caballero-Ortega et al. 2008b; Carneiro et al. 2009a), caprinos (Bahia et al. 1995; Cavalcante 2004; Carneiro et al. 2009b), em humanos (Cozon et al. 1998) e em suínos (Suaréz- Aranda et al. 2000), muitas vezes determinado pela pesquisa de anticorpos IgG de baixa avidéz, usando como agente dissociante a uréia.

Existem poucos trabalhos na literatura sobre metodologias utilizadas para distinguir infecções agudas e infecções crônicas da toxoplasmose ovina. Além dos três trabalhos citados anteriormente utilizando a uréia como agente dissociante, Figliuolo et al. (2004) relataram que 36,2% dos ovinos estudados em São Paulo estão provavelmente na fase aguda da infecção por apresentarem títulos sorológicos superiores a 1:1024. O mesmo raciocínio é utilizado por Klun et al. (2006) que sugerem que 10% dos ovinos avaliados na Sérvia estão na fase aguda, pois apresentam anticorpos IgG específicos com títulos iguais ou superiores a 1: 1600.

No presente estudo a avaliação da avidéz de anticorpos IgG, também foi realizada utilizando-se como agente dissociante a uréia a 6M (Bahia et al. 1995). Para determinação do ponto de corte para avidéz foram adotados os valores propostos por Suaréz- Aranda et al. (2000), onde valores de avidéz maiores ou iguais a 50% indicam toxoplasmose crônica, enquanto que valores menores que 50% indicam infecção aguda. Por estes critérios verificamos que 168 (81,95%) das amostras previamente positivas para toxoplasmose apresentaram alta avidéz, o que sugere que os ovinos eram

portadores de infecção crônica e 37 (18,05%) apresentavam anticorpos de baixa avidéz. Se levarmos em consideração o total de animais avaliados (930 ovinos), veremos que aproximadamente 4% apresentam anticorpos de baixa avidéz, ou seja, um indicativo de infecção aguda ou recente.

A correlação da avidéz de anticorpos IgG anti- *T. gondii* com as variáveis individuais dos ovinos (faixa etária, sexo, tipo racial, mesorregião) foi avaliada.

Em relação a faixa etária, foi observada correlação da avidéz de anticorpos IgG anti- *T. gondii* com a idade. Os ovinos jovens apresentam anticorpos de baixa avidéz com maior frequência, mostrando que estes animais foram expostos precocemente ao parasito.

Foi encontrada associação da avidéz de anticorpos IgG anti- *T. gondii* com o sexo. Apesar dos carneiros apresentarem anticorpos de baixa avidéz com maior frequência, também foi observada a ocorrência desses anticorpos em algumas ovelhas adultas, sugerindo possibilidade de transmissão vertical, com riscos de aborto e má formação fetal. A maior frequência de machos apresentando anticorpos IgG anti- *T. gondii* de baixa avidéz sugere que, no momento da coleta, estes animais apresentavam maiores chances de se encontrarem em fase aguda de toxoplasmose do que as fêmeas. A razão para esse achado ainda não está esclarecida.

Com relação ao tipo de raça e mesorregião, não foi observada correlação da avidéz de anticorpos IgG anti- *T. gondii*, sugerindo que os ovinos encontram-se expostos aos mesmos fatores de riscos independente destas duas variáveis.

6.3. Fatores de risco para infecção por *T. gondii*

Os fatores de riscos identificados para a toxoplasmose ovina no estado do Rio Grande do Norte foram: faixa etária, presença de gatos e a utilização de água não exposta como fonte de água para estes animais.

Foi encontrada uma associação entre a prevalência de *T. gondii* e a idade dos ovinos, mostrando que, os animais adultos possuem 2,44 vezes mais chances (CI 95%; 1,58-3,75) de estarem infectados quando comparados aos animais mais jovens. A faixa etária dos ovinos é a variável mais discutida na literatura, tendo sido demonstrada em numerosos estudos de prevalência e fatores de riscos associados com a infecção pelo *T. gondii* (Larsson et al. 1980; Gorman et al. 1999; Van der Puije et al. 2000; Figliuolo et al. 2004; Clementino et al. 2007; Vesco et al. 2007; Caballero-Ortega et al. 2008a;

Ragozo et al. 2008; Pinheiro jr et al. 2009; Halos et al. 2010; Kamani et al. 2010; Anderlini et al. 2011; Luciano et al. 2011; Rossi et al. 2011; Villena et al. 2012). Como já discutido anteriormente, animais mais velhos apresentam uma maior prevalência em virtude do maior tempo de vida, e conseqüentemente de contato com os oocistos de *T. gondii* no meio ambiente.

Com relação aos gatos, foi observado que a presença destes animais nas unidades produtoras aumenta aproximadamente 1,55 vezes as chances (CI 95%; 1,11-2,16) dos ovinos adquirirem a infecção pelo *T. gondii*. Esta associação é provavelmente relacionada a maior contaminação ambiental por oocistos eliminados nas fezes destes felídeos, e portanto, são preponderantes na cadeia epidemiológica da transmissão de *T. gondii* para os animais de produção (Vesco et al. 2007; Clementino et al. 2009; Pinheiro jr et al. 2009; Lopes et al. 2010; Abu-Dalbouh et al. 2012).

Estudos sobre fatores de risco para toxoplasmose em outras espécies animais também têm sido realizados. Calvacante et al. (2008) demonstraram através da análise multivariada que a probabilidade de infecção dos caprinos no estado do Ceará é mais elevada em unidades produtoras que possuíam mais de 10 gatos circulantes.

Em contrapartida, Skjerve et al. (1998) destaca que a presença do gato por si só não é considerada fator de risco, uma vez que os gatos jovens são os principais responsáveis pela liberação de oocistos. Figliuolo et al. (2004) não observaram associação entre soropositividade de ovinos e presença de felídeos, uma vez que todas as fazendas havia pelo menos um ovino positivo.

Os ovinos provenientes de propriedades onde a água oferecida não era exposta tiveram chance de 1,61 maior (CI 95%; 1,25-2,09) de adquirir a toxoplasmose quando comparados com os animais de propriedades onde a água que eles consumiam era exposta. Estes dados são corroborados pelo estudo conduzido por Pinheiro jr et al. (2009) que observaram que os animais que vivem em propriedades com funcionamento de sistemas de água tem aproximadamente 3 vezes mais chances de adquirirem a infecção do que os animais que vivem em propriedades com coleções de água parada. A água pode servir como disseminadora de oocistos para a população. Desta forma, a contaminação de reservatórios de água com oocistos de *T. gondii* presentes em fezes de felinos infectados pode causar surtos. Porém, estes dados são contraditórios aos publicados por Vesco et al. (2007), que verificaram que a utilização de águas superficiais para os animais constitui 1,8 vezes mais chances de serem infectados quando comparados com animais que bebem água de poço.

Luciano et al. (2011) analisaram a água de beber, como fator de risco para toxoplasmose e observaram que a maior taxa de infecção nos ovinos são decorrentes do consumo de água de açude (46,11%), seguida de água de poço (44,61%) e água de nascente (24,22%), havendo diferença estatisticamente significativa entre estas fontes hídricas ($p < 0,001$). Assim como os caprinos, o consumo de água de açude, seguida de água de poço, foi associado com o maior número de sororeagentes do que aqueles que consomem água de nascente, provavelmente por se tratar de água corrente, diminuindo as chances de ingestão de oocistos infectantes.

Apesar de não ser possível observar diferença estatística significativa da prevalência da toxoplasmose em relação ao sistema de criação, uma vez que em 23 unidades produtoras (88%), os ovinos eram criados em regime semi-intensivo, temos que levar em consideração que a grande parte dos animais investigados é explorada em regime de livre pastoreio durante o dia, com alguma proteção do ambiente durante a noite. Desta forma, os gatos poderiam ter acesso não somente as áreas de pastejo, mas também aos apriscos onde os animais são recolhidos.

Vários estudos têm mostrado que os sistemas semi-intensivos são considerados como fatores de riscos associados com a presença de anticorpos anti- *T. gondii*, uma vez que, os animais submetidos a esse regime de exploração têm grande probabilidade de contato com oocistos esporulados excretados por felídeos selvagens e domésticos, contaminando as áreas (Araújo neto et al. 2008; Carneiro et al. 2009b; Anderlini et al. 2011; Luciano et al. 2011).

6.4. Isolamento de *T. gondii* em animais de produção

Segundo Dubey et al. (1998), os cistos teciduais de *T. gondii* permanecem intracelulares, contendo poucos a várias centenas de bradizoítos e sendo mais prevalentes nos tecidos muscular e neural, incluindo o cérebro, olho, músculos cardíacos e esquelético.

Nós realizamos o bioensaio com fragmentos de músculo cardíaco de ovinos, caprinos e suínos. Devido ao fato do coração de galinha ser muito apreciado como iguaria na culinária brasileira, não foi possível utilizar este órgão para isolamento de *T. gondii*. Desta forma optamos por usar o cérebro do animal, o qual geralmente é desprezado e não utilizado para consumo.

Na maioria dos experimentos, o tecido digerido foi inoculado em cinco camundongos. É interessante notar que, em seis dos 19 isolamentos de *Toxoplasma*, nem todos os camundongos inoculados desenvolveram a infecção pelo *T. gondii*. Na Amazônia, Dubey et al. (2006) verificaram que em 13 isolamentos, apenas um dos cinco camundongos inoculados se infectou com o *T. gondii*, indicando que a concentração de parasitos nos tecidos era muito baixa.

Este fato também foi observado em 11 dos 22 isolados em outros estudos conduzidos por Dubey et al. (2002). Os autores indicam que apenas poucos protozoários estavam presentes no inóculo, sendo provável que uma parcela de bradizoítos liberados dos cistos teciduais durante a digestão com pepsina e lavagem tenha sido destruída. Contudo os autores levantaram a possibilidade de que se um cisto estava presente no tecido de galinha e continha 100 bradizoítos e apenas 10% sobreviveram ao processo de digestão, não haveria mais que 10 bradizoítos no material inoculado em cinco camundongos.

Dubey et al. (2006b) relataram que o sucesso ou insucesso do isolamento depende do número de camundongos inoculados, a quantidade de tecido utilizada no bioensaio e a concentração do parasito nos tecidos. O fato de não termos encontrado nenhum isolado de *T. gondii* em ovinos, deve-se provavelmente a baixa concentração de parasitos nos tecidos ou pelo fato de que a infecção por *T. gondii* nestes animais encontrava-se na fase aguda ou fase crônica recente, e desta forma os cistos no coração eram poucos ou inexistentes, não permitindo o isolamento do parasito. Diferente dos nossos resultados, Dubey et al. (2008) conseguiram um índice de recuperação pelo bioensaio em camundongos e/ou gatos de 77,9% (53/68) de ovinos destinados ao consumo humano no EUA. Porém, taxas inferiores de isolamento no Brasil foram obtidos por Ragozo et al. (2008) e Silva et al. (2011): 19,5% (16/82) e 30% (20/66), respectivamente.

Dentre os caprinos, o isolamento de *T. gondii* foi obtido em 10% (1/10). Há poucos estudos de isolamento de *T. gondii* em camundongos a partir de caprinos. Cavalcante et al. (2007) obtiveram uma eficiência de 20% (2/10) para isolamento de *T. gondii* em caprinos soropositivos do Ceará.

Ragozo et al. (2009) utilizaram tecidos de 26 caprinos soropositivos para o isolamento de *T. gondii* por bioensaio em grupo de 10 camundongos. Os tecidos de cada caprino foram distribuídos em dois grupos, ou seja, cérebro e coração em um e masseter e diafragma no outro. *T. gondii* foi isolado de 12 caprinos (46,1%). O isolamento foi

maior nos camundongos que receberam cérebro e coração do que nos animais que receberam diafragma e músculo masseter ou ambos.

No presente estudo, *T. gondii* foi isolado de 62,5% (5/8) dos suínos soropositivos. Nós relatamos provavelmente os primeiros isolamentos de *T. gondii* em suínos do Estado do Rio Grande do Norte. Resultados inferiores foram obtidos por Santos et al. (2005) em São Paulo, onde *T. gondii* foi isolado de apenas 25% dos tecidos de coração, cérebro e língua de suínos soropositivos.

Sousa et al. (2006) também relataram o isolamento de *T. gondii* em suínos de Portugal. As amostras de cérebro e/ou coração de cada suíno foram utilizadas para bioensaio em dois camundongos. *T. gondii* foi isolado a partir de 15 (47,5%) suínos soropositivos. Os autores citam que a baixa taxa de isolamento deve-se ao fato de terem utilizados apenas dois camundongos e na quantidade de tecido inoculada se comparado com outros estudos.

No Rio de Janeiro, em Campos de Goytacazes, Frazão-Teixeira et al. (2011) obtiveram 5 isolados de *T. gondii* a partir de tecidos (cérebro e coração) de 35 suínos. Estes autores chamam atenção ao fato que nesta região do Brasil os suínos são criados soltos na natureza e não são mantidos em boas condições de higiene, podendo representar uma população sentinela ideal para examinar se o consumo de carne de suíno mal cozida pode infectar pessoas e representar um risco para saúde humana.

No presente estudo, *T. gondii* foi isolado a partir do cérebro de 43,3% (13/30) das galinhas submetidos ao bioensaio. Uma taxa semelhante de isolamento de *T. gondii* proveniente de tecidos de galinhas soropositivas foi encontrada em todo o mundo, como no México (46,1%), em Israel (42,2%), no Chile (46,8%), na Costa Rica (53,3%) e na Nicarágua (55,9%) (Dubey et al. 2004b, 2004c, 2006a, 2006b, 2006c).

