

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS E CARACTERIZAÇÃO  
GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* EM  
POMBOS (*Zenaida auriculata*) DE VIDA LIVRE  
CAPTURADOS EM LONDRINA, PARANÁ**

**Luiz Daniel de Barros**  
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Março de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS E CARACTERIZAÇÃO  
GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* EM  
POMBOS (*Zenaida auriculata*) DE VIDA LIVRE  
CAPTURADOS EM LONDRINA, PARANÁ**

**Luiz Daniel de Barros**

**Orientador: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**

**Co-orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012

Barros, Luiz Daniel de  
B277o Ocorrência de anticorpos e caracterização genotípica de isolados de *Toxoplasma gondii* em pombos (*Zenaida auriculata*) de vida livre capturados em Londrina, Paraná / Luiz Daniel de Barros. -- Jaboticabal, 2012  
x, 51 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientadora: Rosângela Zacarias Machado  
Banca examinadora: Aramis Augusto Pinto, Odilon Vidotto  
Bibliografia

1. *Toxoplasma gondii*. 2. *Zenaida auriculata*. 3. Genótipos. 4. PCR-RFLP. 5. Pombos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.6

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Luiz Daniel de Barros** – filho de Luiz Carlos de Barros e Marisa Sávio de Barros, nasceu em Ibitinga, interior de São Paulo no dia 23 de dezembro de 1985. Em março de 2005, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina. Durante o curso de graduação, no período de 2008 a 2009, foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPQ atuando no projeto de pesquisa “Avaliação da proteção contra a transmissão congênita do *Toxoplasma gondii* em camundongas vacinadas pela via nasal com proteínas recombinantes” sob orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia. Em novembro de 2009 obteve o grau de Médico Veterinário e em março de 2010, foi selecionado para o Programa de Pós-Graduação desta Universidade, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, sob a orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado e co-orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia.

**“O sucesso nasce do querer, da determinação e da  
persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e  
vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”  
(José de Alencar)**

**À minha família, por sempre me incentivar em  
alcançar os objetivos da minha vida**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar presente em minha vida, guiando os caminhos a serem seguidos.

A Professora Dra. Rosangela Zacarias Machado, pela orientação, amizade, disposição e atenção durante o mestrado.

Ao Professor Dr. João Luis Garcia, pela co-orientação, confiança, constante ajuda e especial amizade durante todo o tempo, desde os tempos de graduação.

Aos Professores Dr. Aramis Augusto Pinto e Dra. Karin Werther pelas contribuições na qualificação.

Aos Professores Dr. Italmir Teodorico Navarro e Dra. Roberta Lemos Freire pelas contribuições no projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Odilon Vidotto, pela presença na banca da defesa e participação no projeto de pesquisa

Aos meus pais, Luiz Carlos de Barros e Marisa Sávio de Barros, exemplos maiores da minha vida, por todo amor, carinho e incentivo, apesar da distância.

Aos meus irmãos, Ana Márcia de Barros, Luiz Guilherme de Barros e Luiz Miguel de Barros, pelo fato de estarem presentes em minha vida.

Aos meus grandes amigos, Breno Luiz Ottoni e Evandro Paschoalino, pela amizade, convívio, conselhos, risadas, durante longos anos.

A amiga e companheira de projeto Alessandra Taroda, pela ajuda e convívio nos trabalhos com os pombos.

Aos meus amigos Dauton Luiz Zulpo, Eidi Yoshihara, Fernanda Evers e Sthefany Pagliari, pela amizade e ajuda nos momentos que sempre precisei.

Aos amigos Ivo Alexandre Leme da Cunha e Alexey Leon Bogado, pela amizade e pelos ensinamentos no laboratório.

Aos residentes e amigos Sérgio Tosi Cardim, Jonatas Campos de Almeida e Victor Tabacow pela ajuda e especial amizade.

As técnicas de laboratório Beatriz Nino e Elizabete Marana pela ajuda em várias etapas do projeto

A todos os estagiários que participaram do projeto, especialmente Ana Sue Sammi, Igor Perecin, Jaqueline Figueiredo, João Pedro Sasse, Joeleni Rosa, Lucas Lincoln, Maíra Santos, Milaine Dantas, Nelson dos Santos, pela ajuda em todas as etapas de execução do projeto

A amiga Mayra Araguaia, pela ajuda durante todo o curso de pós-graduação.

Ao amigo Rodrigo Giglioti, pela amizade e ajuda com as análises estatísticas.

Aos amigos de Pós-graduação Willian Marinho Dourado Coelho, Ives Charlie, Gustavo Felipelli, Keyla Carstens, Márcia Jusi pela amizade e convívio durante as aulas.

A secretária do CBPV, Rafaela Beraldo, pela ajuda com algumas papeladas.

Aos animais utilizados no projeto, sem os quais não seria possível.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa de pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, pois sem a ajuda de vocês este não teria acontecido.



## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>SUMMARY</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> em pombos.....	09
2.2 Caracterização genotípica de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	13
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 Animais .....	18
4.2 Amostras de <i>T. gondii</i> .....	18
4.3 Colheita de sangue e tecido.....	19
4.4 Bioensaio em camundongos.....	19
4.5 Sorologia dos pombos e camundongos.....	20
4.6 Extração de DNA.....	21
4.7 PCR-RFLP.....	21
4.8 Estatística .....	24
<b>5. RESULTADOS</b> .....	25
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	36
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	37

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> - Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> de tecidos de pombos de vida livre.....	11
<b>Tabela 2</b> - Soro-ocorrência de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> de pombos livre.....	12
<b>Tabela 3</b> – Primes para PCR-RFLP multiplex multilocus nested (Mn-PCR-RFLP).....	23
<b>Tabela 4</b> – Resultado da análise sorológica pelo Teste de Aglutinação Modificada (MAT) de pombos ( <i>Zenaida auriculata</i> ) capturados em Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.....	25
<b>Tabela 5</b> - Soro-ocorrência de anticorpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> em pombos ( <i>Zenaida auriculata</i> ) segundo os locais de captura, Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho 2011.....	26
<b>Tabela 6</b> - Resultado do bioensaio em camundongos e o respectivo título sorológico pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT) capturados em Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.....	27
<b>Tabela 7</b> - Caracterização genotípica de isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> obtidos de pombos ( <i>Zenaida auriculata</i> ) capturados em Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.....	28

**OCORRÊNCIA DE ANTICORPOS E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE  
ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* EM POMBOS (*Zenaida auriculata*) DE VIDA  
LIVRE CAPTURADOS EM LONDRINA, PARANÁ**

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivos determinar a sorocorrência de anticorpos, isolar e caracterizar geneticamente *T. gondii* de pombos *Zenaida auriculata* de vida livre do município de Londrina, Paraná. Foram capturados 206 pombos da espécie *Z. auriculata* utilizando armadilhas tipo arapuca, em três regiões do município de Londrina, dentre elas o câmpus universitário, zona urbana e rural. Após a eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, realizou-se a punção cardíaca de cada animal para a colheita de sangue e obtenção de soro para a pesquisa de IgG anti-*T. gondii* pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT). Em seguida foi realizada a necropsia para a colheita de tecidos (pulmão, coração, fígado, cérebro e músculo peitoral) para o isolamento do agente por meio do bioensaio em camundongos. Os isolados obtidos foram caracterizados por meio da PCR-RFLP utilizando 12 marcadores genéticos. Os resultados foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presentes no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). No MAT, 22,3% (46/206) das amostras foram consideradas soropositivas, com títulos variando de 16 até 4096. A sorocorrência de acordo com a região de captura foi de 56%, 12,1% e 6,2% para câmpus universitário, zona urbana e zona rural respectivamente (p<0,05). Doze (5,8%) animais foram positivos no bioensaio, obtendo-se os isolados Pb01, Pb06, Pb12, Pb13, Pb14, Pb36, Pb150, Pb153, Pb155, Pb164, Pb185 e Pb200. A análise genotípica revelou a presença de sete genótipos, quatro dos quais se classificam como genótipos #1, #6, #17 e #65 do ToxoDB e três não descritos anteriormente. O trabalho é o primeiro relato na literatura de isolamento do parasita em pombos *Z. auriculata*, além disso, foi observado o tipo clonal II, genótipo raro no Brasil, confirmando a diversidade genética dos isolados de *T. gondii* no Brasil.

**Palavras-chave:** genótipos, pombos, PCR-RFLP, sorocorrência, *Toxoplasma gondii*, *Zenaida auriculata*

**OCCURRENCE OF ANTIBODIES AND CHARACTERIZATION GENOTYPE OF ISOLATES OF *Toxoplasma gondii* IN PIGEONS (*Zenaida auriculata*) FREE LIVE CAPTURED IN LONDRINA, PARANÁ**

**SUMMARY** – This study aimed to evaluate the serum occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies, isolate and genetically characterize this parasite from 206 wildlife pigeons (*Zenaida auriculata*) trap captured in Londrina city, Paraná. The birds were captured in three regions of Londrina, among them college campus, the urban and rural area. After euthanasia by CO<sub>2</sub> chamber, the animals were bleeding by cardiac puncture, after what the serum was obtained. Lung, heart, liver, brain and pectoral muscle were collected from pigeons to performer mouse bioassay. Detection of IgG anti-*T. gondii* was performed by modified agglutination test (MAT). The isolates were molecularly characterized by PCR-RFLP using 12 genetic markers and the results were compared and ranked according the genotypes present in ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>). Through MAT, 22,3% (26/206) of samples were considered positive, with titers ranging from 16 to 4096. The infection rate according to the capture region was 56%, 12,1% and 6,2% for university campus, urban and rural areas respectively. Twelve (5,8%) animals were positive in the bioassay, obtaining the isolates Pb01, Pb06, Pb12, Pb13, Pb14, Pb36, Pb150, Pb153, Pb155, Pb164, Pb185 and Pb200. Genotypic analysis revealed the presence of seven different ones, genotypes #1, #6, #17 and #65, and three not previously described. This study is the first report of isolation of the parasite in pigeons *Z. auriculata*. Furthermore, was observed the clonal type II, genotype rare in Brazil, confirming the genetic diversity of isolates of *T. gondii* in Brazil.

**Keywords:** genotype, pigeons, PCR-RFLP, serum-occurrence, *Toxoplasma gondii*, *Zenaida auriculata*

## 1. INTRODUÇÃO

Pombos *Zenaida auriculata*, são aves da ordem Columbiformes e gênero *Zenaida* (DesMurus 1847). Ocorre desde as Antilhas até à Terra do Fogo, com distribuição descontinuada por todo o Brasil, inclusive a ilha de Fernando de Noronha (Fig. 1). No Brasil é conhecido em cada região por um nome vulgar, sendo amargosa no Sudeste, pararé no Centro-oeste, pomba de bando no Sul e arribaçã ou avoante no Nordeste (SOUZA et al., 2007). Possuem características que permitem sua identificação como tamanho intermediário (aproximadamente 21 cm), dorso pardo, manchas negras nas asas e principalmente duas listra negras laterais aos olhos (SICK, 1997).



