

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE  
*Toxoplasma gondii* ISOLADAS DE OVINOS DE  
ABATEDOURO

RODRIGO COSTA DA SILVA

Botucatu – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE  
*Toxoplasma gondii* ISOLADAS DE OVINOS DE  
ABATEDOURO

RODRIGO COSTA DA SILVA

Tese apresentada junto ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária para obtenção do título de  
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus*

Silva, Rodrigo Costa da.

Caracterização genotípica de amostras de *Toxoplasma gondii* isoladas de ovinos de abatedouro / Rodrigo Costa da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

Orientador: Helio Langoni

Assunto CAPES: 50502042

1. Ovino - Abate 2. Ovino - Produção 3. Parasitologia veterinária

CDD 636.089696

Palavras chave: Abatedouro; Genotipagem; Ovinos; Técnicas moleculares;  
*Toxoplasma gondii*

Nome do Autor: Rodrigo Costa da Silva

Título: CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE AMOSTRAS DE *Toxoplasma gondii* ISOLADAS DE OVINOS DE ABATEDOURO

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni  
Presidente e Orientador  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes  
Membro  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro  
Membro  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Lisiane de Almeida Martins  
Membro  
Hospital Veterinário  
UNIPAR – Umuarama

Prof. Dr. Luiz Fernando Pita Gondim  
Membro  
Departamento de Patologia e Clínicas  
EMV – UFBA – Salvador

Data da Defesa: 27 de novembro de 2009.

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Mauri e Neide, por todo amor, carinho, companheirismo, respeito, educação e toda experiência transmitida não só durante a Pós-Graduação, mas sim em toda a vida. Ensinarão-me a caminhar, procurar, batalhar, vencer, e o principal, aceitar os momentos difíceis. São meus exemplos, com muita perseverança, coragem, dignidade, incentivo, caráter e amor. Seus cuidados e palavras sempre me foram fundamentais.

*"Há homens que lutam um dia e são bons,  
há outros que lutam um ano e são melhores,  
há os que lutam muitos anos e são muito bons,  
mas há os que lutam toda a vida.  
Estes são imprescindíveis."  
(Bertold Brecht)*

Dedico também ao meu irmão, Marcelo, pelo companheirismo, amizade, respeito e exemplo de profissional que corre atrás dos seus objetivos, independente dos desafios que apareçam em nossas vidas, sempre com bom humor.

*"Ser homem é ser responsável. É sentir que colabora na construção do mundo."  
(Antoine de Saint-Exupéry)*

## *A*GRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pelo dom da vida, e por permitir que a cada dia que me levanto, saúde tenha para desfrutar, felicidade e amor para disseminar e conhecimento para adquirir, e uma família maravilhosa para me orgulhar, amar e ser feliz.

Agradeço aos animais, que concederam suas vidas para a ciência, permitindo realizar esta pesquisa.

Agradeço ao mentor, orientador e sempre amigo Prof. Dr. Helio Langoni por todo o aprendizado, experiência compartilhada, oportunidades de crescimento profissional, incentivo, lição de vida, profissionalismo e sempre acreditar no meu potencial, incentivando e autorizando a realização de Doutorado Sanduíche no exterior. Nosso exemplo de homem e profissional. Muito obrigado, professor!

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paes pela amizade, discussões científicas e aprendizado.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio Garcia Ribeiro pela amizade, discussões científicas e aprendizado.

Agradeço a Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena e a Profa. Dra. Solange Maria Gennari pelo apoio em discussões científicas e contribuição na tese com a indicação e apresentação ao Prof. Dr. Chunlei Su, para realização de Doutorado Sanduíche.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Fernando Pita Gondim pela contribuição na presente tese.

Agradeço a Profa. Dra. Lisiane de Almeida Martins pela amizade e contribuição na presente tese.

Agradeço ao amigo e ao profissional Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva por todas as conversas e troca de experiências científicas, assistência estatística e cooperação em projetos de pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Chunlei Su e toda sua equipe pela amizade, receptividade e oportunidade de estar realizando Doutorado Sanduíche em seu laboratório na Universidade do Tennessee, EUA, e ainda por toda a ajuda na

minha estadia nos Estados Unidos e auxílio nas discussões de artigos, técnicas moleculares e de cultivo celular, além de todo o ensino.