O isolamento de *T. gondii* a partir de cérebro de galinhas caipira descrito nesse presente trabalho contrastam com os resultados de Dubey et al. (2006) que isolaram o parasito do coração, mas não do cérebro, de 7 galinhas caipira da Amazônia. Em estudos anteriores, Dubey et al. (2004a) isolaram *T. gondii* mais frequentemente do coração que dos cérebros de galinhas. Desta forma, Dubey et al. (2006) aconselha que num estudo de isolamento de *T. gondii* em galinhas é necessário o uso dos dois órgãos, tanto cérebro quanto coração.

A frequência de isolamentos de *T. gondii* através do bioensaio provenientes de galinhas caipira no Brasil encontra-se bastante diversificada, variando entre 28,4% no Nordeste (Oliveira et al. 2009) e 75% em São Paulo (Dubey et al. 2002). Estes

resultados são importantes se levarmos em consideração que as galinhas caipira são um bom indicador da presença de oocistos de *T. gondii* no solo, pelo hábito de se alimentarem a partir do solo (Dubey et al. 2006a, 2006b).

6.5. Virulência de *T. gondii*

Embora *T. gondii* seja reconhecido como a única espécie do gênero, existe uma variabilidade de virulência entre os diferentes isolados deste parasito (Howe & Sibley 1995). Desta forma, há muito tempo se sabe que alguns isolados de *T. gondii* são altamente virulentos enquanto outros são menos virulentos para camundongos.

Como visto anteriormente, há dois critérios descritos na literatura para a determinação da virulência dos isolados de *T. gondii*. Para a definição da virulência no presente estudo, adotamos os critérios de Dubey (2002). De acordo com estes autores, a mortalidade entre os cinco camundongos *Swiss* inoculados com material suspeito foi observada diariamente durante o processo de isolamento.

Desta forma, observamos neste estudo que 88,2% dos isolados (17/19) foram caracterizados como virulentos e os demais como avirulentos. Estes dados são corroborados por Dubey et al. (2002), ao observarem que 90,1% dos isolados (20/22) foram virulentos para camundongos. Segundo Gilbert et al. (2008) no Brasil ocorre o predomínio de cepas mais virulentas para camundongos quando comparadas com as européias.

Diversos estudos de isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas assintomáticas do Brasil também corroboram com os nossos resultados: os isolados foram mais virulentos para camundongos que os isolados provenientes da Europa ou América do Norte, independente do genótipo (Dubey et al. 2003, 2004b, 2006). O mesmo fato foi observado para isolados obtidos de outros animais de produção como ovinos, caprinos e suínos (Santos et al. 2005; Sousa et al. 2006; Dubey et al. 2008; Ragozo et al. 2009; Frazão-teixeira et al. 2011)

Resultados diferentes dos descritos neste trabalho foram obtidos por Dubey et al. (2010), onde a maioria dos isolados de galinhas da ilha de Fernando de Noronha não foram virulentos para os camundongos. Entretanto, todos os seis isolados (2 de caprinos e 4 de galinhas caipira) obtidos anteriormente no Estado do Rio Grande do Norte (RN) e avaliados utilizando metodologia semelhante ao nosso estudo, foram considerados virulentos para camundongos (Ragozo et al. 2008; Oliveira et al. 2009).

Estudos de mapeamento genético sugerem que o marcador CS3 presente no cromossomo *VIIa* de *T. gondii* está associado com a virulência em camundongos. Vários autores estão utilizando a amplificação desse marcador para estabelecer a virulência dos isolados (Pena et al. 2008; Yai et al. 2009; Dubey et al. 2010; Ragozo et al. 2010; Silva et al. 2011; Soares et al. 2011). Numa próxima etapa de estudo dos novos isolados de *T. gondii* obtidos no RN devemos avaliar o marcador CS3 por RFLP para averiguar possíveis associações com a virulência em camundongos.

6.6. Genotipagem de *T. gondii*

Nesse estudo, a genotipagem de 19 isolados de *T. gondii* de animais de produção do RN através da análise de 11 marcadores por PCR-RFLP revelou 6 genótipos.

Os primeiros estudos de genotipagem de *T. gondii* através da PCR-RFLP no locus SAG2 relatam uma estrutura populacional clonal com três linhagens predominantes, denominadas tipos I, II e III (Howe & Sibley 1995). Entretanto estudos posteriores realizados com isolados de *T. gondii* de diferentes hospedeiros do Brasil mostram uma alta diversidade genética quando analisados com outros marcadores além do SAG2 (Ferreira et al. 2006). Nenhum tipo clonal dos arquétipos descritos por Howe & Sibley (1995) foi encontrado no presente estudo, todos foram atípicos. Esse resultado corrobora com outros estudos que demonstram que os isolados clonais clássicos são raros no Brasil, principalmente o tipo II (Ragozo et al. 2010). Entretanto já foram descritos alguns isolados clonais como os do tipo I em galinhas (Dubey et al. 2008a), do tipo II em galinhas (Dubey et al. 2010) e ovinos (Silva et al. 2011) e do tipo III em galinhas (Dubey et al. 2008a) e capivaras (Yai et al. 2009) do Brasil.

É provável que a amplitude geográfica do Brasil, o clima tropical–subtropical e a grande variedade da diversidade da fauna contribuam para a variabilidade genética de linhagens brasileira de *T. gondii* (Ferreira et al. 2006).

A população de *T. gondii* é altamente diversificada em nosso país, no qual a troca genética freqüente tem gerado uma série de linhagens recombinantes e algumas delas, bem sucedidas, têm se expandido. Quatro genótipos identificados como BrI, BrII, BrIII e BrIV, foram considerados clonais no Brasil (Pena et al. 2008). Apesar de vários estudos realizados no Brasil, enquadrarem alguns de seus isolados dentro desta classificação (Pena et al. 2008; Yai et al. 2009; Ragozo et al. 2010), no presente estudo, estes tipos clonais também não foram identificados. Estes "novos" genótipos brasileiros

foram designados, de acordo com vários autores, como atípicos, exóticos, recombinantes ou genótipos não arquetípico (Dardé 2008). Segundo Frazão-Teixeira et al. (2011) os isolados brasileiros não devem ser designados como recombinantes de cepas arquetípicas, como proposto anteriormente por Ferreira et al. (2006), e sim como “atípicos” porque possuem novas combinações de alelos únicos além de alguns alelos arquetípicos. Já Pena et al. (2008) relatam que essa denominação de “isolados atípicos” pode ser errônea já que a população de *T. gondii* é única na América do Sul e os dados do RFLP não podem ser diretamente comparados com os da América do Norte e da Europa.

Os seis genótipos observados neste estudo foram designados #1 a #6. Quatro desses 6 genótipos têm um isolado cada, um têm dois isolados e um têm 13 isolados. O aparecimento de isolados com o mesmo genótipo sugere que estes possam ser linhagens de circulação comum no RN. Mais da metade dos genótipos apresentam um único isolado, o que sugere que podem existir mais genótipos únicos que circulam no ambiente e/ou somente uma pequena parcela da população do parasito foi observada (Dubey et al. 2008a).

Apesar do pequeno número de isolados avaliados, os mesmos apresentaram uma alta diversidade genética, o que corrobora a afirmação de que a população de *T. gondii* do Brasil é altamente diversa. Estas observações estão de acordo com recentes estudos de genotipagem de *T. gondii* isolado de galinhas (Dubey et al. 2008a; Soares et al. 2011), gatos (Pena et al. 2008), capivara (Yai et al. 2009), caprinos (Ragozo et al. 2010), ovinos (Ragozo et al. 2010; Siva et al. 2011) e suínos (Frazão-Teixeira et al. 2011) do Brasil.

Os isolados do genótipo #1 são provenientes do mesmo município, e desta forma, há a possibilidade de terem a mesma fonte de infecção para todas as galinhas. Em contrapartida, os dois isolados do genótipo #4 foram obtidos de um suíno de Lajes e um caprino de São Rafael. Estes municípios distam aproximadamente 100 km um do outro, sendo pouco provável que os dois isolados venham de uma fonte comum. Provavelmente diferentes fontes de infecção foram envolvidas e deverão ser investigadas em trabalhos futuros.

O isolado TgPgBrRN1 (genótipo #2), proveniente de um suíno da cidade de Natal, é igual ao genótipo do isolado TgCkBr177, obtido no estado do Ceará e caracterizado por Dubey et al. (2008). Em ambos os estudos, os isolados foram

virulentos para camundongos. Sugerimos que esta pode ser uma linhagem comum que circula na Região Nordeste do Brasil.

O isolado TgPgBrRN2 (genótipo #3), obtido de um suíno do município de Monte Alegre é similar ao genótipo do isolado TgCkBr130 obtido no estado de Rondônia e caracterizado por Dubey et al. (2008). Entretanto, houve divergência no que se refere a virulência, sendo o isolado TgCkBr130 se mostrando avirulento.

Já o isolado TgPgBrRN4 (genótipo #5), proveniente de um suíno do município de Natal/RN é similar aos genótipos TgCkBr185, TgCkBr184 (Alagoas), TgCkBr183 (Sergipe), TgCkBr179 e TgCkBr180 (Ceará), TgCkBr176 e TgCkBr174 (Bahia), TgCkBr167 e TgCkBr170 (Rio Grande do Norte), TgCkBr165 (Pernambuco), caracterizados por Dubey et al. (2008) e o isolado TgCatstk7 (St. Kitts - Índia) encontrado por Dubey et al. 2009. O encontro desses isolados em diferentes estados do Nordeste brasileiro, inclusive no RN, sugere que esta linhagem é amplamente disseminada em diferentes regiões, dados que são corroborados por estudos conduzidos por Dubey et al. (2008). Ao contrário do que observamos, aqueles isolados foram avirulentos para camundongos.

Estudos realizados com isolados da Europa e EUA, mostraram que as cepas clonais do tipo I são associadas ao fenótipo virulento em camundongos. Já as cepas tipo II e III são consideradas avirulentas levando a infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos (Howe & Sibley 1995). No Brasil, a maioria dos isolados são atípicos e virulentos (Ferreira et al. 2006; Yai et al. 2009; Dubey et al. 2008). A associação entre genótipo atípico e um fenótipo de virulência em modelos experimentais tem sido demonstrada pelos autores através da identificação de fatores de virulência com determinação genética. A análise das taxas de mortalidade em camundongos infectados com isolados brasileiros indica que a linhagem BrI seria a mais virulenta, a BrIII não virulenta e as tipo BrII e BrIV de virulência intermediária (Pena et al. 2008).

No presente estudo não foram observadas diferenças fenotípicas de virulência entre os dois isolados do genótipo #4, considerados virulentos para camundongos. Em contrapartida, a análise do genótipo #1 mostra que os isolados apresentam virulência diferente em camundongos, sendo 12 isolados virulentos e um avirulento. Dubey et al. (2008) encontraram dois isolados geneticamente semelhantes (TgShUs22 e TgShUs28) com virulência diferente em camundongos, sendo o último mais virulento. Estes autores relatam que é necessário fazer o sequenciamento de DNA para determinar se estas duas

cepas são geneticamente idênticas. A análise de marcadores associados à virulência (como o gene CS3) bem como o sequenciamento de regiões críticas do genoma do DNA dos 13 isolados de *T. gondii* obtidos de galinhas neste estudo poderá elucidar sobre sua origem comum bem como aspectos relacionados a virulência dos mesmos.

Soares et al. (2011) relatam que as diferenças biológicas encontradas entre isolados de um mesmo genótipo não devem ser negligenciadas. Segundo estes autores, o genótipo é o que realmente define a virulência, portanto outra explicação para os resultados divergentes, seria que os marcadores utilizados no estudo podem não ter sido capazes de identificar possíveis diferenças entre os isolados em questão.

Os isolados dos novos genótipos #2 e #3 mataram 100% dos camundongos infectados e o isolado do genótipo #6 não matou nenhum dos camundongos infectados. No entanto, é fundamental que seja testada a virulência de novos isolados destes genótipos. Isso ocorre porque a dose de infecção para um dado isolado não foi conhecido no processo de isolamento do parasito em camundongos, e a virulência nestes animais só pode ser inferida quando vários isolados do mesmo genótipo são testados (Pena et al. 2008; Yai et al. 2009).

Embora exista diferença entre as infecções causadas em camundongos com diferentes isolados de *T. gondii*, não há garantia de que as diferenças observadas no modelo murino também serão vistas em outros hospedeiros. A virulência é estritamente contextual e um isolado do parasito que causa doença grave em um hospedeiro pode ser benigno em outro (Boothroyd & Grigg 2002).

É possível que futuramente, com a evolução da compreensão da biologia da população de *T. gondii* e, com técnicas cada vez mais sensíveis para o estudo das diferentes linhagens, as correlações entre o tipo do isolado e o desenvolvimento da doença se tornarão mais numerosas e mais precisas. Esta informação será de valor inestimável para pacientes e médicos para que decidam sobre o tratamento mais adequado. Em alguns casos, a doença pode ser previsivelmente auto-limitada, não sendo necessária a intervenção medicamentosa. Em outros casos, o tratamento, que é agressivo para determinados pacientes, pode ser efetuado sob controle médico. Estas decisões serão provavelmente mais importantes no tratamento da infecção de grávidas, onde o feto em desenvolvimento é particularmente sensível aos efeitos tóxicos das drogas, e assim o seu uso deve ser feito somente quando absolutamente necessário (Boothroyd & Grigg, 2002).

Já para Dardé (2008), relações entre o genótipo de *T. gondii* e a doença em humanos certamente existem, mas são ainda difíceis de avaliar, devido ao papel do estado imune e genético do hospedeiro no controle da infecção e de outros fatores do parasito, tais como carga parasitária e/ou a forma infectante. A situação dos "novos" genótipos atípicos é ainda mais complexa, devido à sua diversidade e à recombinação dos genes. A recombinação pode levar as cepas/isolados a adquirirem novos mecanismos patogênicos, como sugerido em humanos pela gravidade dos casos de toxoplasmose em pacientes imunocompetentes. Assim, os novos genótipos resultantes dessas recombinações, podem expandir na população, levando a doenças emergentes.