**Figura 1.** Mapa de registro de ocorrência de pombos (*Zenaida auriculata*) de acordo com os biomas brasileiros. Fonte: Wikiaves.

São considerados animais sinantrópicos, ou seja, são aqueles animais que possuem uma relação de proximidade com o homem, onde em ambientes não similares ao seu de origem, como os grandes centros urbanos, possuem a capacidade de adaptação, sobrevivência e proliferação, podendo acarretar problemas de saúde pública e danos materiais ao ambiente público (COSTA, 2000).

Possuem hábitos alimentares diversificados, como resíduos alimentares produzidos pelo homem, sementes de plantas silvestres, frutas e grãos de interesse econômico, tais como trigo, milho e soja (RANVAUD et al., 2001). Ingerem os grãos inteiros e armazenam no papo, onde será realizada a digestão (SICK, 1997). Em países sul-americanos, como o Brasil, Colômbia, Uruguai e Argentina, essas aves são consideradas como pragas agrícolas, devido aos prejuízos econômicos (MURTON et al., 1974; RODRIGUES, 1983; DONATELLI, 2000). Esse problema se torna mais grave em cidades paranaenses, cujo estado é o maior produtor de trigo e milho e o segundo maior produtor de soja (IBGE, 2011). Além disto, a oferta de comida (arroz cru ou cozido, ração animal, migalhas de pão, restos de comida e lixo) nas grandes cidades é responsável pela explosão demográfica desses animais (PADORI, 2009). Em Londrina, o crescimento populacional descontrolado desta espécie tem despertado preocupação das autoridades relacionadas à transmissão de doenças à saúde animal e humana, devido ao fato de os pombos serem carreadores de estágios infectantes de patógenos, como histoplasmose, criptococose, clamidiose, salmonelose e toxoplasmose (SHIBATTA et al., 2009; PADORI, 2009). Além disso, suas fezes causam danos ambientais, como danificação de pinturas, superfícies metálicas e monumentos, entupimento de calhas e apodrecimento de forros. A proliferação de ratos, baratas e moscas nos locais de alimentação dos pombos também representa um problema (PADORI, 2009).

*Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular que infecta a maioria dos animais de sangue quente (DUBEY, BEATTIE, 1988). O gato doméstico e outros felídeos são os hospedeiros definitivos do parasita (FRENKEL, DUBEY, MILLER, 1970). Os animais e o homem se infectam geralmente pela ingestão de água ou comida contaminada com oocistos de *T. gondii* ou pelo consumo de carne crua ou mal-cozida contendo cistos de

*T. gondii* (DUBEY, BEATTIE, 1988). Em pombos, a infecção geralmente é subclínica, entretanto algumas espécies são mais susceptíveis á toxoplasmose clínica do que outras, sendo observado sinais clínicos de depressão, anorexia, edema, secreção ocular, convulsão e morte (DUBEY, 2002).

Aves servem como hospedeiros intermediários, pois são presas para os felinos, fornecendo assim estágios infectantes (RUIZ, FRENKEL, 1980). Além disso, as aves em geral são consideradas boas bioindicadores da contaminação ambiental, pois devido ao hábito de descerem ao solo e ciscarem para se alimentar, ficam expostos a diversos patógenos e substâncias químicas (NAGEL SMREKAR, HAAG-WACKERNAGEL, 2001). Sendo assim, os pombos podem atuar como bioindicadores da contaminação ambiental do *T. gondii*, pois as fezes dos gatos domésticos contendo oocistos do parasita contaminam o meio ambiente e quando esporulam tornam-se infectantes para várias espécies animais, inclusive os pombos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

*Toxoplasma gondii* foi descrito pela primeira vez em 1908 concomitantemente por SPLENDORE no Brasil, e por NICOLLE e MANCEAUX na Tunísia. No Instituto Biológico de São Paulo, no Brasil, SPLENDORE isolou o agente de um coelho de laboratório. No mesmo ano, no Instituto Pasteur de Tunis, na Tunísia, os pesquisadores franceses isolaram o parasita de um roedor africano da espécie *Ctenodactylus gundi*, entretanto o classificaram como *Leishmania gondii*. Porém, em 1909, baseado em estudo morfológicos, os pesquisadores franceses re-classificaram o parasita como *Toxoplasma gondii*, em referência ao formato do parasita, que do grego “toxon” significa arco.

Após a classificação do gênero *Toxoplasma*, vários pesquisadores isolaram o agente de diversos animais, classificando-o de acordo com a espécie hospedeira (*T. canis*, *T. gallinarum*, *T. avium*, *T. columbae*, entre outros). Entretanto, em 1939, SABIN trabalhando com camundongos concluiu que se tratava apenas de uma única espécie, o *T. gondii*.

O *T. gondii* é um protozoário coccídeo, parasita intracelular obrigatório e que infecta a maioria dos animais homeotérmicos, incluindo o homem, animais domésticos, silvestres e as aves (DUBEY, BEATTIE, 1988). Pertence ao Reino Protista, Sub-Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Sub-classe Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Sub-ordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Sub-família Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (LEVINE, 1985). É classificado como um parasita eurixeno, ou seja, possui uma ampla variedade de hospedeiros, com mais de 300 espécies de animais descritas como hospedeiro intermediário do *T. gondii*, entretanto, apenas membros da Família Felidae são hospedeiros definitivos do parasita (DUBEY, 1994a; DUBEY, 2004).

É uma importante zoonose de distribuição cosmopolita. Segundo TENTER, HECKEROTH e WEISS (2000) quase um terço da população humana já foi exposta ao parasita em alguma fase da vida. Em indivíduos saudáveis, a infecção geralmente é assintomática, principalmente devido à resposta imune celular, que controla a



multiplicação dos taquizoítos estabelecendo assim a infecção crônica, que leva à formação de cistos teciduais, que se mantem latentes e viáveis por longo período de tempo (YAP, SHER, 1999). Uma minoria de indivíduos saudáveis, quando infectados manifesta sintomas como mal-estar, febre, linfadenopatia, mialgia, encefalite e miocardite (MONTROYA, LIESENFELD, 2004; REMINGTON et al., 2006). Além disto, uma pequena porcentagem de indivíduos saudáveis desenvolve algum tipo de lesão ocular, principalmente retinocoroidite (HOLLAND, 2003).

Fatores como espécie, idade, *status* imunológico, sanitário e nutricional, fatores sócio-culturais, ambientais, alimentares, higiênicos e de costume da população de diferentes regiões, tipo de cepa, estágio do parasita e quantidade do inóculo, além de doenças concomitantes, podem predispor à infecção e manifestação dos sinais clínicos (KONISHI, TAKAHASHI, 1987; DUBEY, 1994a; LIESENFELD et al., 2001; DUBEY, JONES, 2008).

O primeiro caso de toxoplasmose humana provavelmente foi descrito por CASTELLANI em 1914, que observou o parasita em esfregaços de sangue e baço de um menino de 14 anos, que morreu com um quadro de febre, anemia e esplenomegalia. Em 1923, JANKÜ descreveu o primeiro caso de toxoplasmose congênita em uma criança falecida com 11 meses e que apresentava um quadro de micro-oftalmia e hidrocefalia. Em 1952, SABIN et al., estabeleceram a tetrade de Sabin atribuindo retinocoroidite, hidrocefalia, encefalite seguida de calcificação cerebral e distúrbios psicomotores aos sinais da toxoplasmose congênita.

A infecção nos animais resulta em alterações principalmente ligadas a reprodução, dentre as quais incluem morte e reabsorção embrionária, morte e mumificação fetal, aborto e morte neonatal (DUBEY, 2004). Já os gatos, raramente apresentam sinais clínicos, e quando apresentam são caracterizados por letargia, anorexia, dispneia, abaulamento abdominal, diarreia, vômito, febre e uveíte, (DUBEY, 1994b; VOLLAIRE, RADECKI, LAPPIN, 2005; DUBEY, LAPPIN, 2006).

O *T. gondii* possui um ciclo biológico heteroxênico facultativo, pois apresenta mais de um hospedeiro. Conforme descrito anteriormente, os gatos e todos os membros da Família Felidae são os únicos hospedeiros definitivos do parasita, pois é

nas células enteroepiteliais destes animais que ocorre a fase sexuada, conhecida como gametogonia (FRENKEL, DUBEY, MILLER, 1970). Já nos hospedeiros intermediários, ocorre à fase assexuada do parasita, em um ciclo extra-intestinal, conhecida como endodiogenia.

Existem três formas infectantes do parasita: os oocistos, contendo dois esporocistos com quatro esporozoítos cada; os taquizoítos, presentes nos vacúolos parasitóforos e fluidos corporais na fase aguda e os bradizoítos, dentro de cistos teciduais na fase crônica da infecção (DUBEY, BEATTIE, 1988; DUBEY, 2004). O taquizoíto é a forma parasitária que está presente na fase aguda da infecção e se multiplica rapidamente em qualquer célula nucleada, principalmente células epiteliais intestinais, células do parênquima de vários órgãos e o sistema mononuclear fagocitário. Possui um formato arqueado e com um tamanho de  $2\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$ , sendo constituído por um núcleo, diversas organelas, uma membrana plasmática externa e uma membrana interna descontínua e com várias fenestrações (DUBEY, 2004). Penetra nas células nucleadas por penetração ativa, formando um vacúolo parasitóforo que o protege do sistema imune do hospedeiro, multiplicando-se rapidamente por fissão binária até que ocorra a ruptura da célula e liberação dos taquizoítos (DUBEY, 2004). Após essa ruptura, os taquizoítos invadem novas células e o ciclo intracelular se repete (PETRAK, CARPENTER, 1965). Essa destruição celular é responsável pela manifestação dos sinais clínicos da infecção. Após determinado número de divisões, os taquizoítos se multiplicam de forma mais lenta e se acumulam nos tecidos em forma de cistos teciduais, sendo então denominados de bradizoítos. Esses cistos crescem e permanecem no interior da célula, variando de 5 a  $70\mu\text{m}$  de tamanho e com vários bradizoítos no interior (DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998). Os bradizoítos são discretamente diferentes dos taquizoítos, pois possuem um núcleo situado na região posterior e também são mais delgados e resistentes a enzimas proteolíticas do que os taquizoítos (DUBEY, 2004). Cistos teciduais são comumente encontrados em tecidos musculares e neurais, incluindo cérebro, olhos, musculatura esquelética e cardíaca, assim como em órgãos viscerais como pulmão, fígado e rim (DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998).

Os oocistos eliminados nas fezes não são infectantes, ou seja, não estão esporulados, e possuem uma morfologia de sub-esférico a esférico, com 10x12µm de diâmetro. A esporulação ocorre no ambiente em torno de 1 a 5 dias, dependendo de condições ótimas de temperatura e umidade (DUBEY, 2004). De acordo com LINDSAY, BLAGBURN e DUBEY (1997), as condições ótimas para esporulação são 65% de umidade relativa e 20°C de temperatura ambiente. Oocistos esporulados contêm dois esporocistos, sendo que cada esporocisto contêm quatro esporozoítos com 2x8µm de tamanho (DUBEY, LINDSAY, SPEER, 1998).