Agradeço todos os profissionais da Universidade do Tennessee, EUA, que de uma forma ou de outra me ajudaram durante minha estadia em Knoxville. Sou muito grato pela experiência, amizade e auxílio.

Agradeço a todos os docentes e funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, pelas conversas, discussões e experiências trocadas.

Agradeço aos sempre amigos André Peres, Fábio Shimabukuro, Priscila Barbante, Juliana Giantomassi, Tatiana Salerno, Amanda Keller e Giovanna, pelo companheirismo, amizade e conversas.

Agradeço aos funcionários Benedito e Marcus pelo auxílio nas coletas nos abatedouros e manutenção das caixas de camundongos no infectório.

Agradeço à Dona Cidinha e Guilherme, pessoas maravilhosas que mesmo nos momentos difíceis sempre disseminaram muita alegria e felicidade. Que Deus os abençoe e dê muita saúde. Muito obrigado!

Agradeço aos residentes e mestrandos da zoonoses, Lucilene, Haroldo, Felipe de Freitas, Leila, Felipe Fornazari e Rozeani por estarem sempre de prontidão para qualquer ajuda necessária.

Agradeço aos amigos Veruska, Juliano, Patrícia Marcella, João Marcelo, Diego, Gustavo, Daniel, Fernanda, Audrey, Thiago, entre tantos outros alunos da área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, pelo convívio diário sempre cultivado com muito conhecimento, amizade, e gratidão.

Agradeço à prima Profa. Dra. Marilene Bargas Rodrigues Alves por todo incentivo e toda torcida, sempre presente em nossa família.

Agradeço aos secretários da Pós Graduação em Medicina Veterinária, José Roberto, Maria e Denise por todo apoio e amizade sempre presentes, e eficiência no serviço. Este agradecimento se estende a toda a Comissão de Pós-Graduação, em nome da Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal, por todo aprendizado e experiência compartilhada durante meu período de representação dos discentes. Agradeço ainda a Pró-Reitoria de Pós-

Graduação da UNESP, pela concessão dos auxílios para minha participação e apresentação de trabalho na Estônia e Holanda.

Agradeço aos funcionários do Biotério Central da UNESP, pelo gentil atendimento, bom humor e boa vontade na disponibilização dos animais.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa e auxílio pesquisa ao referido projeto de pesquisa, registrados sob os números 2006/02486-4 e 2006/07198-7, para a realização do experimento e por permitir minha viagem aos Estados Unidos para realização de Doutorado Sanduíche.

Agradeço as secretárias, Marluci, Malu e Rosângela, do posto FAPESP localizado a Biblioteca Central da UNESP, pelo pronto e gentil atendimento sempre solicitado.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos, que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso profissional, com muito carinho e amor.

Aos demais, que por um fatídico lapso de memória não foram citados, peço desculpas, mas tenham a certeza da minha profunda gratidão.

*A auto-satisfação é inimiga do estudo.  
Se queremos realmente aprender alguma coisa,  
devemos começar por libertar-nos disso.  
Em relação a nós próprios devemos ser  
“insaciáveis na aprendizagem” e  
em relação aos outros, “insaciáveis no ensino”*