Dos 19 isolados obtidos por bioensaio, não foi possível realizar a genotipagem completa em seis amostras pela ausência de digestão ou ocorrência de produtos de digestão extremamente polimórficos para o marcador c29-2, desta forma o sequenciamento do genoma destes isolados de *T. gondii* será a próxima etapa a ser realizada pelo nosso grupo.

Frazão-Teixeira et al. (2011) chamam atenção para a importância de se realizar o sequenciamento do DNA de *T. gondii*, sendo esta técnica melhor que a PCR-RFLP por ser capaz de detectar diferenças genéticas, nucleotídeo por nucleotídeo, sendo importante para delimitar com precisão a verdadeira relação genética entre os isolados que circulam nas regiões do mundo onde existe grande variação genética do parasito.

Baseando-se nos resultados deste estudo, não foi possível correlacionar os genótipos dos isolados de *T. gondii* encontrados no estado do Rio Grande do Norte com o hospedeiro de origem ou a virulência em camundongos. Sabe-se que no Brasil, nenhuma evidência concreta existe de correlação da virulência de *T. gondii* em camundongos e diferentes genótipos com a evolução clínica durante a infecção humana (Frazão-Teixeira et al. 2011).

7. CONCLUSÕES

1. O elevado número de ovinos positivos em duas mesorregiões distintas do Rio Grande do Norte indica que *T. gondii* encontra-se amplamente difundido no Estado.
2. Os ovinos da mesorregião Leste Potiguar são mais parasitados pelo *T. gondii* do que os da mesorregião Central Potiguar, provavelmente devido a maior pluviosidade, que permite a viabilidade de oocisto no meio ambiente.
3. A ocorrência de ovelhas com anticorpos de baixa avidéz anti-*T. gondii*, sugere toxoplasmose aguda e possibilidade de transmissão transplacentária do parasito, com possíveis perdas reprodutivas decorrentes de abortos ou má formação fetal. Sugere também que a transmissão estava ocorrendo durante o período de coleta.
4. Os fatores de risco associados à infecção pelo *T. gondii* foram: presença de gatos, idade dos ovinos e a utilização de fonte água não exposta para estes animais, caracterizando a existência de transmissão da infecção associada a oocistos esporulados de *T. gondii* no meio ambiente.
5. *T. gondii* foi isolado de animais de produção (caprinos, suínos e galinhas caipira) abatidos para consumo humano, evidenciando a importância destes animais como fonte de infecção para o homem.
6. Os isolados de *T. gondii* obtidos de animais de produção foram classificados em seis genótipos atípicos.

7. A diversidade genética encontrada nos isolados de *T. gondii* do Estado do Rio Grande do Norte foi similar a de outros estados do país.

8. Utilizando 11 marcadores genéticos descritos por Su et al (2009), não foi observada associação entre o genótipo dos isolados de *T. gondii* e a virulência do parasito em camundongos.

8. REFERÊNCIAS

- Abu-Dalbouh MA, Ababneh MM, Giadinis ND, Lafi SQ 2012. Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks. *Tropical Animal Health and Production* 44:49–54.
- Ajzenberg D, Bañuls A-L, Tibayrenc M, Dardé ML 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal for Parasitology* 32: 27-38.
- Ajzenberg D, Bañuls A-L, Su C, Dumètre A, Demar M, Carne B, Dardé ML 2004. Genetic diversity, Clonal and Sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 34: p. 1185-1196.
- Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal Clinical Microbiology* 43: 1940-1943.
- Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, Aubert D, Franck J, Bessièrès MH, Quinio D, Pelloux H, Delhaes L, Desbois N, Thulliez P, Robert-Gangneux F, Kauffmann-Lacroix C, Pujol S, Rabodonirina M, Bougnoux ME, Cuisenier B, Duhamel C, Duong TH, Filisetti D, Flori P, Gay-Andrieu F, Pralong F, Nevez G, Totet A, Carne B, Bonnabau H, Dardé ML, Villena I 2009. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* Isolates Associated with Toxoplasmosis in Immunocompromised Patients and Correlation with Clinical Findings. *Journal Infections Disease* 199: 1155-1167.
- Allain JP, Palmer CR, Pearson G 1998. Epidemiological Study of Latent and Recent Infection by *Toxoplasma gondii* in Pregnant Women from a Regional Population in the U.K. *The Journal of Infection* 36: 189-196.
- Amato Neto V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS 1995. *Toxoplasmose*, 4nd ed, Sarvier, São Paulo, 154 pp.
- Amendoeira MRR, Coutinho SG 1982. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the saliva and tonsils of a three-year-old child. *Journal infectious Diseases* 145: 587.
- Anderlini GA, Mota RA, Faria EB, Cavalcanti EFTSF, Valença RMB, Pinheiro Júnior JW, Albuquerque PPF, Souza Neto OL 2011. Occurrence and risk factors associated with infection by *Toxoplasma gondii* in goats in the State of Alagoas, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44: 157-162.
- Araújo Neto JO, Azevedo SS, Gennari SM, Funada MR, Pena HFJ, Araújo ARCP, Batista CSA, Silva MLCR, Gomes AAB, Piatti RM, Alves CJ 2008. Prevalence and risk factors for anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in goats of the Seridó Oriental microregion, Rio Grande do Norte state, Northeast region of Brazil. *Veterinary Parasitology* 156: 329-332.

Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PF 2002. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction-food for thought?. *International Journal for Parasitology* 32: 1193-1199.

Ayala, F. J. Is Sex better? Parasites say “no”. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 95, p. 3346-3348, 1998.

Bahia MT, Vitor RWA, Caldas RP, Antunes CMF, Chiari CA 1995. Avidéz de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma* da classe IgG e sua utilização na diferenciação entre toxoplasmose recente e crônica em caprinos. *Brazilian Journal Veterinary Animal Science* 32: 11-16.

Bahia-oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-silva J, Alves CCF, Oréface F, Addiss DG 2003. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 9: 56-62.

Bártová E, Sedlák K, Literák I 2009. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in sheep the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 161: 131-132.

Belfort-neto R, Nussenblatt V, Rizzo L, Muccioli C, Silveira C, Nussenblatt R, Khan A, Sibley LD, Belfort-jr R 2007. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79: 111-114.

Bertozi LC, Suzuki LA, Rossi CL 1999. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in a patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41: 175-177.

Blewett DA, Watson WA 1983. The epidemiology of ovine toxoplasmosis. II. Possible sources of infection in outbreaks of clinical disease. *Brazilian Veterinary Journal* 139: 546-555.

Bonametti AM, Passos JN, Silva EMK, Bortoliero AL 1997. Surto de Toxoplasmose Aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 21-25.

Boothroyd JC, Grigg ME 2002. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection, do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology* 5: 438-442.

Boughattas S, Ben-abdallah R, Siala E, Souissi O, Aoun K, Bouratbine A 2010. Direct Genotypic Characterization of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Congenital Toxoplasmosis in Tunisia (North Africa). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 1041–1046.

- Brandão GP, Ferreira AM, Melo MN, Vitor RWA 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite* 13: 143-149.
- Buxton D1998. Protozoan infections(*Toxoplasma gondii* , *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary Research* 29: 289-310.
- Caballero-ortega H, Palma JM, García-márquez LJ, Gildo-cárdenas A, Correa D 2008a. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, Mexico. *Parasitology* 135: 1385-1389.
- Caballero-ortega H, Quiroz-romero H, Olazarán-jenkis S, Correa D 2008b. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology* 135: 1385-1389.
- Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH 1991. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii* . *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33: 213-21.
- Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM 2000. Toxoplasmose: Ocorrência de anticorpos *antiToxoplasma gondii* e diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira* 46: 335-341.
- Carneiro ACAV, Carneiro M, Gouveia AMG, Ribeiro LSVB, Vitor RWA 2009a. Seroprevalence and risk factors of sheep toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *Revue de Médecine Vétérinaire* 160: 527-531.
- Carneiro ACAV, Carneiro M, Gouveia AMG, Guimarães AS, Marques APR, Vilasboas LS, Vitor RWA 2009b. Seroprevalence and risk factors of caprine toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology* 160: 225-229.
- Cavalcante ACR 2004. *Epidemiologia e caracterização do Toxoplasma gondii (Nicolle & Manceaux, 1909) em caprinos no Ceará*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 145 pp.
- Cavalcante ACR, Ferreira AM, Melo MN, Fux B, Brandão GP, Vitor RWA 2007. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Ruminant Research* 69: 79-82.
- Cavalcante ACR, Carneiro M, Gouveia AMG, Pinheiro RR, Vitor RWA 2008. Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 36-41.

- Chikweto A, Kumthekar S, Tiwari K, Nyack B, Deokar MS, Stratton G, Macpherson CNL, Sharma RN, Dubey JP 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Pigs, Sheep, Goats, and Cattle from Grenada and Carriacou, West Indies. *Journal of Parasitology* 97: 950-951.
- Clementino MM, Souza MF, Andrade neto VF 2007. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. *Veterinary Parasitology* 146: 199-203.
- Clementino MM, Barbosa IR, Andrade neto VF 2009. Toxoplasmosis in Sheep: A Potential Risk of Infection Among Residents and Farm Workers in Lajes, Brazil. *The Open Parasitology Journal* 3: 1-3.
- Cook AJC, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT 2000. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *British Medical Journal* 321: 142-147.
- Cozon GJN, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F 1998. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *European Journal Clinical Microbiology Infectology Disease* 17: 32-36.
- Cristina N, Dardé ML, Boudin C, Tavernier G, Pestre alexandre M, Ambroise-thomas P 1995. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains, combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitology Research* 81: 32-37.
- Current WL, Upton SJ, Long PL 1990. Taxonomy and Life Cycle. In: PL Long. *Coccidiosis of man and domestic animals*, CRC Press, Boston, p. 7-8.
- Dardé ML 2008. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15: 366-371.
- Dubey JP 1990. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. *Journal American Veterinary Medical association* 196: 259 -262.
- Dubey JP 1994. Toxoplasmosis. *Journal American Veterinary Medical association* 205: 1593-1598.
- Dubey JP 1996. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Veterinary Parasitology* 64: 65-70.
- Dubey JP 1998. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 28: 267-299.
- Dubey JP 1998a. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology* 74: 75-77.
- Dubey JP 2004. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology* 126: 57-72.

- Dubey JP 2009. Toxoplasmosis in sheep – The last 20 years. *Veterinary Parasitology* 163: 1-14.
- Dubey JP 2010. *Toxoplasmosis of animal and humans*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 312 pp.
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *The Journal of Experimental Medicine* 132: 636–662.
- Dubey JP, Beattie CP 1988. *Toxoplasmosis of animal and man*. Boca Raton: CRC Press, 220 pp.
- Dubey JP, Kirkbride CA 1989. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *Journal American Veterinary Medical association* 195: 1715-1716.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradizoytes, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Research* 11: 267-299.
- Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AMA, Shen SK, Kwok OCH, Hill DE, Thulliez P 2002. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo Brazil: unexpected findings. *International Journal for Parasitology* 32: 99–105.
- Dubey JP, Navarro IT, Graham DH, Dahl E, Freire RL, Prudencio LB, Sreekumar C, Vianna MC, Lehmann T 2003. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology* 117: 229-234.
- Dubey JP, Venturini MC, Venturini L, Piscopo M, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Vianna MCB, Lehmann T 2003a. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. *The Journal of Parasitology* 89:1063-1064.
- Dubey JP, Levy MZ, Sreekumar CO, Kwok OCH, Shen SK, Dahl E, Thulliez P, Lehmann T 2004a. Tissue Distribution and Molecular Characterization of Chicken Isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *The Journal of Parasitology* 90: 1015–1018.
- Dubey JP, Morales ES, Lehmann T 2004b. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* From Free-Ranging Chickens From Mexico. *The Journal of Parasitology* 90: 411–413.
- Dubey JP, Salant H, Sreekumar C, Dahl E, Vianna MCB, Shen SK, Kwok OCH, Spira D, Hamburger J, Lehmann TV 2004c. High prevalence of *Toxoplasma gondii* in a commercial flock of chickens in Israel, and public health implications of free-range farming. *Veterinary Parasitology* 121: 317–322.

Dubey JP, Bhaiyat MI, De allie C, Macpherson CNL, Sharma RN, Sreekumar C, Vianna MCB, Shen SK, Kwok OCH, Miska KB, Hill DE, Lehmann T 2005. Isolation, Tissue Distribution, and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* from Chickens in Grenada, West Indies. *The Journal of Parasitology* 91: 557–560.

Dubey JP, Gomez-marin JE, Bedoya A, Lora F, Vianna MCB, Hill D, Kwok OCH, Shen SK, Marcet PL, Lehmann T 2005a. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Veterinary Parasitology* 134: 67–72.

Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MCB, Miska K, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Gamble HR 2005b. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *The Journal of Parasitology* 91: 1082-1093.

Dubey JP, Karhemere S, Dahl E, Sreekumar C, Diabate A, Dabire M.K, Vianna MCB, Kwok OCH, Lehmann T 2005c. First Biologic and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates from Chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *The Journal of Parasitology* 91: 69–72.

Dubey JP, Lenhart A, Castillo CE, Alvarez L, Marcet P, Sreekumar C, Lehmann T 2005d. *Toxoplasma gondii* infections in chickens from Venezuela: isolation, tissue distribution, and molecular characterization. *The Journal of Parasitology* 91: 1332–1334.

Dubey JP, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LMA, Vianna MCB, Arcet PL 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. *The Journal of Parasitology* 92: 36–40.