O hospedeiro intermediário pode adquirir *T. gondii* através da ingestão de cisto tecidual de animais infectados, comida ou água contaminada com oocistos esporulados ou por meio da infecção transplacentária (DUBEY, 2004). A ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos presentes na carne crua ou mal-cozida é a principal via de transmissão horizontal, sendo que a ingestão de carne e vísceras cruas ou presas (ratos, pombos entre outros) é a principal fonte de infecção para os gatos (DUBEY, 1994a; DUBEY, FRENKEL, 1998). A manipulação da carne crua durante o preparo também é uma importante via de transmissão para os humanos, pois há evidências de que o ato de mulheres grávidas experimentarem o tempero da carne enquanto preparam o alimento é um dos principais fatores de risco para a infecção durante a gestação (LIU et al., 2009).

Outra via de transmissão horizontal é a ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados (TENTER, HECKEROTH, WEISS, 2000). A infecção por meio da ingestão de oocistos esporulados resulta em um quadro mais severo do que a ingestão de cistos teciduais (HILL, DUBEY, 2002). É a forma de resistência, na qual o parasita pode permanecer viável no ambiente por até cinco anos, sendo resistente a maioria dos desinfetantes (DUBEY, 2009). Oocistos também podem ser espalhados por minhocas, moscas e baratas, contaminando diretamente os alimentos (CHINCHILLA et al., 1994).

A transmissão transplacentária ocorre quando durante a gestação, as fêmeas soronegativas adquirem a infecção (HILL, DUBEY, 2002). Após um período de parasitemia na mãe, os taquizoítos invadem a placenta e se difundem pelos tecidos do

feto, sendo que fêmeas com sorologia positiva antes da gravidez possuem menos chance de adquirir infecção transplacentária.

Apesar de já descritas, porém pouco frequentes, a transfusão sanguínea acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e a ingestão de leite não pasteurizado, principalmente de cabra, também são vias de transmissão do *T. gondii* (CHIARI, NEVES, 1984; DRESSEN, 1990; WONG, REMINGTON, 1993; BONAMETTI et al., 1997; RENOULT et al., 1997; FIGUEROA-DAMINA, 1998; MUNIR, ZAMAN, ELTORKY, 2000). Pode ocorrer também a transmissão através de cães, que devido ao fato de ingerir e rolar sobre fezes dos gatos, provavelmente atraídos pelo cheiro, transmitiriam oocistos esporulados. Esse comportamento, denominado de xenosmofilia, possibilitaria a transmissão de oocistos esporulados presentes na pelagem dos cães através do contato do homem, como o acariciamento (FRENKEL, PARKER, 1996).

O diagnóstico da toxoplasmose é feito baseado na associação dos sinais clínicos com métodos sorológicos, histopatológicos e isolamento do agente (DUBEY, 1993). Rotineiramente, devido a limitações e dificuldades das demais técnicas, o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose se baseia nos testes sorológicos (COSTA et al., 2007).

Devido à complexidade da epidemiologia e a versatilidade do parasita, várias medidas de profilaxia devem ser tomadas. Manter gatos domésticos bem alimentados e domiciliados, para evitar a predação de animais infectados e alimentá-los com comida seca, enlatada ou cozida, evitando vísceras e carne crua (DUBEY, 1993; ARAÚJO, SILVA, LANGONI, 1998; DUBEY, 2004). Remoção diária de fezes e limpeza adequada de gatis (URQUHART, 1996). Manipuladores de carne devem lavar as mãos e todos os utensílios que tenham entrado em contato com a carne crua com água e sabão antes de realizar outras tarefas (DUBEY, BEATTIE, 1988). Tratamento de embutidos com NaCl a uma concentração de 2 a 2,5% por 48 horas, congelamento da carne a -13°C ou cozimento a 67°C para inativação de cistos teciduais, além de evitar a degustação da carne durante o tempero (KOTULA et al., 1991; NAVARRO et al., 1992; DUBEY, 2004). Utilização de luvas de jardinagem e lavar bem frutas e verduras com água tratada ou fervida (ARAÚJO, SILVA, LANGONI, 1998; DUBEY, 2004). Evitar o acesso de gatos a dependências da fazenda como galpão de ração, granja de suínos, comedouro e

reservatórios de água (URQUHART, 1996; DUBEY, 2004). Evitar beber água não filtrada de lagos e rios e ferver o leite antes do consumo, principalmente o leite de cabra (TENTER, HECKEROTH, WEISS, 2000; DUBEY, 2004).

## **2.1 *Toxoplasma gondii* em pombos**

CARINI (1911) foi o primeiro a descrever a toxoplasmose em pombos. Este observou organismos semelhantes ao *T. gondii* em esfregaços de fígado e baço de um pombo em São Paulo. Em seguida, CARINI e MACIEL (1913), infectaram pombos com tecido de cães que vieram a óbito devido à toxoplasmose e concluíram que a doença dos cães era a mesma das aves, sendo a partir daí, o parasita relatado em várias espécies de aves (DUBEY, 2002).

Taquizoítos da cepa RH foram inoculados em pombos e observou-se além de parasitemia, alta mortalidade devido à toxoplasmose aguda, e durante a necropsia, lesões necróticas severa em vários tecidos, incluindo olhos e via nasal (REIS, NÓBREGA, 1936). Em 1941, pesquisadores encontraram taquizoítas em eritrócitos de aves, fato de interesse biológico, pois o *T. gondii* não é encontrado em eritrócitos de mamíferos (MANWELL, 1941; WOLFSON, 1941). NÓBREGA e REIS (1942) isolaram o parasita de pombos e mantiveram a cepa através de sucessivas passagens em pombos, e posteriormente transmitiram para cobaias, coelhos e galinhas. Na década de 60, pesquisadores concluíram que não há diferença sorológica e morfológica de isolados de *T. gondii* de aves e de mamíferos (DUBEY, 2002).

Geralmente a toxoplasmose resulta em infecção subclínica em muitas espécies aviárias, sendo que algumas espécies de pombos são mais susceptíveis do que outras com relação à toxoplasmose clínica, porém quadros clínicos severos podem ser observados em pombos naturalmente infectados (DUBEY, 2002). Pombos infectados quando manifestam sinais clínicos, apresentam um quadro de anorexia, depressão, edema, secreção ocular, convulsão e morte, podendo ser visualizado elevado número

de parasitas em vários tecidos, principalmente baço e pulmão, além de um quadro de neurite e encefalite (CARINI, 1911).

Pombos são altamente susceptíveis à infecção oral com oocistos de *T. gondii* (BIANCIFIORI et al., 1986). Estes autores demonstraram que pombos alimentados com 500 ou mais oocistos morreram de toxoplasmose aguda em média 20 dias após a ingestão, e pombos que ingeriram 50 oocistos apresentaram anticorpos detectáveis pelo ELISA, sem contudo manifestarem os sinais clínicos da doença.

Para o diagnóstico de toxoplasmose em pombos, são utilizados testes sorológicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e moleculares. Estudos sorológicos e parasitológicos indicam que a infecção por *T. gondii* é comum em diversas espécies de aves (DUBEY, 2002). Dentre os testes sorológicos, o Teste de Aglutinação Modificado (MAT) é o mais utilizado, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade, não requer equipamentos especiais e não necessita de conjugado. Pode-se realizar a PCR utilizando primers específicos para detecção do DNA do parasita, porém na maioria dos casos, o diagnóstico será feito através do exame histopatológico das aves submetidas à necropsia, onde é feita uma triagem através da impressão de tecidos infectados e corados com Giemsa (DUBEY, 2002).

A Tabela 1 demonstra alguns trabalhos que isolaram o parasita de tecidos de pombos de vida livre, enquanto que a Tabela 2 demonstra a soro-ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos.

**Tabela 1.** Isolamento de *Toxoplasma gondii* de tecidos de pombos de vida livre.

Espécie	País	n	% Infectado	Referência
<i>Columba livia</i>	Estados Unidos	1	100	Feldman, Sabin (1949)
	Estados Unidos	50	2	Manwell, Drobeck (1951)
	Estados Unidos	80	5	Jacobs et al. (1952)
	Estados Unidos	16	6	Gibson, Eyles (1957)
	Dinamarca	3	100	Siim et al. (1963)
	Eslováquia	16	12,5	Čatár (1974)
	República Checa	606	1	Literák et al. (1992)
	Portugal	12	75	Waap et al. (2008)
	Brasil	126	0	Godoi et al. (2010)
	Brasil	238	0	Lima et al (2011)
	México	521	0,19	Alvorado-Esquivel (2011)
<i>Columba palumbus</i>	República Checa	12	8,3	Literák et al. (1992)
<i>Streptopelia decaocto</i>	República Checa	60	5	Literák et al. (1992)
	Eslováquia	12	50	Čatár (1974)
<i>Streptopelia senegalensis</i>	Cazaquistão	20	5	Pak (1976)

Modificado de Dubey 2002, 2010

**Tabela 2.** Soro-ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em pombos.

Espécie	País	n	% Positivo	Teste	Cut-off	Referência
<i>Columba livia</i>	Estados Unidos	20	10	DT	1:16	Feldman , Sabin (1949)
	Estados Unidos	80	8,7	DT	1:16	Jacobs et al. (1952)
	Estados Unidos	15	6	DT	1:16	Gibson, Eyles (1957)
	Alemanha	49	2	DT	1:16	Niederehe (1964)
	Itália	108	3	DT	1:50	Mandelli, Persiani (1966)
	Estados Unidos	322	8,6	IHAT	1:16	Pendergraph (1972)
	Bélgica	220	3,18	MAT	1:64	Cotteleer, Famerée (1978)
	Estados Unidos	34	5,9	MAT	1:40	Kirkpatrick et al. (1990)
	África do Sul	16	100	IHAT	1:64	Mushi et al. (2001)
	Polônia	230	74,8	LAT	6UI	Piasecki et al. (2004)
	Taiwan	665	4,7	LAT	1:32	Tsai et al. (2006)
	Portugal	695	4,6	MAT	1:20	Waap et al. (2008)
	Israel	495	4	MAT	1:5	Salant et al. (2009)
	Brasil	126	0	MAT	1:5	Godoi et al. (2010)
	Brasil	120	0,83	RIFI	1:20	Sousa et al. (2010)
	China	276	8,7	MAT	1:5	Yan et al. (2011)
	Brasil	238	5	MAT	1:8	Lima et al. (2011)
	México	521	1,3	MAT	1:25	Alvorado-Esquivel (2011)
	Turquia	216	0,92	DT	1:16	Karatepe et al. (2011)
Zenaida asiatica	México	10	0	MAT	1:25	Alvorado-Esquivel (2011)
<i>Columbina talpacoti</i>	Panamá	79	12,6	MAT	1:5	Frenkel et al. (1995)
<i>Streptopelia chinensis</i>	Estados Unidos	134	8,2	DT	1:16	Wallace (1973)

Modificado de Dubey 2002, 2010

DT: Dye Test

IHAT: Teste da Hemaglutinação Modificado

MAT: Teste de Aglutinação Modificado

LAT: Teste de Aglutinação do Látex

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta



## 2.2 Caracterização genotípica de *Toxoplasma gondii*

Apesar de sua ampla distribuição mundial, a população de *T. gondii* sempre foi classificada como de baixa variabilidade genética com uma estrutura populacional altamente clonal quando analisados pela PCR-RFLP ou marcadores isoenzimáticos, principalmente do gene SAG2, sendo os isolados de humanos e animais da Europa e América do Norte classificados em uma das três linhagens genéticas, Tipo I, II e III, com diferenças genéticas em torno de 1% (SIBLEY, BOOTHROYD, 1992; DARDÉ, BOUTEILLE, PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE, SIBLEY, 1995; AJIOKA, FITZPATRICK, REITTER, 2001). Entretanto estudos com análises de microssatélites e polimorfismo de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição sobre produtos amplificados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR-RFLP *multilocus*) com isolados de humanos e animais da América Central e do Sul, principalmente o Brasil, demonstraram a ampla variabilidade genética, com recombinação genética em relação aos tipos clonais (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2004; KHAN et al., 2006; SU, ZHANG, DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007a,b).