*Mao Tsé-Tung*

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes dos abatedouros A e B, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM.....	54
<b>Tabela 2.</b> Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes dos abatedouros A e B, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM, segundo os títulos de anticorpos .....	55
<b>Tabela 3.</b> Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes do abatedouro A, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM, segundo os títulos de anticorpos .....	56
<b>Tabela 4.</b> Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes do abatedouro B, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM, segundo títulos de anticorpos.....	56
<b>Tabela 5.</b> Frequência de ovinos soropositivos para <i>T. gondii</i> pela MAT-AF e/ou RIFI-IgG, de acordo com o sexo, idade, procedência e sistema de criação .....	58
<b>Tabela 6.</b> Frequência de ovinos soropositivos para <i>T. gondii</i> pela MAT-AF e/ou RIFI-IgG, de acordo com a raça.....	59
<b>Tabela 7.</b> Associação entre MAT-AF e RIFI-IgG na pesquisa de anticorpos para <i>T. gondii</i> nos ovinos examinados.....	59
<b>Tabela 8.</b> Correlações entre os títulos de anticorpos nos testes de MAT-AF, MAT-AM e RIFI .....	59
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre os títulos de MAT-AF e RIFI-IgG .....	60
<b>Tabela 10.</b> Comparação entre os títulos de MAT-AM e MAT-AF.....	61
<b>Tabela 11.</b> Comparação entre os títulos de MAT-AM e RIFI-IgG .....	62
<b>Tabela 12.</b> Frequência de resultados de bioensaio de cérebro de ovinos soropositivos, de acordo com o estágio da infecção.....	63
<b>Tabela 13.</b> Frequência de resultados de bioensaio de pulmão de ovinos soropositivos, de acordo com o estágio da infecção.....	63

<b>Tabela 14.</b>	Frequência de resultados de bioensaio de músculo de ovinos soropositivos, de acordo com o estágio da infecção.....	64
<b>Tabela 15.</b>	Relação de amostras soropositivas de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR.....	65
<b>Tabela 16.</b>	Relação de amostras soronegativas, de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR.....	69
<b>Tabela 17.</b>	Frequência de resultados do bioensaio e sorologia, independente do tecido analisado e método sorológico utilizado.....	70
<b>Tabela 18.</b>	Frequência relativa de isolamentos, independente do tecido analisado, segundo o título de anticorpos obtidos pela MAT-AF	71
<b>Tabela 19.</b>	Frequência de isolamentos de acordo com os resultados sorológicos, independente do método sorológico utilizado.....	72
<b>Tabela 20.</b>	Frequência relativa de isolamentos, independente do tecido analisado, segundo o “tipo” de isolamento e títulos obtidos pela MAT-AF.....	73
<b>Tabela 21.</b>	Associação entre os resultados do bioensaio de material cerebral e do pulmão.....	82
<b>Tabela 22.</b>	Associação entre os resultados do bioensaio de material cerebral e do músculo.....	82
<b>Tabela 23.</b>	Associação entre os resultados do bioensaio de material muscular e do pulmão.....	82
<b>Tabela 24.</b>	Frequência de animais positivos a sorologia em relação a PCR dos ovinos, independente do teste e tecido analisado.....	85
<b>Tabela 25.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR dos ovinos, independente do tecido analisado, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF.....	86
<b>Tabela 26.</b>	Frequência de animais positivos a sorologia, independente do teste sorológico utilizado, em relação a PCR de cérebro dos ovinos.....	87
<b>Tabela 27.</b>	Frequência de animais positivos a sorologia, independente do teste utilizado, em relação a PCR de pulmão dos ovinos.....	87

<b>Tabela 28.</b>	Frequência de animais positivos a sorologia, independente do teste utilizado, em relação a PCR de músculo dos ovinos.....	88
<b>Tabela 29.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de cérebro dos ovinos, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF .....	88
<b>Tabela 30.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de pulmão dos ovinos, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF .....	89
<b>Tabela 31.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de músculo dos ovinos, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF .....	90
<b>Tabela 32.</b>	Frequência de resultados da PCR de cérebro dos ovinos em relação o estágio da infecção, independente do teste .....	91
<b>Tabela 33.</b>	Frequência de resultados da PCR de pulmão dos ovinos em relação o estágio da infecção, independente do teste .....	92
<b>Tabela 34.</b>	Frequência de resultados da PCR de músculo dos ovinos de acordo com o estágio da infecção, independente do teste .....	92
<b>Tabela 35.</b>	Associação entre os resultados da PCR de cérebro e pulmão ...	93
<b>Tabela 36.</b>	Associação entre os resultados da PCR de cérebro e músculo .	93
<b>Tabela 37.</b>	Associação entre os resultados da PCR de músculo e pulmão..	93
<b>Tabela 38.</b>	Frequência de resultados da PCR de cérebro dos ovinos em relação ao bioensaio, independente do tecido analisado .....	94
<b>Tabela 39.</b>	Frequência de resultados da PCR de pulmão dos ovinos em relação ao bioensaio, independente do tecido analisado .....	95
<b>Tabela 40.</b>	Frequência de resultados da PCR de músculo dos ovinos em relação ao bioensaio, independente do tecido analisado .....	95
<b>Tabela 41.</b>	Frequência de ovinos soropositivos, independente do teste, em relação a PCR do bioensaio por grupo, independente do tecido analisado.....	96
<b>Tabela 42.</b>	Frequência de ovinos soropositivos, independente do teste, em relação a PCR do bioensaio de cérebro, por grupo .....	96
<b>Tabela 43.</b>	Frequência de ovinos soropositivos, independente do teste, em relação a PCR do bioensaio de músculo, por grupo .....	96