Dubey JP, Paititucci AN, Su C, Sundar N, Kwok OCH, Shen SK 2006a. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in Free-Range Chickens from Chile. *Veterinary Parasitology* 92: 184–186.

Dubey JP, Su C, Oliveira J, Morales JA, Bolaños RV, Sundar N, Kwok OCH, Shen SK 2006b. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America. *Veterinary Parasitology* 139: 29-36.

Dubey JP, Sundar N, Pineda N, Kyvsgaard NC, Luna LA, Rimbaud E, Oliveira JB, Kwok OCH, Qi Y, Su C 2006c. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. *Veterinary Parasitology* 142: 47-53.

Dubey JP, Vianna MCB, Sousa S, Canada N, Meireles S, Correia da costa JM, Marcet PL, Lehmann T, Dardé ML, Thulliez P 2006d. Characterization of *Toxoplasma gondii* Isolates in Free-Range Chickens From Portugal. *The Journal of Parasitology* 92: 184–186.

Dubey JP, Sundar N, Gennari SM, Minervino AH, Farias NA, Ruas JL, Dos santos TR, Cavalcante GT, Kwok OC, Su C 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology* 143: 182-188.

Dubey JP, Sundar N, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, Majumdar D, Su C 2008. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *International Journal for Parasitology* 38: 999-1006.

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Bahia Oliveira LMG, Su C 2008a. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology* 157: 299-305.

Dubey JP, Moura L, Majumdar D, Sundar N, Velmurugan GV, Kwok OCH, Kelly P, Krecek RC, Su C 2009. Isolation and characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates revealed possible high frequency of mixed infection in feral cats (*Felis domesticus*) from St Kitts, West Indies. *Parasitology* 136: 589-594.

Dubey JP, Su C 2009. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 190-195.

Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, Ferreira LR, Kwok OCH, Qu D, Su C, Marvulo MF, Alves LC, Mota RA, Silva JC 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *The Journal of Parasitology* 96: 709-712.

Dumètre A, Ajzenberg D, Rozette L, Mercier A, Dardé ML 2006. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: Seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Veterinary Parasitology* 142: 376-379.

Duncanson P, Terry RS, Smith JE, Hide G 2001. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal for Parasitology* 31: 1699-1703.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P 2009. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *International Journal for Parasitology* 199: 280-285.

El-on J, Peiser J 2003. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Harefuah* 142: 48-55.

Elsaid MM, Martins MS, Frézard F, Braga EM, Vitor RWA 2001. Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 99-104.

Esteban-Redondo I, Innes EA 1997. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 20: 191-196.

Esteban-Redondo I, Innes EA 1998. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *International Journal for Parasitology* 28: 1459-1466.

Fayer R 1981. Toxoplasmosis update and public health implications. *Canadian Veterinary Journal* 22: 344-352.

Ferreira AM, Martins MS, Vitor RWA 2001. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated in Brazil. *Parasite* 8: 99–105.

Ferreira AM, Vitor RWA, Carneiro ACAV, Brandão GP, Melo MN 2004. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infection, Genetics and Evolution* 4: 131–42.

Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution* 6: 22-31.

Ferreira IMR, Vidal JE, Mattos CCB, Mattos LC, Qu D, Su S, Pereira-Chiocola VL 2011. *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in São Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Experimental Parasitology* 129:190-195.

Figliuolo LPC, Kasai N, Ragozo AMA, De Paula VSO, Dias RA, Souza SLP, Gennari SM 2004. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 123: 161-166.

Freyre A, Bonino J, Castells D, Correa O, Cassaretto A 1997. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology* 73: 13-15.

Fraão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, Oliveira FCR 2011. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Veterinary Parasitology* 175: 33-39.

Fusco G, Rinaldi L, Guarino A, Proroga YTR, Pesce A, Giuseppina M, Cringoli G 2007. *Toxoplasma gondii* in sheep from the Campania region (Italy). *Veterinary Parasitology* 149: 271-274.

Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley D, Vitor RWA, Gazzinelli RT 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I–III) of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity* 71: 6392–6401.

- Garrido JA 1978. *Toxoplasmosis*, 1nd ed, Editorial Marban, Espanha, p. 15-8.
- Gilbert R 2009. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104: 305-311.
- Gilbert R, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira L, Tan HK, Buffolano W, Petersen E 2008. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. Neglected Tropical Disease 2: 8-14.
- Gorman T, Arancibia JP, Lorca M, Hird D, Alcaíno H 1999. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep and alpacas (Llama pacas) in Chile. Preventive Veterinary Medicine 40: 143-149.
- Gross U, Bohne W, Soête M, Dubremetz JF 1996. Developmental Differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii* . Parasitology Today 12: 30-33.
- Halos L, Thébault A, Aubert D, Thomas M, Perret C, Geers R, Alliot A, Escotte-binet, S, Ajzenberg D, Dardé ML, Durand B, Boireau P, Villena I 2010. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. International Journal for Parasitology 40: 193-200.
- Hamzavi Y, Mostafaie A, Nomanpour B 2007. Serological Prevalence of Toxoplasmosis in Meat Producing Animals. Iranian Journal of Parasitology 2: 7-11.
- Hashemi-Fesharki R 1996. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cattle, sheep and goats in Iran. Veterinary Parasitology 61: 1-3.
- Hill D, Dubey JP 2002. *Toxoplasma gondii* : transmission diagnosis and prevention. Clinical Microbiology and Infection 8: 634-640.
- Hirt, J. 1974. **Toxoplasmosis**, 1nd ed., Editorial “El Ateneo”, Buenos Aires, p.3-4.
- Howe DK.; Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. Journal Infectology Disease 72: 1561–1566.
- Hurtado A, Adurez G, Moreno B, Barandika J, Garcia-perez AL 2001. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Veterinary Parasitology 102: 17-27.
- IDEMA. **Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do RN.** Anuário Estatístico 2010. Disponível em: < http://www.idema.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/idema/socio_economicos/arquivos/Anuario-CDROM%202010/index.htm>.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** 2009. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab17.pdf>.

Innes EA 1997. Toxoplasmosis: comparative species susceptibility and host immune response. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 20: 131-138.

Innes EA, Bartley PM, Buxton D, Katzer F 2009. Ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 136:1887-1894.

Jacobs L, Remington JS, Milton ML 1996. The resistance of the encysted form. *The Journal of Parasitology* 46: 11-21.

Jittapalapong S, Sangvaranond A, Pinyopanunat N, Chimnoi I, Koizumi S, Maruyama S 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Veterinary Parasitology* 127: 17-22.

Johnson AM 1997. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. *Parasitology Today* 13: 393-397.

Jokelainen P, Nareaho A, Knaapi S, Oksanen A, Rikula U, Sukura A 2010. *Toxoplasma gondii* in wild cervids and sheep in Finland: North-south gradient in seroprevalence. *Veterinary Parasitology* 171: 331-336.

Kamani J, Mani AU, Egwu GO 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep and goats in Borno state, Nigeria. *Tropical Animal Health and Production* 42: 793-797.

Kaneto CN, Costa AJ, Paulillo AC, Moraes FR, Murakami TO, Meirelles MV 1997. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Veterinary Parasitology* 69: 203-210.

Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD 2011. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International Journal for Parasitology* 41: 645-65.

Klun I, Djurkovic-djakovic O, Katic-radivojevic S, Nikolic A 2006. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Veterinary Parasitology* 135: 121-131.

Klun I, Vujanic M, Year H, Nikolic A, Ivovic V, Bobic B, Bradonjic S, Dupouy-camet J, Djurkovic-djakovic O 2011. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Veterinary Research* 42: 1-6.

Langoni H, Greca H, Guimarães FF, Ullmann LS, Gaio FC, Uehara RS, Rosa EP, Amorim RM, Da silva RC 2011. Serological profile of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in commercial sheep from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 177: 50-54.

Larsson CE, Jamra LMF, Guimarães EC, Pattoli DBG, Silva HLL 1980. Prevalência de toxoplasmose ovina determinada pela reação de Sabin-Feldman em animais Uruguaias, RS, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 14: 582-588.

Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Valra

J, Wallace FG 1980. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology* 27: 37-58.

Liu Q, Ma R, Zhao Q, Shang L, Cai J, Wang X, Li J, Hu G, Jin H, Gao H 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Tibetan Sheep in Northwestern China. *Journal of Parasitology* 96: 1222-1223.

Lopes WD, Santos TR, Silva RS, Rossanese WM, Souza FA, Faria RJD, Mendonça RP, Soares VE, Costa AJ 2010. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. *Research in Veterinary Science* 88: 104-106.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193: 265-275.

Luciano DM, Menezes RC, Ferreira LC, Nicolau JL, Neves LB, Luciano RM, Dahroug MAA, Amendoeira MRR 2011. Soroepidemiologia da toxoplasmose em caprinos e ovinos de três municípios do Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31: 569-574.

Ludén A, Uggla A 1992. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International Journal of Food Microbiology* 15: 357-363.

Marca MC, Ramos JJ, Loste A, Sfez T, Sanz MC 1996. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. *Veterinary Parasitology* 67: 99-103.

Marques LC, Costa AJ 1985. Experimental sheep toxoplasmosis. I. Clinical, haematological and immunological observations. *ARS Veterinária* 1: 57-67.

Masala G, Porcu R, Madau L, Tanda A, Ibba B, Satta G, Tola S 2003. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by RIFI and PCR assays in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology* 117: 15-21.

Meireles LR 2001. *Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do estado de São Paulo*, PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, 141p.

Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363: 1965-1976.

Moraes EP, Costa MM, Dantas AF, Silva JC, Mota RA 2011. *Toxoplasma gondii* diagnosis in ovine aborted fetuses and stillborns in the State of Pernambuco, Brazil. *Veterinary Parasitology* 183: 1-2.

Moura L, Bahia-oliveira LM, Wada M, Jones JL 2006. Waterborne Toxoplasmosis in Brazil, from Field to Gene. *Emerging Infectious Diseases* 12: 326-329.

Mozzatto L, Procianoy RS 2003. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45: 147-151.

Nicolle MC, Manceaux L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma* N. Gen). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 1-3.

Oliveira LN, Costa Junior LM, Melo CF, Ramos Silva JC, Bevilaqua CML, Azevedo SS, Muradian V, Araújo DAFV, Dubey JP, Gennari SM 2009. *Toxoplasma gondii* Isolates From Free-Range Chickens From the Northeast Region of Brazil. *The Journal of Parasitology* 95: 235–237.

Owen MR, Trees AJ 1999. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. *The Journal of Parasitology* 85: 382-384.

Passos LN, Araújo filho OF, Andrade junior HF 2000. *Toxoplasma* Encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42: 141-145.

Pena HFJ 2004. *Isolamento e caracterização biológica e genotípica de Toxoplasma gondii (Nicolle & Manceaux, 1909) de gatos do estado de São Paulo*, PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, 126p.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey, JP, Su C 2008. Population structure and mouse-irulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology* 38: 561–569.

Pereira-Bueno J, Quintanilla-gozalo A, Pèrez-pèrez V, Álvarez-garcía G, Collantes-fernández E, Ortega-mora LM 2004. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology* 121: 33-43.

Pinheiro Jr JW, Mota RA, Oliveira AAF, Faria EB, Gondim LFP, Silva AV, Aires AG 2009. Prevalence and risk factors associated to infection by *Toxoplasma gondii* in ovine in the State of Alagoas, Brazil. *Parasitology Research* 105: 709–715.

Pita Gondim LF, Barbosa jr HV, Ribeiro filho CHA, Saeki H 1999. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State Brazil. *Veterinary Parasitology* 82: 273-276.

Ragozo AMA, Yai LEO, Oliveira LN, Dias RA, Dubey JP, Gennari SM 2008. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil. *Journal of Parasitology* 94: 1259–1263.

Ragozo AMA Yai LEO, Oliveira LN, Dias RA, Gonçalves HC, Azevedo SS, Dubey JP, Gennari SM 2009. Isolation of *Toxoplasma gondii* from Goats from Brazil. *Journal of Parasitology* 95: 323-326.

Ragozo AMA, Pena HFJ, Yai LEO, Su C, Gennari SM 2010. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. *Veterinary Parasitology* 170: 307-312.

Rossi GF, Cabral DD, Ribeiro DP, Pajuaba AC, Corrêa RR, Moreira RQ, Mineo TW, Mineo JR, Silva DA 2011. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. *Veterinary Parasitology* 175: 252-259.

Sanchez RM, Gordo RB, Asmador EA, Berrío LA 1994. Prevalência de infecção Toxoplásmica en gestantes de La Provincia La Habana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 36: 445-450.

Santos CBA, Carvalho ACFB, Ragozo AMA, Soares RM, Amaku M, Yai LEO, Dubey JP, Gennari SM 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from fattening pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 131: 207-211.

Santos FR, Pena SD, Epplen JT 1993. Genetic and population study of a T-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human Genetics* 90: 655-656.

Savio E, Nieto A 1995. Ovine toxoplasmosis: seroconversion during pregnancy and lamb birth rate in Uruguayan sheep flocks. *Veterinary Parasitology* 60: 241-247.

Sawadogo P, Mafio J, Belleste B, Sung RTM, Chakdi M, Flori P, Raberin H, Mamouni JB, Chait A, Dalal A 2005. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. *Veterinary Parasitology* 130: 89-92.

Sell M, Sander B, Klingerebiel R 2005. Ventriculitis and hydrocephalus as the primary manifestation of cerebral toxoplasmosis associated with AIDS. *Journal of Neurology* 252: 234-236.

Sibley LD, Khan ASIS, Ajioka JW, Rosenthal BM 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 364: 2749-2761.

Silva AV, Cutolo AA, Langoni H 2002. Comparação da reação de Imunofluorescência indireta e do método de aglutinação anti-*toxoplasma* em soros de ovinos, caprinos e felinos. *Arquivos do Instituto Biológico* 69: 7-11.