A PCR-RFLP é a análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA, devido à clivagem DNA, feita por enzimas de restrição, que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito bases. Possui a capacidade de diferenciação dos alelos atípicos (u-1, u-2) e detecção da combinação dos alelos de diferentes arquétipos, além da facilidade de utilização e a alta resolução, similar ao sequenciamento genético (SU, ZHANG, DUBEY, 2006). Depois de clivadas, moléculas de DNA relacionadas, porém diferentes, quando analisadas por eletroforese em gel de agarose, possuem bandas de diferentes pesos moleculares (CLARK, RUSSEL, 1997). Essa alta resolução da PCR-RFLP é importante em estudos que objetivam rastrear o agente ou avaliar uma associação entre os aspectos clínicos da infecção com o tipo de cepa (AJZENBERG et al., 2002).

No Brasil, os primeiros estudos de genotipagem de isolados de *T. gondii* foram realizados por DUBEY et al. (2002), onde caracterizaram os isolados de galinhas de São Paulo. De um total de 25 isolados, 22 foram obtidos pelo bioensaio de cérebro e

coração de aves com sorologia maior ou igual a 40 (MAT), enquanto que três isolados foram obtidos pelas fezes de gatos alimentados com tecidos de galinhas que foram soronegativas. A partir da análise da PCR-RFLP, 16 isolados foram tipo I e nove isolados tipo III, não sendo observados isolados do tipo II.

A seguir, estudos com isolados de *T. gondii* a partir de diferentes espécies de hospedeiros de diferentes regiões do país, revelaram que os genótipos apresentam recombinação gênica em relação aos arquétipos clonais I, II e III (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003a,b; PENA et al., 2006; DUBEY et al., 2007a,b; DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008)

PENA et al. (2008) avaliaram 46 isolados de *T. gondii* provenientes de 11 localidades de São Paulo pela PCR-RFLP e compararam com os isolados brasileiros de diferentes hospedeiros e regiões geográficas. Também foi incluído um novo marcador, denominado de CS3, localizado no cromossomo VIIa e relacionado à virulência em camundongos. Foram observadas linhagens clonais típicas do Brasil, denominadas de Tipo BrI, BrII, BrIII e BrIV, e com base na virulência para camundongos, o tipo BrI foi classificado como virulento, o tipo BrII e BrIV como virulentos intermediários e o tipo BrIII não virulento. Observou-se que a estrutura populacional do *T. gondii* no Brasil é altamente diversificada com algumas das linhagens clonais em diferentes áreas geográficas, além das diferenças biológicas destas linhagens.

DUBEY et al (2008), genotiparam 151 isolados de galinhas de diferentes regiões do Brasil, incluindo 117 novos isolados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Sergipe e Roraima e 34 isolados previamente descritos (DUBEY et al., 2007a). Através da análise de PCR-RFLP, foram observados 58 genótipos, sendo 29 um único isolado e 29 dois ou mais isolados. Um único isolado foi tipo I e cinco tipo III, não sendo observado isolado tipo II, porém, verificaram isolados com padrão de infecção mista. Os resultados confirmaram estudos anteriores, que relatam uma elevada diversidade genética dos isolados brasileiros, independente da região geográfica.

Em um estudo com galinhas da ilha de Fernando de Noronha, DUBEY et al. (2010) caracterizaram geneticamente os isolados de *T. gondii*. Após a análise

sorológica (MAT), foram selecionadas amostras de 40 galinhas para a realização do bioensaio para o isolamento de *T. gondii*. No total, foram obtidos 24 isolados, nenhum patogênico para camundongos. A partir da análise de PCR-RFLP, foram observados seis genótipos, incluindo tipo II, III e quatro novos genótipos. Os resultados obtidos indicam que a população de *T. gondii* na ilha de Fernando de Noronha é constituída por genótipos únicos e genótipos clonais dominantes na América do Norte e Europa.

Estudos recentes tem relatado a existência de um quarto tipo clonal, designado como Tipo 12 e predominante em animais selvagens. Através de análises filogenéticas observou-se uma dominância desse tipo genético em animais selvagens da América do Norte, sugerindo a limitada diversidade genética nesses animais, com a ocorrência de alguns tipos clonais principais (KHAN et al., 2011; DUBEY et al., 2011).

Existem poucos trabalhos de isolamento e caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* em pombos. WAAP et al. (2008), após a análise sorológica de 695 pombos *C. livia* pelo Teste de Aglutinação Direta (DAT), selecionou os 23 positivos para a colheita do cérebro, para a extração de DNA diretamente do cérebro e para o bioensaio em camundongos. A análise genotípica foi realizada através da análise de cinco marcadores de microssatélites (TUB2, TgM-A, W35, B17, B18). *Toxoplasma gondii* foi caracterizado diretamente do cérebro de 12 pombos soropositivos, dos quais nove isolados foram tipo II, duas tipo III e uma tipo I, não sendo observada nenhuma cepa recombinante ou atípica. Pelo bioensaio, foram obtidos nove isolados, e a caracterização genética estava de acordo com a obtida diretamente do cérebro das aves.

Em um estudo no México, ALVARADO-ESQUIVEL et al. (2011) caracterizaram isolados de *T. gondii* de pombos *C. livia*. De um total de 521 pombos, foram selecionados nove para a colheita de cérebro e coração para a realização do bioensaio em camundongos, sendo que sete eram soropositivos e dois soronegativos pelo MAT. Taquizoítos de *T. gondii* foram isolados de uma única amostra, proveniente de um animal com título de 400 no MAT. A caracterização genotípica foi realizada através da PCR-RFLP utilizando 11 marcadores moleculares. O isolado de *T. gondii* do pombo foi

classificado como atípico e similar a alguns isolados de animais domésticos da região (DUBEY et al., 2009).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a soro-ocorrência e caracterizar geneticamente isolados de *Toxoplasma gondii* em pombos (*Zenaida auriculata*) capturados em Londrina, Paraná.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a soro-ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos de vida livre pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT).
- Isolar *T. gondii* de pombos de vida livre por meio do bioensaio em camundongos
- Caracterizar genotipicamente os isolados obtidos por meio da PCR-RFLP.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram capturados 206 pombos de vida livre da espécie *Zenaida auriculata*, no período de outubro/2009 a junho/2011, sendo 97 (47%) machos e 109 (53%) fêmeas. As aves foram capturadas em locais de grande concentração por meio de armadilhas tipo arapuca com iscas na cidade de Londrina (23°19'49"S/051°08'12"W), Paraná. As aves foram capturadas em três regiões: câmpus universitário da Universidade Estadual de Londrina, zona urbana, e zona rural, das quais foram capturados 50, 140 e 16 aves respectivamente.

Camundongos albinos fêmeas, entre 45 e 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina foram utilizados para os procedimentos de produção de antígenos para os testes sorológicos, bem como para o bioensaio das amostras de pombos.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEA/UEL) N.70/2008 e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) – SISBIO N.16428-1.

### 4.2 Amostras de *T. gondii*

Foram utilizadas as amostras de *T. gondii* RH, ME49 e VEG, que pertencem aos tipos I, II e III respectivamente, como padrão na caracterização genotípica dos isolados de pombos. A amostra RH também foi utilizada para a produção de antígeno para a realização dos testes sorológicos de imunofluorescência indireta (RIFI) e aglutinação modificada (MAT).

### 4.3 Colheita de sangue e tecido

Após a captura, os animais foram encaminhados ao Laboratório de Protozoologia do DMVP/UEL para a eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>. Após a eutanásia, foi feita a colheita de sangue por punção cardíaca com seringa de 1ml (BD Plastipak™) e com agulha 25 X 0,70 (22G) (BD PrecisionGlide™), e o soro obtido foi armazenado a -20°C até a realização dos testes sorológicos. Posteriormente, os animais foram necropsiados e os órgãos pulmão, fígado, coração, cérebro e musculatura peitoral foram colhidos para a realização do bioensaio em camundongos para o isolamento do agente.

### 4.4 Bioensaio em camundongos

Após a colheita dos órgãos, estes foram pesados e triturados em um béquer com solução salina com o auxílio de um mixer (Walita Philips RI1341). Em seguida adicionou-se fluido digestivo artificial (0,26g de pepsina, 0,5g de NaCl, 0,7ml de HCl e 50ml de água destilada q.s.p.), e essa solução foi incubada a 37°C por 60 minutos sob agitação constante, conforme preconizado por DUBEY (1998). Posteriormente, essa solução foi filtrada com o auxílio de uma gaze com oito dobras, sendo então centrifugada a 1200xg/10min. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento neutralizado em solução de bicarbonato 1,2%. A solução foi ressuspensa em salina e centrifugada novamente com as mesmas condições anteriores. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento ressuspensa em solução salina estéril obtendo-se um volume final de 4 ml, sendo 1ml armazenado em tubo tipo "ependorf" e o restante, após adição de antibiótico (1000UI de penicilina e 100µL de estreptomicina/ml), inoculado pela via intraperitoneal em três camundongos (1 ml/animal).

Os camundongos inoculados foram observados diariamente, e os que apresentaram sinais clínicos da doença (pelos eriçados, lacrimejamento, emagrecimento, diarreia e distensão abdominal) foram sacrificados para a colheita do

líquido peritoneal e a verificação da presença de taquizoítos. Após 45 dias pós-inoculação, os camundongos sobreviventes foram eutanasiados em câmara de éter para a colheita do cérebro para a pesquisa de cisto tecidual por meio do *in print* entre lâmina e lamínula. Ademais, o soro obtido foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da reação de imunofluorescência indireta para a pesquisa da IgG anti-*T. gondii*.

#### 4.5 Sorologia dos pombos e dos camundongos

As amostras de soros dos pombos foram avaliadas pelo Teste de Aglutinação Modificada (MAT), conforme metodologia descrita por DESMONTS e REMINGTON (1980). Primeiramente, as amostras de soro foram diluídas em solução salina tamponada ( $\text{NaCl}$  0,146M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,0026M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,008M ; pH 7,2). Também foi realizada a diluição do antígeno: 2500 $\mu\text{L}$  de solução alcalina tamponada ( $\text{NaCl}$  0,12M;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,05M;  $\text{NaN}_3$  0,03M; BSA 0,4%), 120  $\mu\text{L}$  de antígenos (taquizoítos previamente produzidos em camundongos com células de sarcoma murino TG180 e inativados com formol), 34  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol e 50  $\mu\text{L}$  de Azul de Evans. Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  dessa solução de antígeno foram distribuídos para uma microplaca (96 poços) com fundo em "U". Após, 25  $\mu\text{L}$  dos soros diluídos também foram distribuídos para essa microplaca e misturados com o antígeno. A placa foi selada com Parafilm® e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Controles, positivo e negativo, foram incluídos em todas as placas. A formação de um botão no fundo da placa foi considerada como reação negativa, enquanto que a formação de um tapete, como positiva. Soros com título maior ou igual a 16 foram considerados positivos.

Para a pesquisa de IgG anti-*T. gondii* dos camundongos utilizados no bioensaio, foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) segundo técnica descrita por CAMARGO (1964). Os soros foram diluídos em microplacas (96 poços) em PBS ( $\text{NaCl}$  0,731M;  $\text{KCl}$  0,027M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,105M;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,018M; pH 7,2). Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  do soro diluído foram distribuídos em lâminas contendo o antígeno (taquizoítos) fixado. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.



Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS (três vezes por 10 minutos), secas à temperatura ambiente e adicionado 10 µL de conjugado espécie-específico (anti-IgG de camundongo conjugado com FITC – Sigma, EUA) previamente diluído a 1:300 em PBS. As lâminas foram novamente incubadas e lavadas seguindo as mesmas condições, secas a temperatura ambiente e montadas com glicerina e lamínula. Controles, positivo e negativo, foram incluídos em todas as lâminas. A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente (Nikon, Japão) e somente amostras que apresentaram fluorescência em toda a superfície do parasita foram consideradas positivas. Soros com título maior ou igual a 16 foram considerados positivos.

#### **4.6 Extração de DNA**

A extração de DNA de *T. gondii* foi realizada conforme técnica descrita por GARCIA et al. (2006). Após a homogeneização da amostra, 300µL da amostra foi transferida para um tubo tipo “eppendorf” com igual volume de tampão de extração (200nM NaCl, 20nM Tris, 50mM EDTA, proteinase K 1mg/ml e 2%SDS) e incubada a 56°C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado 500µL de fenol tamponado e centrifugado a 13.000g por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e centrifugado novamente a 13.000g por 5 minutos. A precipitação foi realizada com acetato de sódio e etanol (SAMBROOK, FRITSHC, MANIATIS, 1989).

#### **4.7 PCR-RFLP**

A caracterização genotípica dos isolados foi realizada utilizando os 12 marcadores genéticos, SAG1, 5'-3'SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3, conforme previamente descrito (SU, ZHANG, DUBEY, 2006, PENA et al., 2008).

As cepas RH, ME49 e VEG foram utilizadas como padrão genotípico I, II, e III, respectivamente. As sequências alvo do DNA foram primeiramente amplificadas pela PCR-multiplex, utilizando primers externos de todos os marcadores, seguida de uma PCR-nested, utilizando primers internos individualmente para cada marcador.

A reação da PCR-multiplex foi realizada em 25µL, 10x tampão de PCR, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de cada dNTP, 0,3µM de cada primer, 1,25U de platinum Taq-DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 2µL de DNA e H<sub>2</sub>O Mili-Q estéril. Foi utilizada a seguinte programação: 95°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

A reação da PCR-nested foi realizada da mesma forma como descrito acima, com as seguintes características de programação: 95°C por 4 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Em seguida, os produtos da PCR-nested foram clivados por meio de enzimas de restrição e condições de temperatura e tempo (Tabela 3) específicos para cada marcador (SU, ZHANG, DUBEY, 2006). Para cada reação, 3µL do produto da PCR-nested foi adicionado com 17µL de reação de digestão, contendo Tampão 10xNEB, 0,1mg/mL de BSA e uma unidade de cada enzima. Todos os produtos foram visualizados sobre luz UV depois de realizada eletroforese em gel de agarose 2,5 ou 3%, dependendo do marcador, corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA).

Os resultados obtidos foram comparados e classificados de acordo com os genótipos presente no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>)

**Tabela 3.** Primers para PCR-RFLP multiplex multilocus nested (Mn-PCR-RFLP)

Marcadores	Primers PCR-multiplex (primers externos)	Primers PCR-nested (primers internos)	PCR-nested (pb)	Enzimas de restrição, tampão NEB,
				tempo e temperatura de incubação
SAG1	F: GTTCTAACACGCACCCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I + HaeIII, NEB4, BSA, 37°C-1 h, gel 2,5, %
5'-SAG2	Não necessário. O fragmento de DNA para 5'SAG2 é reconhecido pelos primers externos de alt.SAG2	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	MboI, NEB4, BSA 37°C-1 h, gel 2,5, %
3'-SAG2	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	HhaI, NEB4, BSA 37°C-1 h, gel 2,5, %
alt.SAG2	F: GGAACGCGAACAAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTGACCCAGCGGGAGCAC	546	HinfI + TaqI, NEB3, BSA 37°C-30 min, 65°C-30 min, gel 2,5%
SAG3	F: CAACTCTCACCATCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	NciI, NEB4, BSA 37°C-1 h, gel 2,5%
BTUB	F: TCCAAAATGAGAGAAAATCGT R: AAATTGAAAATGACGGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	BsiEI + TaqI, NEB4, BSA 60°C-1h, gel 2,5%
GRA6	F: ATTTGTGTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI (0,2µl), NEB2, BSA 37°C-1h, gel 2,5%
c22-8	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTGGATATTTCGC	521	BsmAI (0,2µl) + MboII (0,2µl), NEB2, BSA 37°C-30 min, 55°C-30 min, gel 2,5%
c29-2	F: ACCCACTGACGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTGCG R: TGTCTAGGAAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV (0,2µl) + RsaI (0,2µl), NEB1, BSA 37°C-1h, gel 2,5%
L358	F: TCTCTCGACTTCGCCTTTC R: GCAATTTCTCGAAGACAGG	F: AGGAGGCGTAGCGCAAAT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII + NlaIII (0,2µl), NEB4, BSA 37°C-1h, gel 2,5%
PK1	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI + RsaI, NEB4, BSA 37°C-1h, gel 2,5%
Apico	F: TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTGAA	F: GCAAATTTGAATCTCAGTT R: GGGATTCTGAACCCCTTGATA	640	AflII (0,2µL) + DdeI (0,2µl), NEB2, BSA 37°C-1h, gel 3%

#### **4.8 Análise Estatística**

Os resultados foram comparados de acordo com as variáveis sexo e local de captura utilizando o teste de qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%, utilizando o Programa EpiInfo 6.04. Um  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. RESULTADOS

Das 206 amostras submetidas ao MAT, 46 (22,3%) apresentaram anticorpos contra *T. gondii* e 160 (77,7%) foram consideradas negativas. Os títulos obtidos variaram de 16 até 4096. Vinte oito (13,5%) amostras com título de 16, sete (3,3%) com título de 64, seis (3,0%) com título de 256, quatro (2,0%) com título de 1024 e uma (0,5%) amostra com título de 4096 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado da análise sorológica pelo Teste de Aglutinação Modificada (MAT) de pombos (*Zenaida auriculata*) capturados em Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.

Título	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
<16	160	77,7
16	28	13,5
64	7	3,3
256	6	3,0
1024	4	2,0
4096	1	0,5
<b>Total</b>	206	100

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da soro-ocorrência associada com a região de captura das aves. Verificou-se uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) com relação ao local de captura dos animais, com positividade de 56%, 12,1% e 6,2% para o câmpus da Universidade, zona urbana e zona rural, respectivamente. No que tange ao sexo dos animais, foram soropositivos 18,5% (18) dos machos e 25,6% (28) das fêmeas, não sendo observada diferença estatística significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Soro-ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em pombos (*Zenaida auriculata*) segundo os locais de captura, Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.

Região Captura	Número animais positivos/ Número animais capturados	Soro-ocorrência (%)	Valor de p
Câmpus Universitário	28/50	56	<0,05
Zona urbana	17/140	12,1	
Zona rural	1/16	6,2	

Os resultados dos isolados no bioensaio e o respectivo título sorológico dos pombos encontram-se sumarizados na Tabela 6. Doze animais (5,8%, 12/206) tiveram seus tecidos considerados positivos no bioensaio em camundongos, sendo obtidos 12 isolados de *T. gondii*, denominados de acordo o número de captura como Pb01, Pb06, Pb12, Pb13, Pb14, Pb36, Pb150, Pb153, Pb155, Pb164, Pb185 e Pb200. Desses isolados, nove foram obtidos na forma de taquizoítos (Pb01, Pb06, Pb12, Pb13, Pb14, Pb36, Pb164, Pb185 e Pb200) e três na forma de bradizoítos (Pb150, Pb153 e Pb155). Entretanto, após a primeira passagem em camundongos, os isolados Pb01 e Pb36 também apresentaram a capacidade de formar cistos teciduais.

**Tabela 6.** Resultado do bioensaio em camundongos e o respectivo título sorológico pelo Teste de Aglutinação Modificado (MAT) de pombos (*Zenaida auriculata*) capturados em Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.

Pombo (Pb)	Região de Captura	Número camundongos positivos <sup>1</sup>	Forma parasitária observada	MAT Pombo
1	Câmpus	2/3	Taq	64
6	Câmpus	1(1)/3	Taq	16
12	Câmpus	3/3	Taq	16
13	Câmpus	3/3	Taq	16
14	Câmpus	1/3	Taq	16
36	Câmpus	3/3	Taq	256
150	Zona urbana	(1)/3	Cisto	1024
153	Zona urbana	(1)/3	Cisto	<16
155	Zona urbana	(1)/3	Cisto	<16
164	Zona urbana	3/3	Taq	256
185	Zona urbana	2/3	Taq	1024
200	Zona rural	1/3	Taq	1024

<sup>1</sup> Resultados são expresso como número de camundongos mortos por *T. gondii* de 3 camundongos inoculados. Número entre parênteses indicam o número de camundongos com título de anticorpos  $\geq 16$  (RIFI) ou que tiveram cistos teciduais identificados no cérebro.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da análise genotípica dos 12 isolados. Observou-se a presença de sete genótipos, três dos quais não descritos anteriormente e quatro que se enquadraram nos genótipos #1, #6, #17 e #65 do ToxoDB. Não foi possível determinar o genótipo dos isolados Pb13 e Pb14, pois não amplificaram todos os marcadores moleculares. A Figura 2 ilustra os produtos da PCR-RFLP dos isolados, caracterizados de acordo com o marcador c29-2.