Silva AV, Cunha ELP, Meireles LR, Gottschalk S, Mota RA, Langoni H 2003. Sheep and goat toxoplasmosis: seroepidemiological study in two regions in the state of Pernambuco, Brazil. *Ciências Rural* 33: 115-119.

Silva AV, Mendonça AO, Bergamaschi S, Domingues PF, Langoni H 2005. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. *Parasitologia Latinoamericana* 60: 65-68.

- Silva RC, Langoni H, Su C, Silva AV 2011. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Veterinary Parasitology* 175: 173-177.
- Singh B 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology* 27: 1135-1145.
- Skjerve E, Waldeland H, Nesbakken T, Kapperud G 1998. Risk factors for the presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in Norwegian slaughter lambs. *Preventive Veterinary Medicine* 35: 219-227.
- Soares HS, Ahid SMM, Bezerra ACDS, Pena HFJ, Dias RA, Gennari SM 2009. Prevalence of anti- *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in sheep from Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. *Veterinary Parasitology* 160: 211-214.
- Soares RM, Silveira LH, Silva AV, Ragozo A, Galli S, Lopes EG, Gennari SM, Pena HFJ 2011. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal área of Brazil. *Veterinary Parasitology* 178: 29-34.
- Soccol VT, Castro EA, Gazda TL, Garcia G, Richartz RRTB, Dittrich RL 2009. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em ovinos das áreas urbanas e periurbanas de Curitiba, Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 18: 69-70.
- Sorrentino AH 2005. HLA class II involvement in HIV- associated Toxoplasmic encephalitis development. *Clinical Immunology* 115: 133-137.
- Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, Costa JMC, Dardé ML, Thulliez P 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Veterinary Parasitology* 135: 133-136.
- Splendore A 2009. On a new protozoan parasite of rabbits. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:1-2.
- Su C, Zhang X, Dubey JP 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology* 36: 841–848.
- Su C, Dubey JP 2009. *Toxoplasma*. In *Molecular Detection of Foodborne Pathogens* (ed. Liu, D.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 741–753.
- Su C, Shwab EK.; Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* . 137: 1-11.
- Suaréz-aranda F, Galisteo jr. AJ, Hiramoto RM, Cardoso RPA, Meireles LR, Miguel O, Andrade jr. HF 2000. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru, *Veterinary Parasitology* 91: 23-32.

- Sukthana Y 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in Parasitology* 22: 137-142.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30: 1217-1258.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, Ayala FJ 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc National Academy of Sciences USA* 88: 5129-5133.
- Tibayrenc M, Ayala FJ 2002. The clonal theory of parasitic protozoa, 12 years on. *Trends in Parasitology* 18: 405-410.
- Ueno THE, Gonçalves VSP, Heinemann MB, Dilli TL, Dilli B, Akimoto BM, Souza SLP., Gennari SM, Soares RM 2009. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Federal District, central region of Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 41: 547-552.
- Urquhart GM 1998. *Parasitologia Veterinária*. 2 nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 273pp.
- Van der Puije WNA, Bosompem KM, Canacoo EA, Wastling JM, Akanmori BD 2000. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian sheep and goats. *Acta Tropica* 76: 21-26.
- Venkatesa P, Wakelin D 1993. Elisias for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAS. *Parasitology Today* 9: 228-232.
- Vesco G, Buffolano WLA, Chiusa L, Mancuso G, Caracappa S, Chianca A, Villari S, Currò V, Liga F, Petersen E 2007. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Veterinary Parasitology* 146: 3-8.
- Villena I, Durand B, Aubert D, Blaga R, Geers R, Thomas M, Perret C, Alliot A, Escotte-Binet S, Thébault A, Boireau P, Halos L 2012. New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. *Veterinary Parasitology* 183: 203–208.
- Vitor RWA, Lima JD, Tafuri WL, Fernandes MA, Bahia M, Chiari CA 1992. Toxoplasmose experimental em cabras gestantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 44: 501–512.
- Weigel RM, Dubey JP, Dyer D, Siegel AM 1999. Risk factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Illinois. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 60: 793-798.
- Wendte JM, Gibson AK, Grigg ME 2011. Population genetics of *Toxoplasma gondii*: New perspectives from parasite genotypes in wildlife. *Veterinary Parasitology* 182: 96–111.

Wingstrand A, Lind P, Henriksen SA, Bille-hansen V, Sorensen V 1997. Experimental infection of pigs with *Toxoplasma gondii*. II. Clinical observations, pathology, bioassay in mice and serological response at slaughter. *Veterinary Parasitology* 72: 129–140.

Yai LEO, Ragozo AMA, Soares RM, Pena HFJ, Su C, Gennari SM 2009. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Veterinary Parasitology* 162: 332-337.

Zhou P, Zhang H, Lin R-Q, Zhang DL, Song H-Q, Su C, Zhu X-Q 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitology International* 58: 193-195.

Zhu J, Yin J, Xiao Y, Jiang N, Ankarlev J, Lindh J, Chen QA 2008. Seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. *Veterinary Parasitology* 158: 360–363.

ANEXOS

ANEXO 1 – Questionário de rebanho – Projeto Toxoplasmose

Data: ____/____/____

FICHA Nº _____

1- IDENTIFICAÇÃO

Nome do proprietário: _____

Nome da fazenda: _____

Município: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Nome do(s) manejador(es): _____

2- REBANHO:

2.1. Objetivo da exploração:

1- () Carne 2- () Leite 3- () Pele 4- () Mista 9- () NR (não respondeu)

2.2. Tipo de exploração:

1- () Intensiva 2- () Semi-intensiva 3- () Extensiva. 9- () NR

2.3. Os ovinos são criados em consórcios com outros animais:

1- () Sim 2- () Não 9- () NR

3- FAZENDA

3.1. Fonte d`água:

1- () Açude, 2- () Poço profundo, 3- () Cacimba, 4- () Caçimbão, 5- () Lagoa,
6- () Cisterna, 7- () Poço artesiano 8- () Outra 9 () NR

3.2. Tipo do terreno:

1- () Plano 2- () Alagado 3- () Acidentado 9- () NR

3.3. Apriscos:

3.3.1. Tipo de aprisco: () Suspenso; () Térreo

3.3.2. Tipo de piso do aprisco:

1- () Chão batido; 2- () Ripado; 3- () Cimentado; 4- () Misto; 5- () Outros; 9- () NR

3.4. A água é oferecida aos ovinos em :

1- () Vasilhames dentro das instalações, 2- () Vasilhames fora das instalações, 3- () Os ovinos bebem direto da fonte- Açude, poço, cacimba, etc., 9- () NR

3.4.1. No caso de animais utilizando bebedouro qual o tipo:

1- () Cimento; 2- () Madeira; 3- () Pneu; 4- () Ausente; 5- () Misto; 6- () Outros; 9- () NR

3.5. A comida é oferecida aos ovinos em:

1- () Vasilhas dentro das instalações, 2- () Vasilhames fora das instalações, ; 3- () Não é oferecida comida (criados em regime extensivo de livre pastoreio), 9- () NR

3.5.1. Tipo de Comedouros:

1- () Cimento; 2- () Madeira; 3- () Pneu; 4- () Ausente; 5- () Misto; 6- () Outros; 9- () NR

3.6. Limpeza dos apriscos

3.6.1 Material utilizado na limpeza: _____

3.7. Acompanhamento técnico:

3.7.1: Quem faz o acompanhamento técnico _____

4- Enfermidades possivelmente associadas a toxoplasmose :

4.1. Mal formação fetal nos últimos 12 meses: 1- Sim() 2- Não () 9- () NR

4.2. Aborto nos últimos 12 meses: Sim() Não () 9- () NR

5- Dados referentes a Felinos na propriedade

5.1. Existem gatos domésticos na propriedade ? _____

5.2. Na propriedade existe alguma instalação utilizada para estocar alimentos destinados a suplementação de ovinos?

1- Sim () 2- Não () 9- () NR

5.3. Gatos (domésticos ou selvagens) têm acesso a estas instalações?

1- Sim () 2- Não () 3- Às vezes () 9- () NR

5.4 Os gatos (domésticos ou selvagens) têm acesso a água oferecida aos ovinos:

1- Sim () 2- Não () 3- Às vezes () 9- () NR

ANEXO 3 – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 128/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Obtenção e caracterização de novos isolados de toxoplasma gondii**", que tem como responsável(is) **Ricardo Wagner de Almeida Vitor**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **25/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 128/2010**, related to the project entitled "**Characterization of new strains of toxoplasma gondii**", under the supervisors of **Ricardo Wagner de Almeida Vitor**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 25, 2010**.

This certificate expires in **August 25, 2015**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

ANEXO 4 – PCR-RFLP

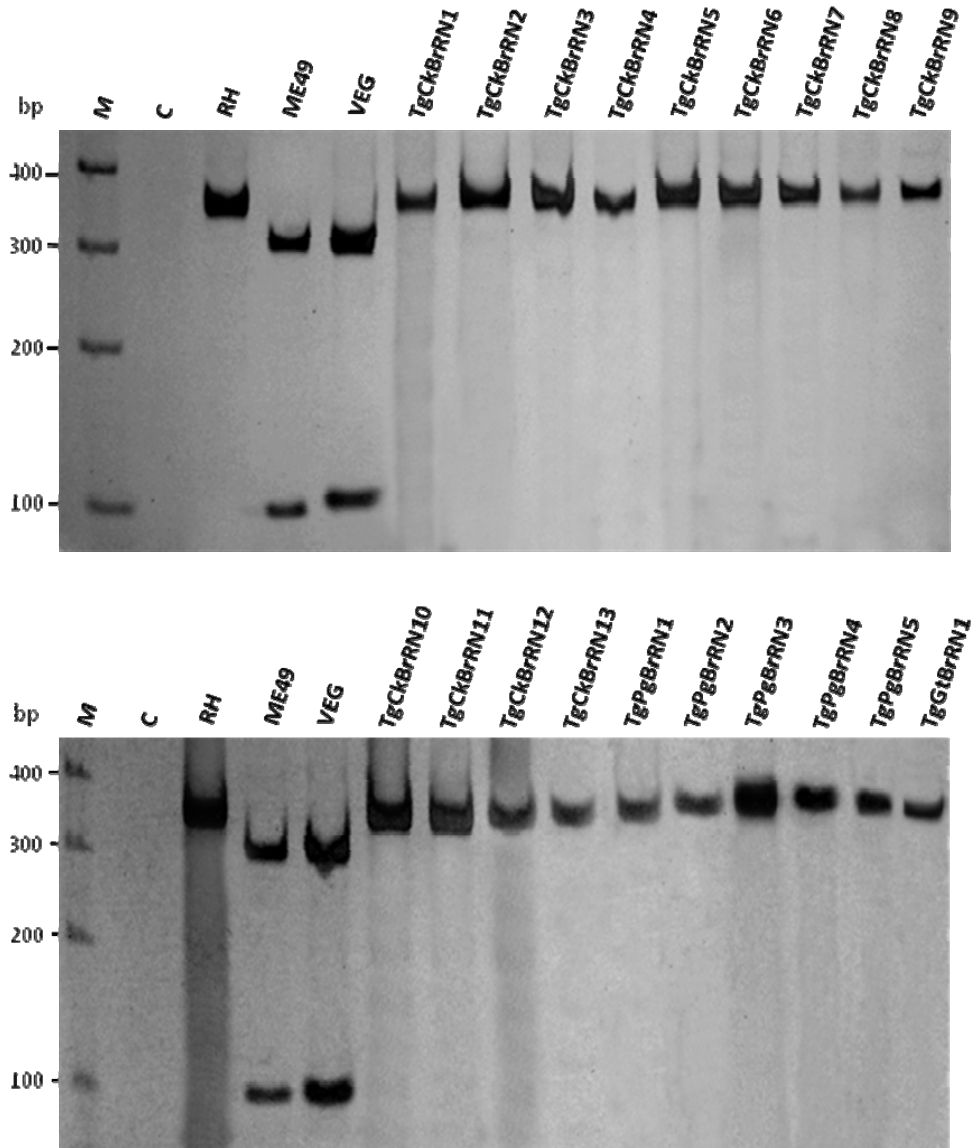


Figura 1. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG1 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene SAG1 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição Sau96I+HaeII . Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