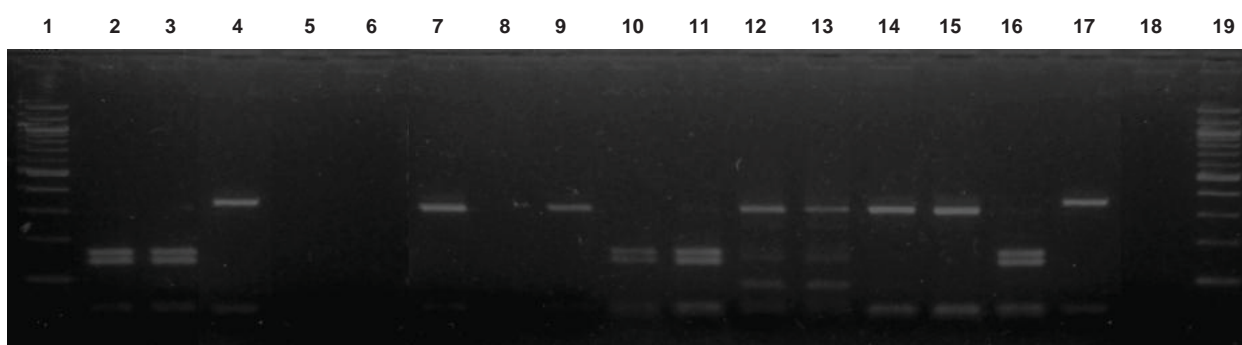
Os diversos genótipos isolados apresentaram virulência biológica em camundongos bastante diferente. Enquanto que algumas cepas (Pb12, Pb13, Pb36, Pb164) foram capazes de causar doença aguda, levando a óbito todos os animais inoculados, outros isolados (Pb150, Pb153 e Pb155) apresentaram somente a forma crônica da infecção, ou seja, cistos teciduais.

**Tabela 7.** Caracterização genotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de pombos (*Zenaida auriculata*) capturados em Londrina/PR, de outubro de 2009 até junho de 2011.

Isolado	Marcadores												Genótipo
	SAG1	5'+3' SAG2	alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3	
Pb01	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	ToxoDB #1
Pb06	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	ToxoDB #1
Pb12	I	I	III	III	II	II	II	III	II	II	I	II	Novo
Pb13	nd	nd	nd	III	nd	III	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pb14	I	I	II	III	nd	III	u-1	nd	II	nd	II	II	nd
Pb36	I	III	III	III	III	III	III	I	I	I	III	II	Novo
Pb150	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I	ToxoDB #6
Pb153	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	ToxoDB #1
Pb155	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	ToxoDB #1
Pb164	u-1	III	III	III	III	III	III	I	I	I	III	II	Novo
Pb185	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	III	ToxoDB #17
Pb200	I	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	ToxoDB #65

Nd: não determinado





**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos da PCR-RFLP para o marcador c29-2. Canaleta 1 - Peso molecular (100pb); Canaleta 2 - Pb01 (II); Canaleta 3 - Pb06 (II); Canaleta 4 - Pb12 (III); Canaleta 5 - Pb13 (nd); Canaleta 6 - Pb14 (nd); Canaleta 7 - Pb36 (I); Canaleta 8 - Controle negativo; Canaleta 9 - Pb150 (I); Canaleta 10 - Pb153 (II); Canaleta 11 - Pb155 (II); Canaleta 12 - Pb164 (I); Canaleta 13 - Pb185 (I); Canaleta 14 - Pb200 (I); Canaleta 15 - RH (controle positivo tipo I); Canaleta 16 - ME49 (controle positivo tipo II); Canaleta 17 - VEG (controle positivo tipo III); Canaleta 18 - Controle negativo; Canaleta 19- Peso molecular (100pb).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observada uma ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* de 22,3% em *Z. auriculata* por meio do MAT. Este é o primeiro trabalho a avaliar a soroprevalência bem como isolar *T. gondii* nesta espécie hospedeira.

Assim como outras aves, os pombos podem se infectar pela alimentação contaminada com oocistos, sendo a prevalência de anti-*T. gondii* nessas espécies um bom indicador da contaminação ambiental (RUIZ, FRENKEL, 1980). Além disso, pombos *Z. auriculata* são importantes hospedeiros para a avaliação da diversidade genotípica do *T. gondii*, são animais que são nativos da nossa região e não estão em extinção, o que os torna factíveis para a pesquisa.

Esta soroprevalência é maior do que alguns trabalhos recentes realizados Brasil, onde avaliaram a prevalência de *T. gondii* em pombos *Columba livia*. GODOI et al. (2010), no estado de São Paulo, não encontraram nenhuma ave soropositiva de um total de 126 aves estudadas, estes autores também utilizaram a MAT. Da mesma forma, SOUSA et al. (2010) avaliaram 120 pombos na cidade de Jaboticabal-SP e encontraram uma baixa ocorrência de anticorpos na RIFI (0,83%). Estes autores concluíram que esta baixa prevalência foi provavelmente devido a pouca exposição ao *T. gondii*, a resposta imunológica deficiente ou ao tempo entre infecção e titulação dos anticorpos, que pode ter sido longo ou curto demais. Por outro lado, LIMA et al. (2011), verificaram pelo MAT uma prevalência de 5% em 238 pombos estudados no estado de São Paulo, e os títulos de anticorpos não ultrapassaram 32. Segundo sugerem tais autores, estes animais apresentam uma baixa carga parasitária e os mesmos não seriam uma boa fonte de infecção para os seres humanos.

Em outros países, a ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* em pombos *C. livia* varia de 0,9% a 10%. TSAI et al. (2006) encontraram uma soroprevalência de 4,7% em pombos de Taiwan utilizando o LAT. Já em Portugal, WAAP et al. (2008) observaram uma prevalência de 4,6% por meio do teste de aglutinação direta (DAT). Na China, a prevalência de pombos positivos pelo MAT foi de 8,7% (YAN et al., 2011). Já KARATEPE et al. (2011) trabalhando com pombos da Turquia, observaram uma soroprevalência de 10,5% em 100 pombos estudados.

ocorrência de 0,92%, enquanto que ALVARADO-ESQUIVEL et al. (2011) utilizando o MAT, verificaram uma prevalência de 1,3% de pombos positivos no México. Como característica geral, estes trabalhos utilizaram técnicas variadas de aglutinação para detecção de anticorpos e baixas prevalências foram verificadas. Porém, apesar da baixa soro-ocorrência de anticorpos, os pombos podem servir como fonte de infecção para carnívoros domésticos e selvagens além do homem, alertando para a ampliação dos estudos nessa espécie de ave para elucidar as implicações na saúde humana e animal (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011).

Diferentemente de estudos anteriores, PIASECKI et al. (2004) verificaram uma prevalência alta de 74,8% em 230 pombos na Polônia pelo LAT. Já MUSHI et al (2010) observaram pelo IHAT uma ocorrência de 100% em pombos na África do Sul, porém, estes autores estudaram apenas dezesseis animais.

Estas diferenças na soroprevalência de *T. gondii* em pombos poderiam ser atribuídas a fatores como condições geográficas, teste sorológico utilizado, ponto de corte, bem como a espécie de pombo estudada (DUBEY, 2002; DUBEY 2009).

Várias técnicas sorológicas, como Dye Test (DT), Teste de Aglutinação do Látex (LAT), Teste de Hemaglutinação Modificado (IHAT), Teste Imuno-Enzimático (ELISA) são utilizadas para o sorodiagnóstico da infecção por *T. gondii* em aves. No presente trabalho a técnica utilizada para avaliar a presença de anticorpos contra *T. gondii* foi o MAT, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, além de ser de fácil realização e interpretação, apresentando um bom custo benefício (FRENKEL, 1981; DUBEY, 1993).

No presente estudo, foi observada uma diferença significativa com relação à área de captura das aves. Aves capturadas no câmpus universitário apresentaram a maior ocorrência de anticorpos contra *T. gondii* (56%), quando comparados com animais de área urbana (12,1%), e área rural (6,2%). Esta ocorrência poderia ser explicada pela alta concentração de gatos, pois estes são frequentemente abandonados ainda jovens nas imediações do Hospital Veterinário do Câmpus, o que contribuiria para a contaminação ambiental. Além disso, a área urbana de Londrina possui elevada concentração de pombos *Z. auriculata*, e estes, por sua vez, poderiam atrair predadores, no caso, os felinos. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados

para confirmar ou não estas hipóteses. Considerando o sexo dos animais não houve diferença estatística significativa. Resultados semelhantes foram obtidos KARATEPE et al. (2011) e TSAI et. al (2006).

SALANT et al. (2009) observaram uma maior soropositividade em pombos da zona rural do que aqueles capturados em áreas urbanas, enquanto que ALVARADO-ESQUIVEL et. al (2011) encontraram uma maior soroprevalência em pombos capturados em áreas perto de zoológico do que em outras áreas. Isso pode ser devido a um maior número de hospedeiros, como gatos, roedores e aves, o que contribuiria para a transmissão do parasita.

Das 206 amostras processadas para o bioensaio em camundongos, foram obtidos 12 isolados. Este é o primeiro estudo a isolar *T. gondii* de pombos da espécie *Z. auriculata*, pois estudos anteriores realizados com pombos *C. livia* de vida livre no Brasil, não obtiveram nenhum isolado (GODOI et al., 2010; LIMA et al., 2011). Em Portugal, WAAP et al. (2008) estudando pombos *C. livia*, isolou *T. gondii* diretamente do cérebro de 12 pombos soropositivos pelo teste de aglutinação direta (DAT). ALVARADO-ESQUIVEL et al. (2011), trabalhando com 653 aves no México, dentre elas 521 pombos *C. livia*, selecionou nove amostras de cérebro e coração de sete pombos positivos e dois negativos pelo MAT, obtendo pelo bioensaio em camundongo apenas um isolado, o qual foi proveniente de uma ave com título de 400.

Dos 12 isolados obtidos, dois foram provenientes de pombos soronegativos (< 16) pelo MAT. Isto pode ser explicado pela ausência de anticorpos detectáveis em pombos cronicamente infectados. MINEO et al. (2009) infectaram experimentalmente pombos *C. livia* e realizaram um acompanhamento sorológico por meio da RIFI. Os autores observaram que os pombos apresentam uma alta produção de anticorpos entre o décimo e o décimo quinto dia pós-infecção seguida de um decréscimo agudo, chegando a níveis indetectáveis pela reação sorológica.

Considerando o alto polimorfismo encontrado em cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2008; PENA et al., 2008) o isolamento e a caracterização genética destas são muito importante para tentar associá-las com a virulência. Desta forma, vários estudos foram desenvolvidos recentemente utilizando

galinhas de vida livre de diferentes regiões do Brasil, com este objetivo (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003a,b; DUBEY et al., 2006; DUBEY et al., 2007a; SOARES et al., 2011).

O resultado da análise genotípica dos isolados de *Z. auriculata* do presente trabalho revelou a presença de quatro genótipos de acordo com o ToxoDB (#1, #6, #17 e #65), além de três outros novos, não descritos anteriormente. No Brasil, o genótipo #6 já foi isolado de gatos em São Paulo e no Paraná (PENA et al., 2006; DUBEY et al., 2004) e de galinhas em São Paulo e Paraná (DUBEY et al., 2002; DUBEY et al., 2003a). Já o isolado #17, foi observado em galinhas do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (DUBEY et al., 2007a; DUBEY et al., 2003b), enquanto o genótipo #65 também foi descrito anteriormente em galinhas do Rio de Janeiro e de gatos em São Paulo (DUBEY et al., 2003b; PENA et al., 2006).