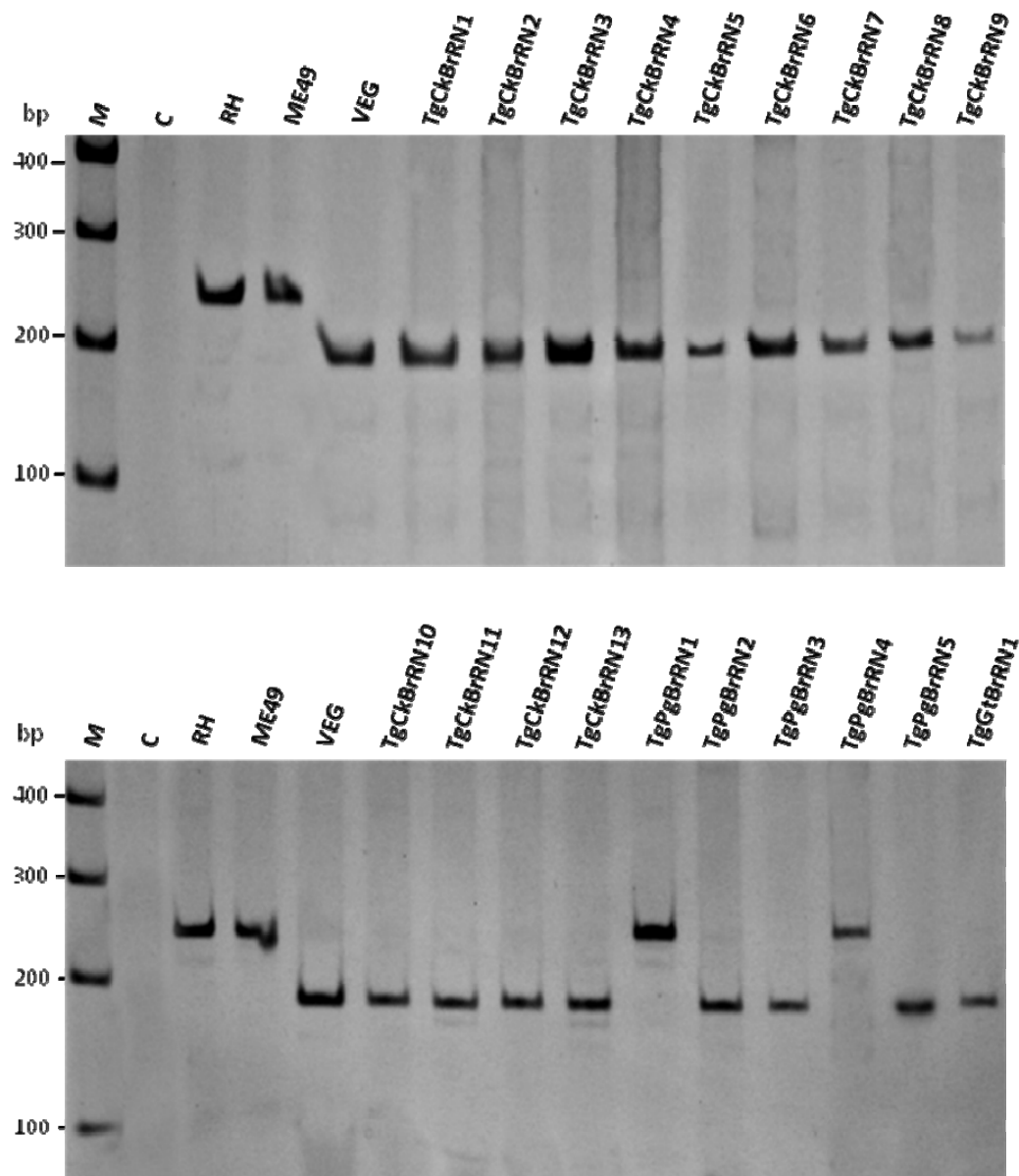


Figura 2. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus 5'SAG2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene 5'SAG2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição MboI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

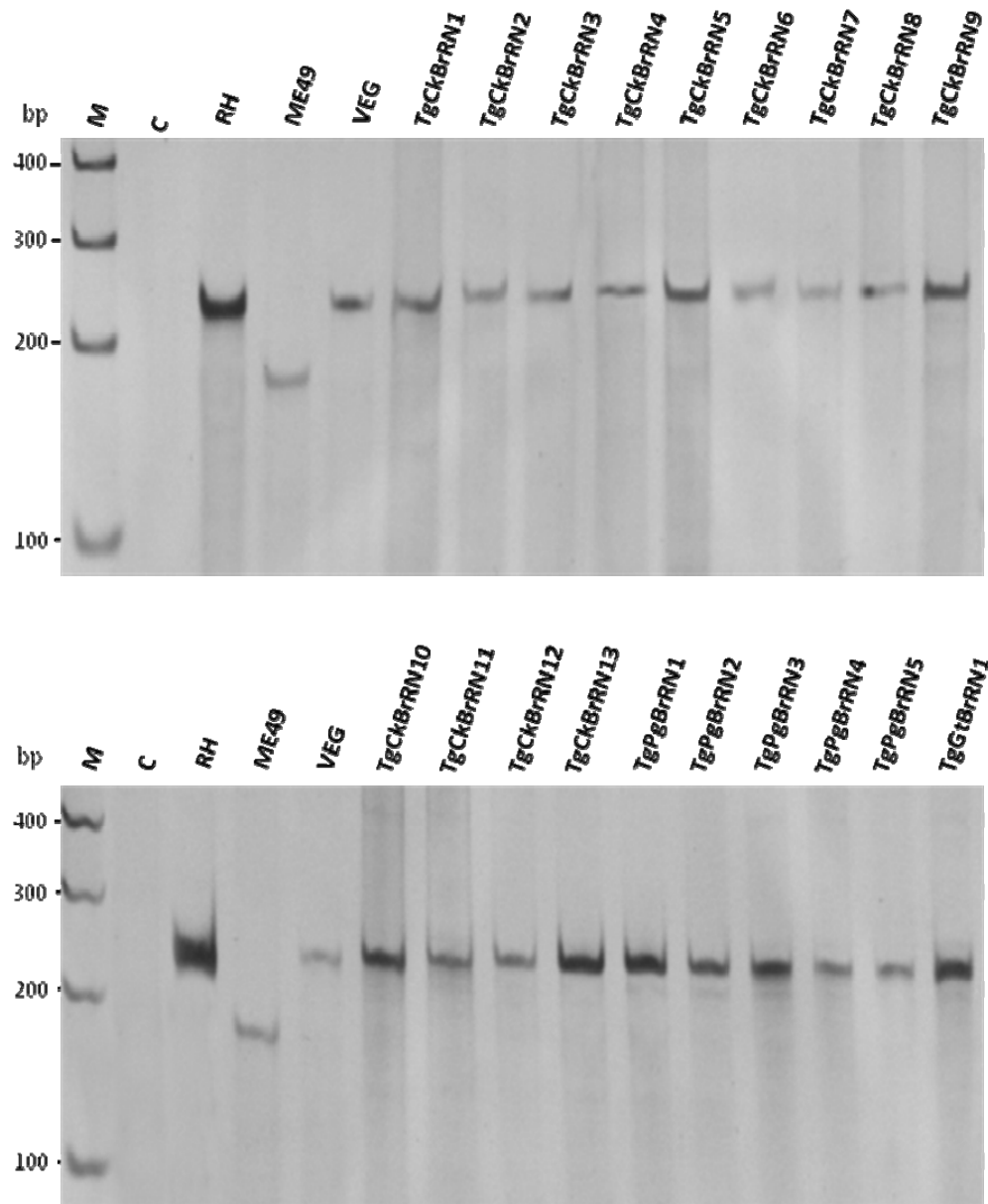


Figura 3. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus 3'SAG2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene 3'SAG2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonucleases de restrição HhaI . Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

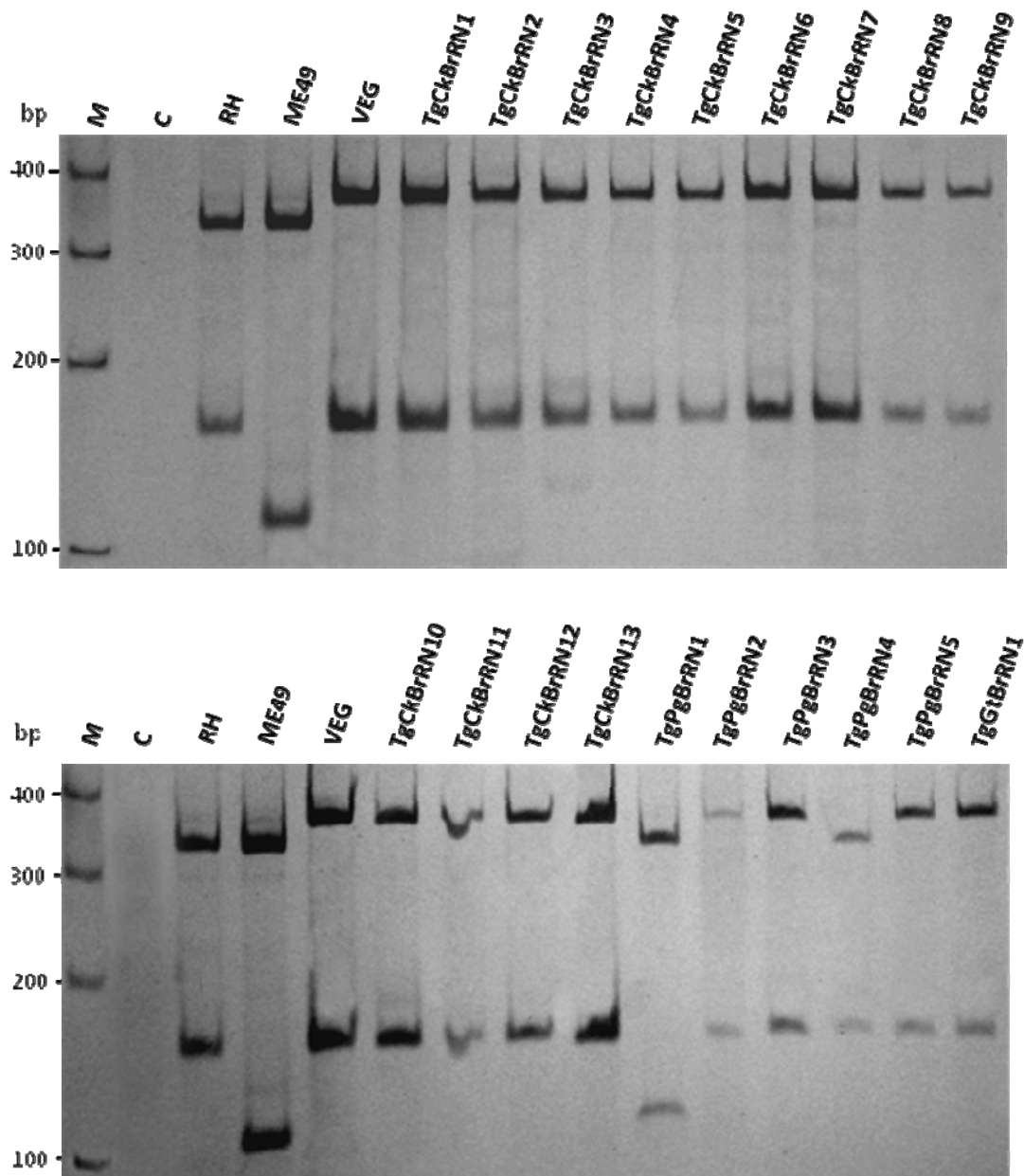


Figura 4. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG2 NEW de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene SAG2 NEW foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HinfI+TaqI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

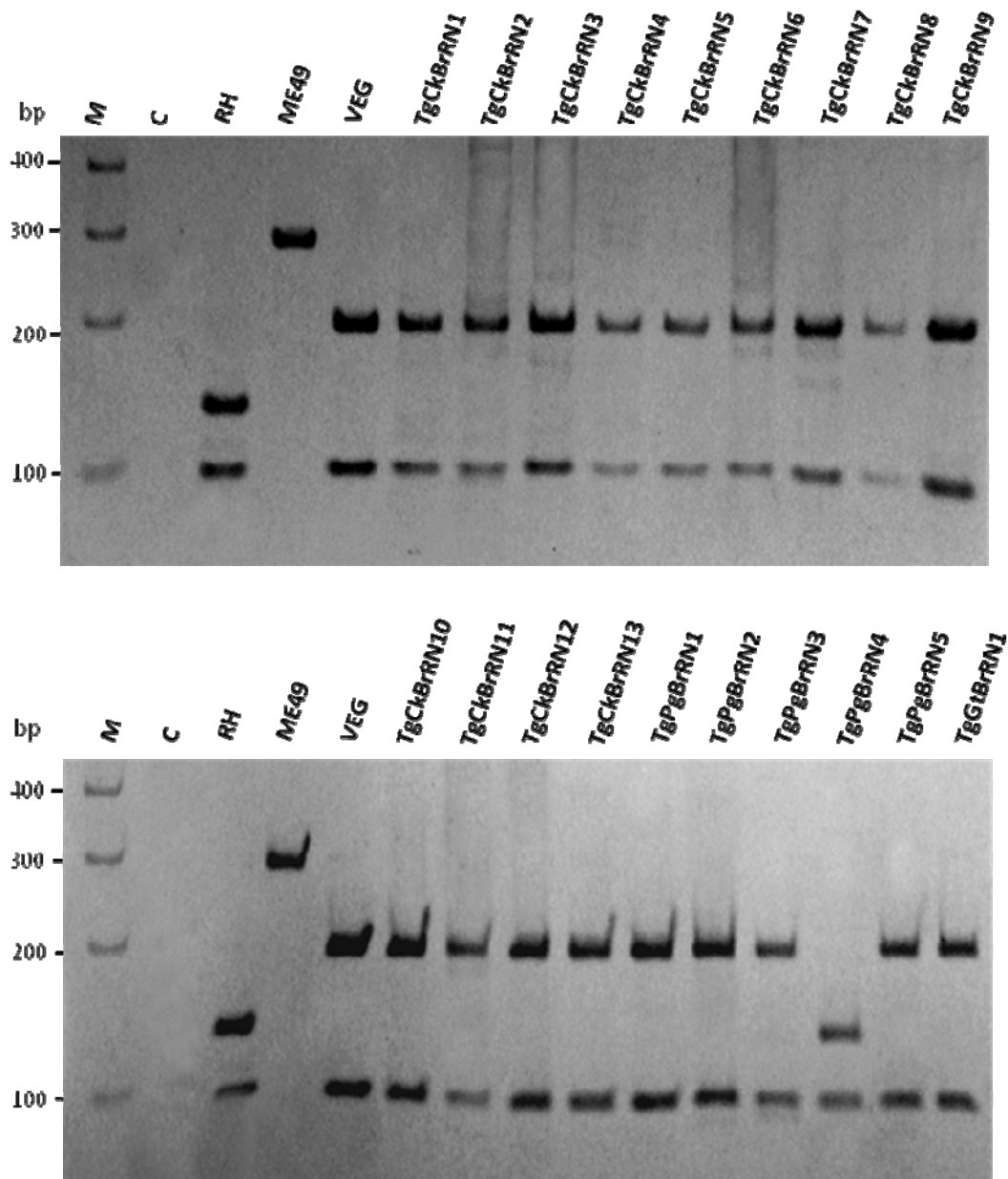


Figura 5. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus SAG3 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene SAG3 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição Nci I. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

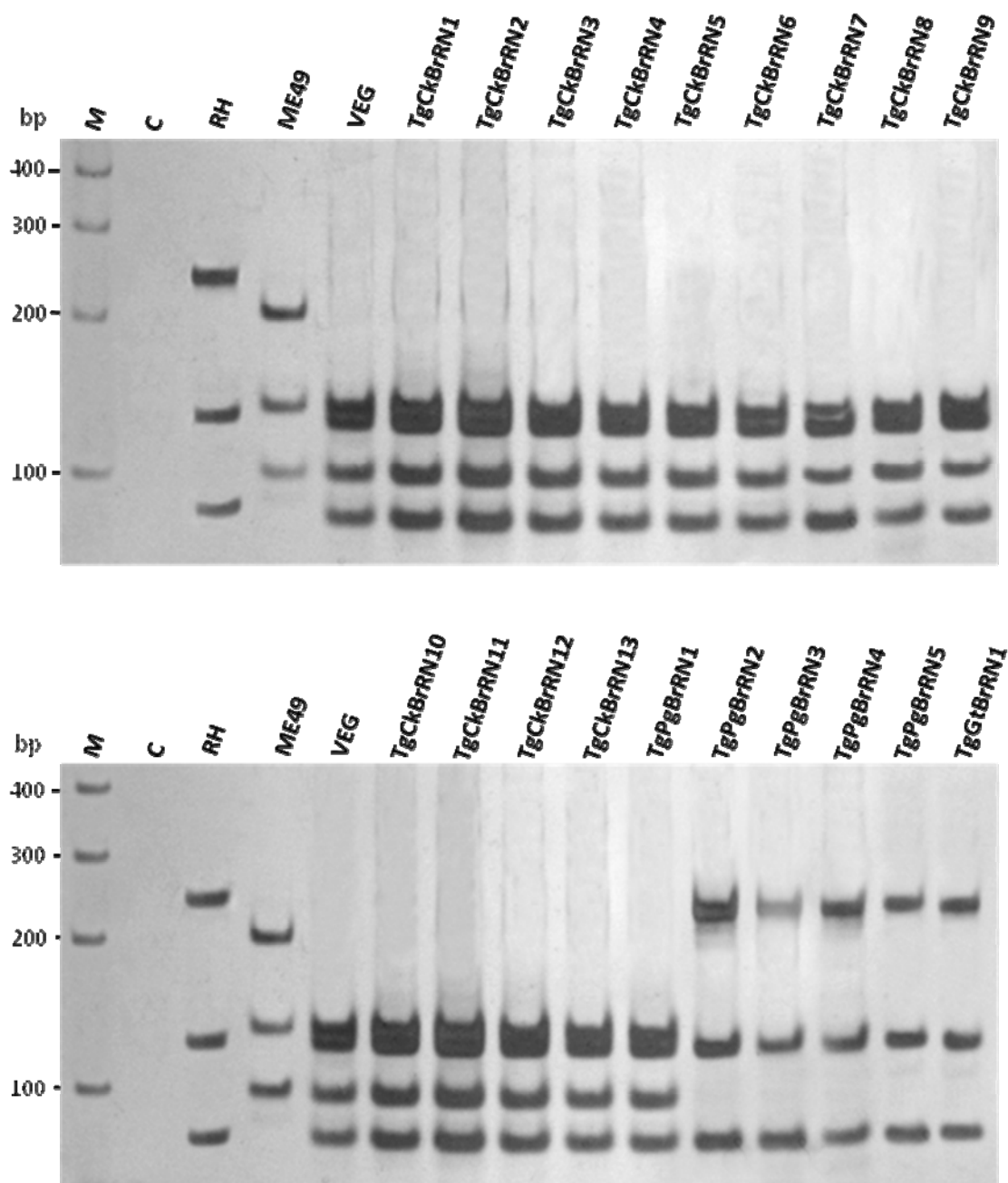


Figura 6. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus BTUB de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene BTUB foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com endonucleases de restrição BsiEI + TaqI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

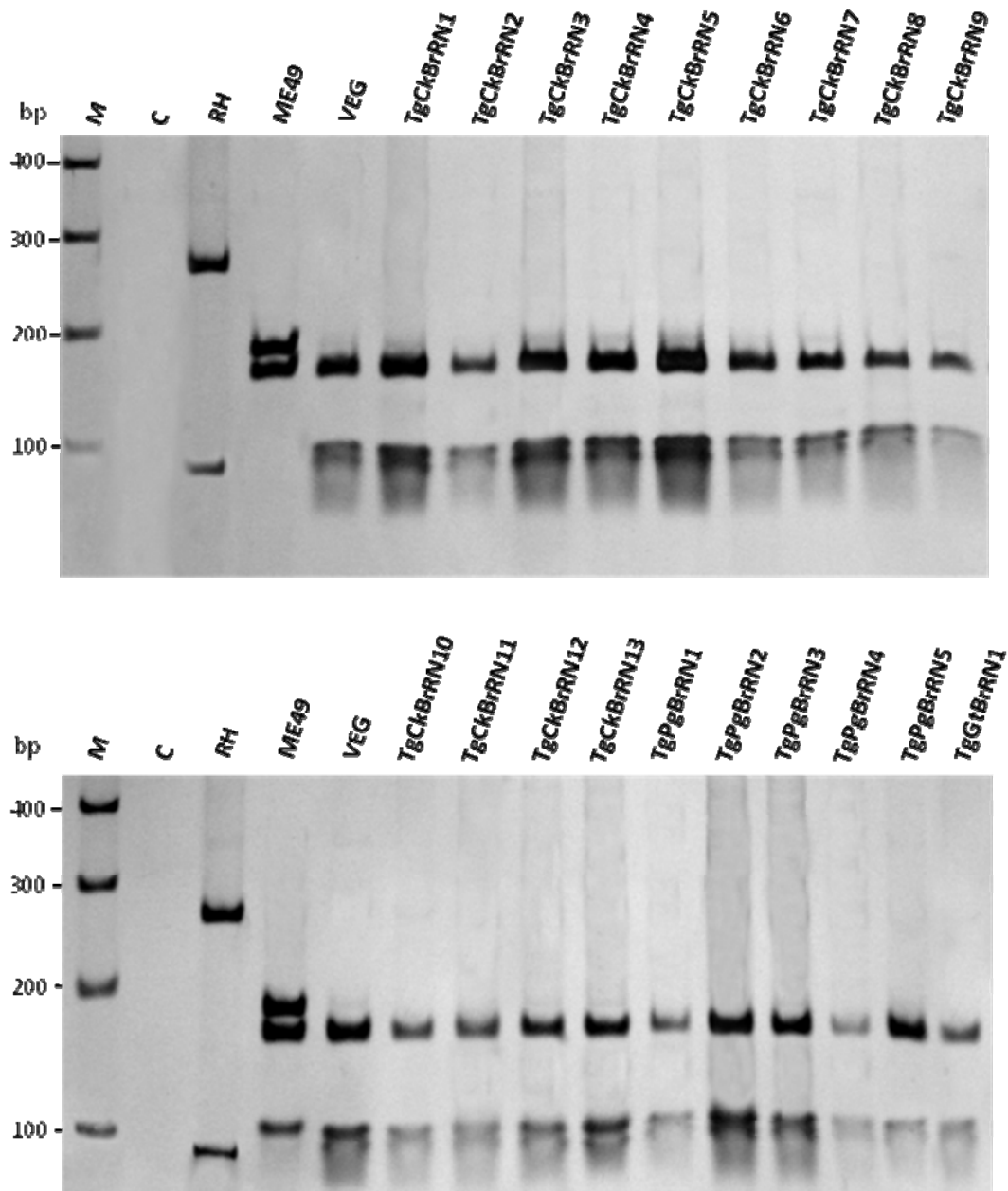


Figura 7. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus GRA6 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene GRA6 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com a endonuclease de restrição MseI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

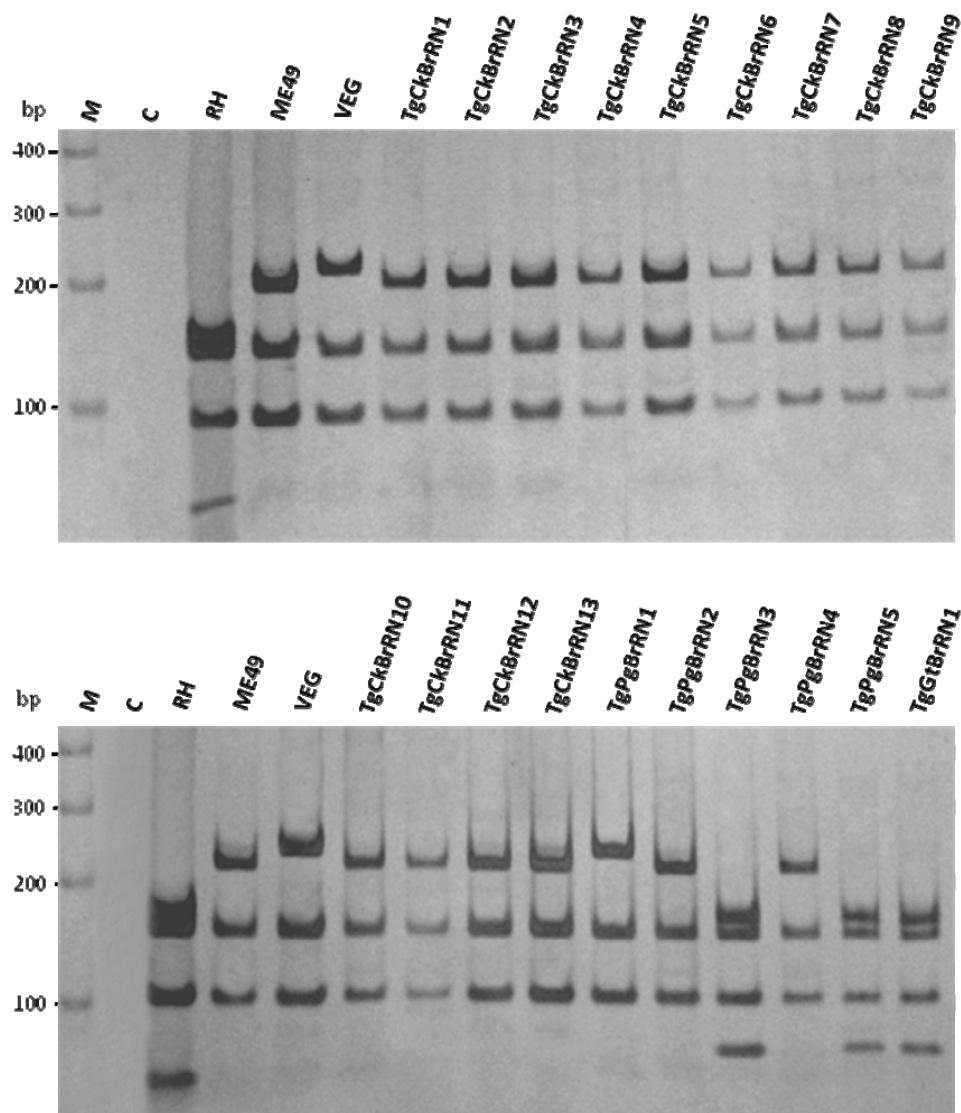


Figura 8. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus c22-8 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene c22-8 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição BsmAI+MboII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

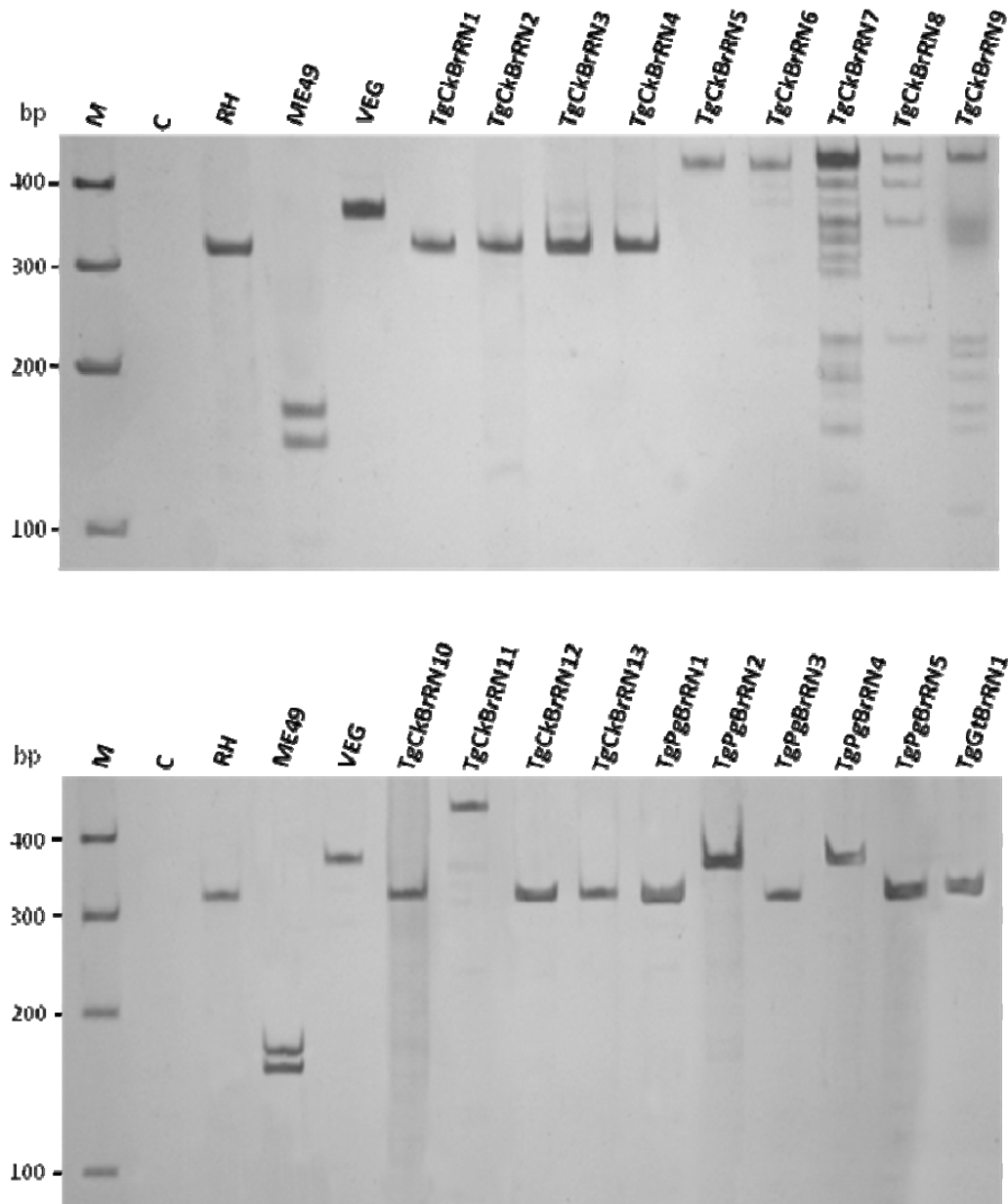


Figura 9. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus c29-2 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene c29-2 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HpyCH4IV+RsaI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliácridamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