Já o genótipo #1 (ToxoDB), observado em quatro isolados é o Tipo clonal II, raro no Brasil, com amplo número de isolados, principalmente da América do Norte e Europa (HOWE, SIBLEY, 1995). Apenas DUBEY et al. (2010), SILVA et al. (2011) e MACEDO et al. (2012) descreveram a presença do tipo clonal II, isolados em galinhas de vida livre de Fernando de Noronha, ovinos abatidos do Estado de São Paulo, bem como, em bovinos abatidos no estado de Santa Catarina, respectivamente.

Pouco é conhecido sobre a caracterização genética de isolados de *T. gondii* em pombos. WAAP et al. (2008), utilizando microssatélites, observou a presença de nove isolados Tipo II, dois Tipo III e um Tipo I, não sendo observado genótipos recombinantes ou atípicos, demonstrando a estrutura populacional clonal dos isolados europeus. Já no México, ALVARADO-ESQUIVEL et. al (2011) utilizando a PCR-RFLP, classificaram o isolado de *T. gondii* de um pombo *C. livia* como atípico, demonstrando a variabilidade genética dos isolados não europeus e norte-americanos.

A PCR-RFLP foi utilizada para a caracterização genotípica, pois possui a capacidade de diferenciação dos alelos atípicos (u-1, u-2) e detecção da combinação dos alelos de diferentes arquétipos, além de ser de fácil utilização e alta resolução, similar ao sequenciamento genético (SU, ZHANG, DUBEY, 2006).

Desde 1992 (SIBLEY, BOOTHROYD, 1992) as análises de amostras de *T. gondii* revelaram que as cepas virulentas eram representadas por uma única linhagem clonal. Posteriormente, as amostras de *T. gondii* isoladas de animais e seres humanos foram agrupadas em três principais linhagens I, II, e III (HOWE & SIBLEY, 1995). Inicialmente estes autores descreveram o *T. gondii* como único entre os organismos onde 95% da estrutura populacional dos seus isolados ficavam restritos dentro destas três linhagens. Entretanto, estudos principalmente com isolados da América Central e do Sul revelaram uma complexa distribuição de vários genótipos (PENA et al., 2008, DUBEY et al., 2002, LEHMANN et al., 2006; KHAN et al., 2006). Enquanto que as linhagens clonais I, II e III são predominantemente encontradas na América do Norte e Europa, os isolados Sul-Americanos possuem uma maior diversidade genética, com a presença de alelos diferentes, denominados de genótipos atípicos (GRIGG, SUNDAR, 2009). O Tipo I é frequentemente associado a infecções congênitas, o Tipo II frequentemente associado com reativação da infecção crônica, principalmente pacientes com AIDS, e o Tipo III é comumente encontrado em animais (HOWE, SIBLEY, 1995). No Brasil, PENA et al. (2008), baseado em estudos de PCR-RFLP *multilocus*, observaram a presença de quatro linhagens clonais típicas, denominadas de BrI, BrII, BrIII e BrIV. As populações clonais do *T. gondii* podem ser classificadas de acordo com a virulência em camundongos, onde o Tipo I é altamente virulento e os Tipos II e III são geralmente de baixa virulência (HOWE, SIBLEY, 1995; HOWE, SUMMERS, SIBLEY, 1996). Além disso, o marcador CS3, localizado no cromossomo VIIa, tem sido associado à virulência em camundongos (PENA et al., 2008). Estudos recentes revelaram a presença de um quarto tipo clonal, designado como Tipo 12, o qual é predominante em animais selvagens da América do Norte, sugerindo a limitada diversidade genética nesses animais, com a ocorrência de alguns tipos clonais principais (KHAN et al., 2011; DUBEY et al., 2011).

Portanto, estudos genéticos sobre a estrutura populacional dos isolados de *T. gondii*, como o presente trabalho, são importantes para avaliar uma série de peculiaridades sobre este parasita, tais como, patogenicidade relacionada ao genótipo da amostra isolada, resistência a medicamentos, epidemiologia populacional, e

imunogenicidade. Além disso, pombos são presas fáceis dos gatos, o que pode contribuir para a manutenção do ciclo biológico do parasita, além do que, essas aves são frequentemente caçadas e consumidas, o que pode ser tornar um problema de saúde pública.

O presente trabalho confirmou a diversidade genética do *T. gondii* no Brasil, sendo observado o tipo clonal II, genótipo raro no Brasil, além do que, é o primeiro relato na literatura de isolamento do parasita em pombos *Z. auriculata*.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e discutidos em confronto com a literatura permitem as seguintes conclusões:

- Foi observada uma alta soro-ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em pombos *Z. auriculata* de vida livre capturados em Londrina, Paraná.
- Pombos (*Z. auriculata*) podem ser considerados bons bioindicadores da contaminação ambiental por *T. gondii*, sendo possível o isolamento do parasita por meio do bioensaio em camundongos.
- A caracterização genotípica dos doze isolados revelou a presença de sete genótipos sendo quatro já descritos anteriormente (#1, #6, #17 e #65 do ToxoDB), além de três novos.
- O trabalho é o primeiro a isolar *T. gondii* de pombos *Z. auriculata* e a descrever o tipo clonal II nesta espécie, genótipo raro no Brasil.



## 8. REFERÊNCIAS

AJIOKA, J. W.; FITZPATRICK, J.M.; REITTER, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Experts Review in Molecular Medicine**, v. 6, p. 1-19, 2001.

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

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

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S.; ALVARADO-ESQUIVEL, D.; RODRÍGUEZ-PEÑA, S.; VILLENA, I.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds Durango, México. **The Journal of Parasitology**. v. 97, p. 809-812, 2011.

ARAÚJO, W.N.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Toxoplasmose – Uma zoonose: realidade e riscos. **Cães e Gatos**, n.79, p. 20-27, 1998.

BIANCIFIORI, F.; RONDINI, C.; GRELLONI, V.; FRESCURA, T. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 9, p. 337-346, 1986.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K.; MACEDO, Z.S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. **Journal of Tropical Pediatrics**. v.43, p. 116, 1997.

CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 6, p.117-118, 1964.

CARINI, A. Infection spontanée du pigeon et du chien due au *Toxoplasma cuniculi*. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**. v. 4, p. 518-519, 1911.

CARINI, A., MACIEL, J. Toxoplasmose natural do cão. **Rev. Vet. Zootech**. v. 3, p. 374-375, 1913.

CASTELLANI, A. Note on certain protozoa-like bodies in a case of protracted fever and splenomegaly. **Journal of Tropical Medicine**. v. 17, p. 113–114, 1914.

CHIARI, C.A; NEVES, D.P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 79, p. 337-340, 1984.

CHINCHILLA, M.; GUERRERO, O. M.; CASTRO, A.; SABAH, J. Cockroaches as transport hosts of protozoan *Toxoplasma gondii*. **Revista de Biologia Tropical**, v.42, p. 329-331, 1994.

CLARK, D.P.; RUSSEL, L.D. **Molecular biology**: made simple and fun. Illinois: Cache River Press, 1997. p. 235-268.

COSTA, M.J. Controle de animais sinantrópicos. In: Fernandes, A.T.; Fernandes, M.O.V.; Ribeiro Filho, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Athene. v.2, p. 1201-1207, 2000.

COSTA, T.L.; SILVA, M.G.; RODRIGUES, I.M.X.; BARBARESCO, A.A.; AVELINO, M.M., CASTRO, A.M. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose. **NewsLab**. v.85, 2007.

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

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

DONATELLI, R.J. Biologia reprodutiva da *Zenaida auriculata* (DesMurus, 1847) (Aves: Columbiformes) na região sudoeste do Brasil. **Publicações Avulsas do Instituto Pau-Brasil de História Natural**. v.3, p.1-9. 2000.

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

DUBEY, J.P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, J.P. **Parasitic Protozoa**. vol.6 San Diego: Academic Press, p. 1-158, 1993.

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

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis and Other Coccidial Infections. In: SHERDING, R.G. **The Cat Diseases and Clinical Management**. New York: Churchill Livingstone, p. 565-605, 1994b.

DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**. v. 74, p. 75-77, 1998.

DUBEY, J.P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**. v. 106, p. 121-153, 2002.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p, 2009.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 1–220, 1988.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**. v. 77, p. 1-32, 1998.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI S. M.; RAGOZO, A. M. A., NISHI, S. M., SHEN, S. K.; KWOK O. C. H.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; PRUDENCIO, L.B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M.C.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 117, p. 229-234, 2003a.

DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H.; SILVA, D.S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype and oocyst shedding by cats. **The Journal of Parasitology**. v. 89, p. 851-853, 2003b.

DUBEY, J.P.; NAVARRO, I.T.; SREEKUMAR, C.; DAHL, E.; FREIRE, R.L.; KAWABATA, H.H.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; THULLIEZ, P.; LEHMANN, T. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **The Journal of Parasitology**. v. 90, p. 721-726, 2004.

DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene, C.E. (Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Third ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, pp. 754–775, 2006.

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

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

DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M.; SUNDAR, N.; VIANNA, M.C.; BANDINI, L.M.; YAI, L.E.; KWOK, C.H.; SU, C. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**. v. 93, p. 60-64, 2007b.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**. v. 38, p. 1257-1278, 2008.

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

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G. V.; ALVARADO-ESQUIVEL, C.; ALVARADO-ESQUIVEL, D.; RODRÍGUEZ-PEÑA, S.; MARTÍNEZ-GARCÍA, S.; GONZÁLEZ-HERRERA, A.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; SU, C. Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango, Mexico. **The Journal of Parasitology**. v. 95, p. 319-322, 2009.

DUBEY, J.P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D.G.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.; QU, D.; SU, C.; MARVULO, M.F.; ALVES, L.C.; MOTA, R.A.; SILVA, J.C. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **The Journal of Parasitology**. v. 96, p. 709-712, 2010.

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G.V.; RAJENDRAN, C.; YABSLEY, M.J.; THOMAS, N.J.; BECKMEN, K.B.; SINNET, D.; RUID, D.; HART, J.; FAIR, P.A.; McFEE, W.E.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KWOK, O.C.H.; FERREIRA, L.R.; CHOUDHARY, S.; FARIA, E.B.; ZHOU, H.; FELIX, T.A.; SU, C. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. **International Journal for Parasitology**. v. 41, p. 1139-1147, 2011.

FIGUEROA DAMIAN, R. Risk of transmission of infectious diseases by transfusion. **Ginecología y Obstetricia de México**. v. 66, p. 277-283, 1998.

FRENKEL, J.K. False-negative tests for *Toxoplasma gondii* in birds. **Journal Parasitology**. v. 67, p. 952-953, 1981.