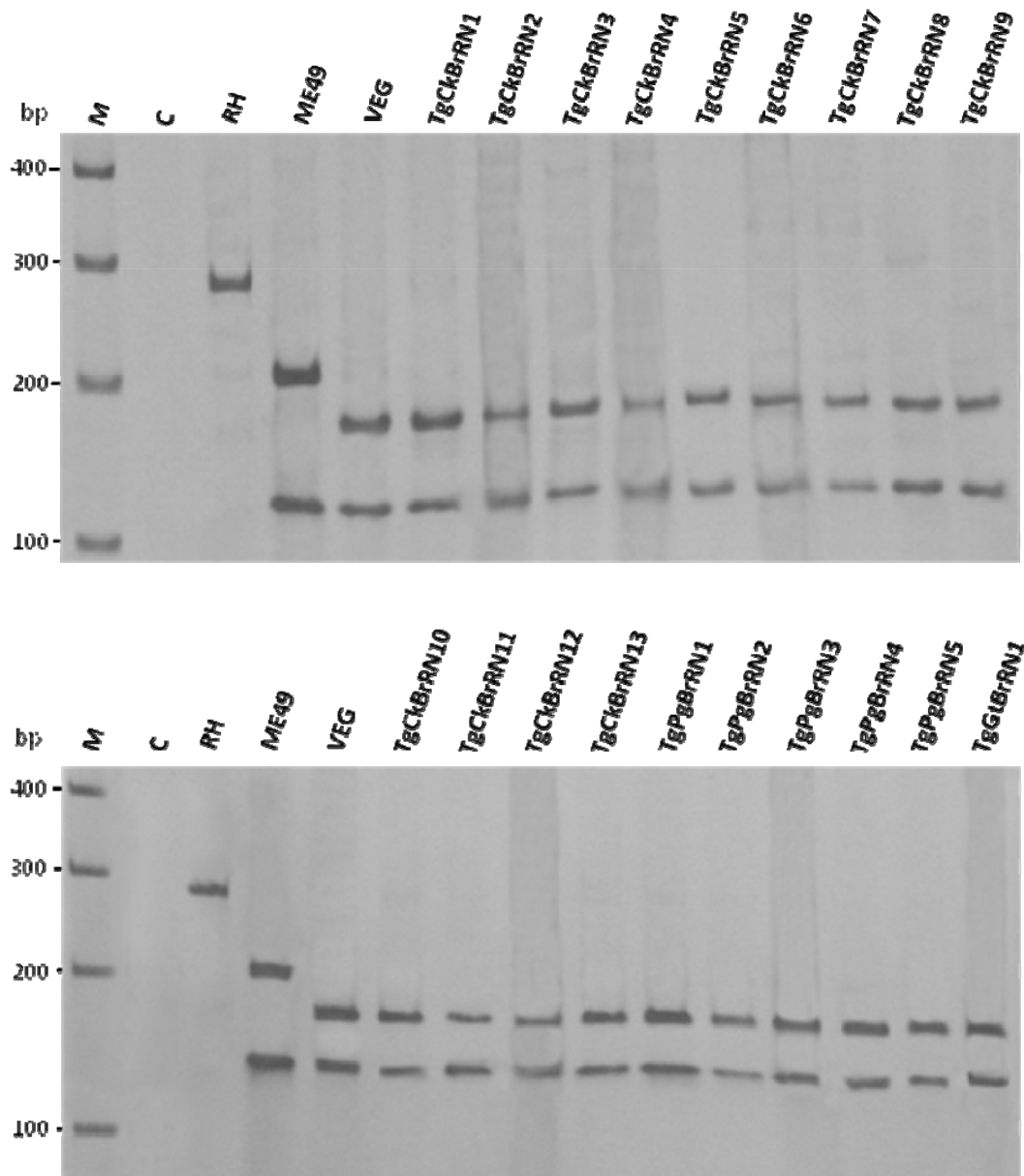


Figura 10. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus L358 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene L358 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição HaeIII+NlaIII. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

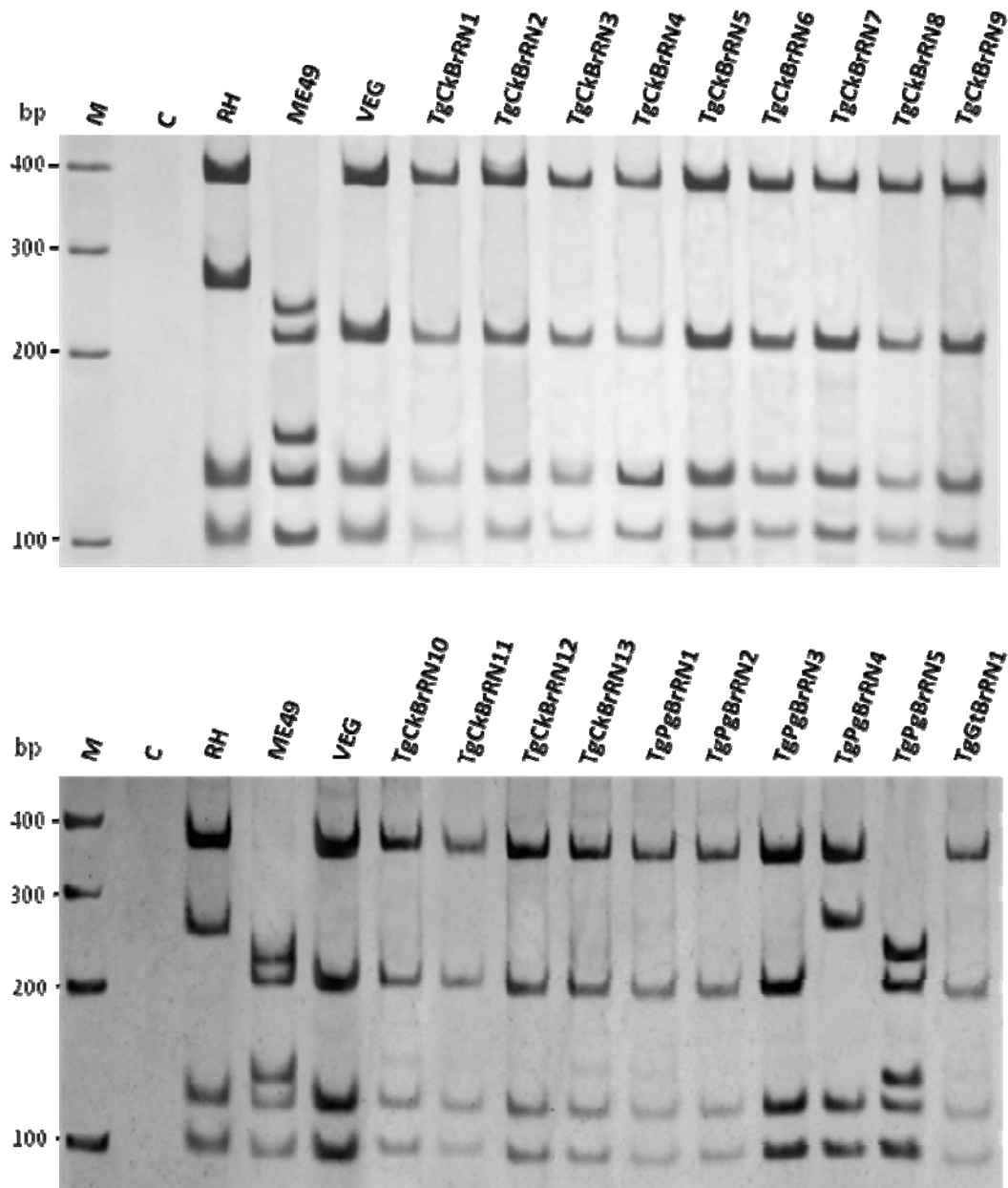


Figura 11. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus PK1 de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene PK1 foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição AvaI+RsaI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.

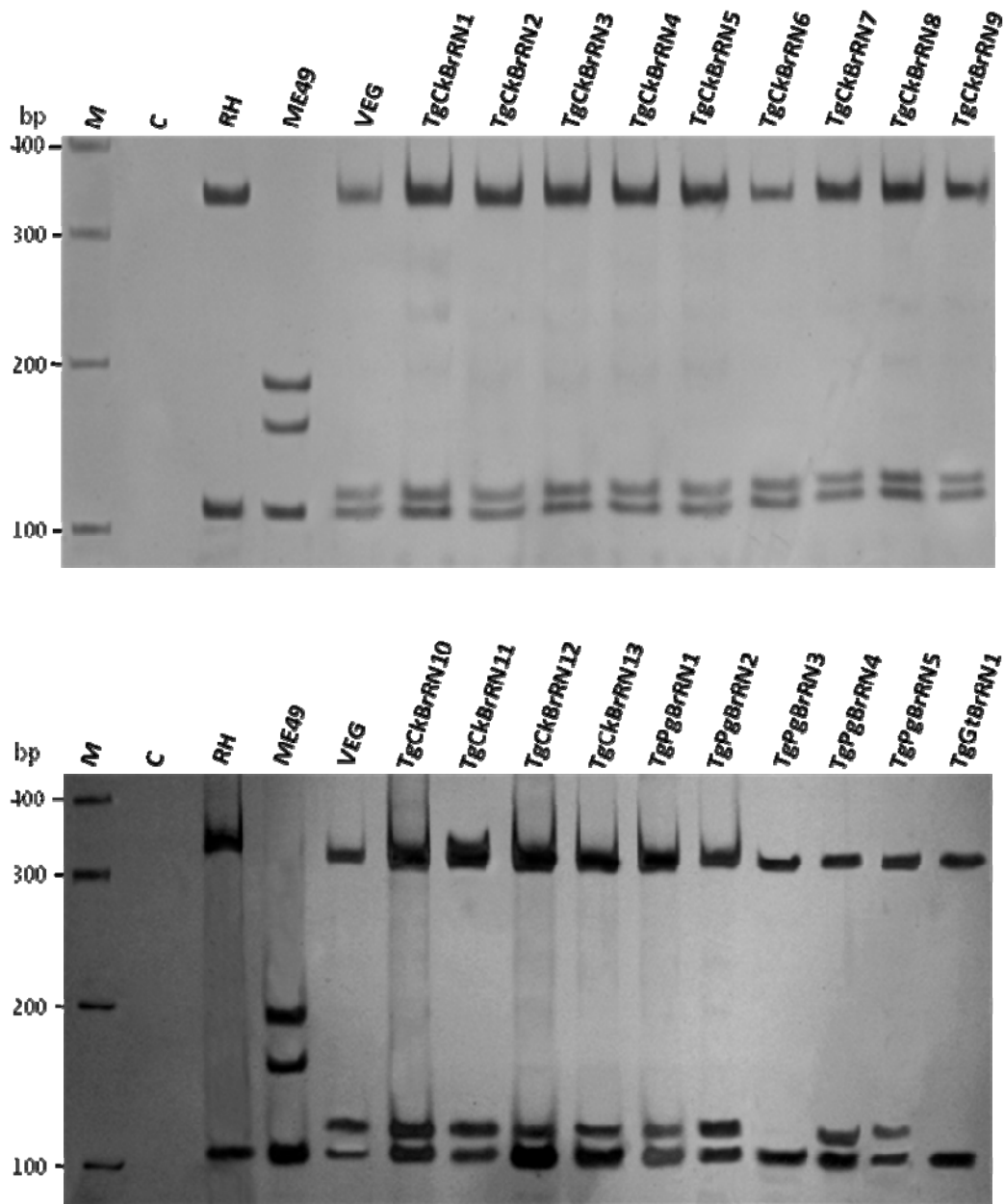


Figura 12. Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) do locus Apico de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Rio Grande do Norte, Brasil. O gene Apico foi amplificado a partir do DNA genômico de cada isolado e digerido com as endonucleases de restrição AfIII+DdeI. Os fragmentos foram revelados em gel de poliacrilamida 5%. As amostras RH (Tipo I), ME49 (Tipo II) e VEG (Tipo III) foram utilizadas como referência. M = peso molecular (Promega 100pb), C = controle negativo, sem DNA.