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

FRENKEL, J.K.; PARKER, B.B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*. The probable importance of Xenosmophilia. **Annals of the New York Academy Sciences**. v. 791, p. 402-407, 1996.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z. *Toxoplasma gondii*: detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 267-271, 2006.

GODOI, F.S.L.; NISHI, S.M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M. *Toxoplasma gondii*: diagnosis of experimental and natural infection in pigeons (*Columba livia*) by serological, biological and molecular techniques. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 19, p. 238-243, 2010.

GRIGG, M.E.; SUNDAR, N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. **International Journal for Parasitology**. v. 39, p. 925-933, 2009.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 8, p. 634-640, 2002.

HOLLAND, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. **American Journal Ophthalmology**. v. 136, 973-988, 2003.

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

HOWE, D.K.; SUMMERS, B.C.; SIBLEY, L.D. Acute virulence in mice associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. **Infection Immunology**. v. 64, p. 5193-5198, 1996.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. v. 24, n. 7, p. 1-82, 2011.

JANKÜ , J. Pathogenesa a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolombu žlute skvrany voku normálně velikem a microphthalmickém snalezem parasitu v sítnici. **Časopis lékařů českých** v. 62, p. 1021–1027, 1923.

KARATEPE, M.; KILIÇ, S.; KARATEPE, B.; BADÜR, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic (*Columba livia domestica*) and wild (*Columba livia livia*) pigeons in Niğde region, Turkey. **Turkiye Parazitoloji Dergisi**. v. 35, p. 23-26, 2011.

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

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveals a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**. v. 41, p. 645-655, 2011.

KONISHI, F.; TAKAHASHI, J. Some epidemiological aspects of *Toxoplasma* infections in a population of farmers in Japan. **International Journal of Epidemiology**. v. 16, p. 277-281, 1987.

KOTULA, A.W., DUBEY, J.P., SHARAR, A.K., ANDREW, C.D., SHEN, S.K., LINDSAY, D.S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**. v. 54, p. 687–690, 1991.

LEHMANN, T.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. **Infectious, Genetics and Evolution**. v. 4, p. 107–114, 2004.

LEHMANN, T.; MARCET, P.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; DUBEY, J.P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 103, n. 30, p. 11423-11428, 2006.



LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. Ames, Iowa State University Press, EUA, 1985.

LIESENFELD, O.; NGUYEN, T.A.; PHARKE, C.; SUZUKI, Y. Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1491-1493, 2001.

LIMA, V.Y.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; CASTRO, A.P.B.; SILVA, A.V.; JÚNIOR, J.P.A. *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology** v. 175, p. 9-14, 2011.

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

LIU, Q.; NEI, F.; GAO, S.; JIANG, L.; LAIN, H.; YUAN, B.; XIA, Z.; LIU, B.; XU, X.; ZHU, X. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 103, p. 162-166, 2009.

MACEDO, M.F.S.B.; MACEDO, C.A.B.; EWALD, M.P.C.; MARTINS, G.F.; SANDESKI, L.M.; ZULPO, D.L.; CUNHA, I.A.L.; TARODA, A.; CARDIM, S.T.; SU, C.; GARCIA, J.L. Serology, isolation and multi-locus PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. In press, 2012

MANWELL, R.D. Avian toxoplasmosis with invasion of the erythrocytes. **The Journal of Parasitology**. v. 27, p. 245-251, 1941.

MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infections in birds. **Veterinary Parasitology**. v. 159, p. 149-153, 2009.

MONTOYA, J.G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. 363, p. 1965-1976, 2004.

MUNIR, A.; ZAMAN, M.; ELTORKY, M. *Toxoplasma gondii* pneumonia in a pancreas transplant patient. **Southern Medical Journal**. v. 93, p. 614-617, 2000.

MURTON, R.K.; BUCHER, E.H.; NORES, M.; GOMEZ, E.; REARTES, J. The ecology of the Eared Dove (*Zenaida auriculata*) in Argentina. **Condor**. v.76, p.80-88, 1974.

MUSHI, E.Z.; BINTA, M.G.; CHABO, R.G.; NDEBELE, R.; PANZIRAH, R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Chlamydia psittaci* in domestic pigeons (*Columbia livia domestica*) at Sebele, Gaborone, Botswana. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 68, p. 159-161, 2001.

NAGEL, P.; SMREKAR, G.; HAAG-WACKERNAGEL, D.; Use of feral pigeon eggs for urban biomonitoring. **Fresenius Environmental Bulletin**. v. 10, n. 1, p. 18-25, 2001.

NAVARRO I. T.; VIDOTTO O.; GIRALDI N.; MITSUKA R. Resistência do *Toxoplasma gondii* ao cloreto de sódio e aos condimentos em linguças de suínos. **Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana**. v. 112, p. 138-143, 1992.

NICOLLE, C; MANCEAUX, L. Sur une infection á corps de *Leishman* (ou organisms voisins) du *gondii*. **Compets Rendus de l'Académie des Science**. v. 147, p. 763, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L.. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Compets Rendus de l'Académie des Science**. v. 148, p. 369, 1909.

NÓBREGA, P.; REIS, J. Identidade dos toxoplasmos de aves e de mamíferos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 13, p. 21-28, 1942.

PADORI, E.S.M. **Manual: Manejo de pombos urbanos**. Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Controle de Zoonoses. Divisão Técnica de Controle de Vetores e Roedores. Setor de Culicídeos, 2009. Disponível em: <[http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia\\_saude/ccz/0028/PombosUrbanos.pdf](http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/vigilancia_saude/ccz/0028/PombosUrbanos.pdf)>. Acesso em 18 out. 2011.

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

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

PETRAK, M.; CARPENTER, J. Feline toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 146, p. 728- 734, 1965.

PIASECKI, T., SMIELEWSKA-ŁOS´, E., WIELICZKO, A. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in urban pigeons and goshawks. **Medycyna Weterynaryjna** v.60, p.72–75. 2004

RANVAULD, R.; FREITAS, K.C.; BUCHER, E.H.; DIAS, H.S.; AVANZO, V.C.; ALBERTS, C.C. Diet of Eared Doves (*Zenaida auriculata*, Aves, Columbidae) in a sugar-cane colony in South-Eastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 61, n. 4, p. 651-660, 2001.

REIS, J.; NÓBREGA, P. Toxoplasmose. **Tratado de doenças das aves**. Proc. Ed. Inst. Biológico, p. 302-306, 1936.

REMYINGTON, J.S., McLEOD, R., THULLIEZ, P., DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O., WILSON, C.B., BAKER, C.J. (Eds.), **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 947–1091, 2006.

RENOULT, E.; GEORGES, E.; BIAVA, M.F.; HULIM, C.; FRIMAT, L.; KESSLER, K. Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: reports of six cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 625-634, 1997.

RODRIGUES, E.N. Situation study of pest-birds in Uruguay (*Zenaida auriculata*, *Columba picazuro*, *Myiopsitta monachus*). In: **NINTH LATIN AMERICAN CONGRESS ON ZOOLOGY**. Lima, 1983. Proceedings...Lima: Sociedad Entomologica del Peru., p. 161-168, 1983.

RUIZ, A.; FRENKEL, J.K. Intermediate and transports host of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. **American Journal of Tropical and Hygiene**. v. 29, p. 1161-1166, 1980.

SABIN, A. Zoological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 41, p. 75-80, 1939.

SABIN, A.B.; EICHENWALD, H.; FELDMAN, H.A.; JACOBS, L. Present status of clinical manifestations of toxoplasmosis in man: indications and provisions for routine serologic diagnosis. **Journal of the American Medical Association**. v. 150, p. 1063-1069, 1952.

SALANT, H., LANDAU, D.Y.; BANETH, G. A cross-sectional survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in Israeli pigeons. **Veterinary Parasitology**. v. 165, p. 145-149, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHIBATTA, O.A.; GALVES, W.; CARMO, W.P.D.; LIMA, I.P.; LOPES, E.V.; MACHADO, R.A. A fauna de vertebrados do *campus* da Universidade Estadual de Londrina, região norte do estado do Paraná, Brasil. **Semina**. v.30, n.1, p. 3-26, 2009

SIBLEY, L.D.; BOOTHROYD, J.C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**. v. 359, n. 6, p. 82-85, 1992.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SU, C.; SILVA, A.V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**. v. 175, p. 173-177, 2011.

SOARES, R.M.; SILVEIRA, L.H.; SILVA, A.V.; RAGOZO, A.; GALLI, S.; LOPES, E.G.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 178, p. 29-34, 2011.

SOUSA, E.; JÚNIOR, A.B.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z.; CARRASCO, A.O.T.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K. Prevalence of *Salmonella* spp. antibodies to *Toxoplasma gondii*, and Newcastle diseases virus in feral pigeons (*Columba livia*) in the city of Jaboticabal, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 41, p. 603-607, 2010.

SOUZA, E.A.; TELINO-JÚNIOR, W.R.; NASCIMENTO, J.L.X.; LYRA-NEVES, R.M.; JÚNIOR, S.M.A.; FILHO, C.L.; NETO, A.S. Estimativas populacionais de avoantes *Zenaida auriculata* (Aves Columbidae, DesMurus, 1847) em colônias reprodutivas no Nordeste do Brasil. **Ornithologia**. v.2, p.28-33, 2007.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigli: incontrato nell lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti kala-azar dell'uommo. **Revista Sociedade Science**. v. 3, p. 109-112, 1908.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**. v. 36, p. 841-848, 2006

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

TSAI, Y.J.; CHUNG, W.C.; LEI, H.H.; WU, Y.L. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in pigeons (*Columba livia*) in Taiwan. **The Journal of Parasitology**. v. 92, p. 871, 2006.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

VOLLAIRE, M.R.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in clinically ill cats in the United States. **American Journal of Veterinary Research**. v. 66, p. 874-87, 2005.

WAAP, H.; VILARES, A.; REBELO, E.; GOMES, S.; ÂNGELO, H. Epidemiological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in urban pigeons from the area of Lisbon (Portugal). **Veterinary Parasitology**. v. 157, p. 306-309, 2008.

WIKIAVES. **Mapa de registro da espécie pomba-de-bando (*Zenaida auriculata*)**. 2011. Disponível em: < [http://wikiaves.com.br/mapaRegistros\\_pomba-de-bando&b=1](http://wikiaves.com.br/mapaRegistros_pomba-de-bando&b=1)>. Acesso em: 17 de outubro de 2011.

WOLFSON, F. Mammalian *Toxoplasma* in erythrocytes of canaries, ducks, and duck embryos. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 21, p. 653-658, 1941.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **Aids** v. 07, p. 299- 316, 1993.

YAN, C.; YUE, C.L.; QIU, S.B.; LI, H.L.; ZHANG, H.; SONG, H.Q.; HUANG, S.Y.; ZOU, F.C.; LIAO, M.; ZHU, X.Q. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigeons (*Columba livia*) in Guangdong Province of southern China. **Veterinary Parasitology**. v. 177, p. 371-373, 2011.

YAP, G.S.; SHER, A. Cell-mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*: Initiation, Regulation and Effector Function. **Immunobiology**. v. 201, p. 240-247, 1999.