<b>Tabela 44.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR do bioensaio de cérebro por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF ..	97
<b>Tabela 45.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR do bioensaio de músculo por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF .	98
<b>Tabela 46.</b>	Correlações entre os títulos de anticorpos no teste de MAT-AF e variáveis relacionadas à detecção de <i>T. gondii</i> .....	99
<b>Tabela 47.</b>	Resultados da genotipagem de <i>T. gondii</i> isolado de tecidos de ovinos destinados ao abate .....	106
<b>Tabela 48.</b>	Perfil genotípico e de virulência das amostras de <i>T. gondii</i> isoladas dos tecidos ovinos .....	107
<b>Apêndice B.</b>	Sumário de genótipos de <i>T. gondii</i> obtidos pela RFLP-PCR por Pena et al. (2008), além de TgToucan.....	155

## LISTA DE QUADROS

	<b>Páginas</b>
<b>Quadro 1.</b> Genes, oligonucleotídeos iniciadores externos e internos, tamanho e enzimas de restrição .....	52

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Colheita de sangue de ovinos em abatedouro.....	38
<b>Figura 2.</b> Identificação das cabeças segundo protocolo numérico utilizado no dia da colheita.....	39
<b>Figura 3.</b> Diafragma (A), pulmão (B), e coração (C) dos ovinos abatidos..	39
<b>Figura 4.</b> Técnica de aglutinação direta modificada (MAT). Reação positiva (A) e negativa (B).....	43
<b>Figura 5.</b> Protocolo para determinação do perfil sorológico da infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> pela comparação dos resultados da MAT-AM e MAT-AF, adaptado de Montoya et al. (2007).....	44
<b>Figura 6.</b> Correlação entre os títulos da MAT-AF e RIFI-IgG.....	60
<b>Figura 7.</b> Correlação entre os títulos da MAT-AF e MAT-AM.....	61
<b>Figura 8.</b> Correlação entre os títulos da MAT-AM e RIFI-IgG.....	62
<b>Figura 9.</b> Frequência relativa de isolamentos segundo o título de anticorpos obtido na MAT-AF.....	71
<b>Figura 10.</b> Frequência relativa de isolamentos, de acordo com o resultado do bioensaio, segundo o título de anticorpos obtido na MAT-AF.....	73
<b>Figura 11.</b> Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> identificado no coração de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B052.....	74
<b>Figura 12.</b> Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B052.....	75
<b>Figura 13.</b> Taquizoíto de <i>T. gondii</i> identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B185.....	77

<b>Figura 14.</b>	Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B185.....	78
<b>Figura 15.</b>	Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B510.....	79
<b>Figura 16.</b>	Cisto tecidual de <i>T. gondii</i> identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B377 .....	80
<b>Figura 17.</b>	Detecção de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> pela PCR, em água contaminada experimentalmente .....	83
<b>Figura 18.</b>	Detecção de DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> pela PCR, em amostras teciduais de ovinos, contaminadas experimentalmente .....	84
<b>Figura 19.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR dos ovinos, segundo o título de anticorpos obtido na MAT-AF .....	86
<b>Figura 20.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de cérebro dos ovinos, segundo o título de anticorpos na MAT-AF .....	89
<b>Figura 21.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de pulmão dos ovinos, segundo o título de anticorpos na MAT-AF .....	90
<b>Figura 22.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de músculo dos ovinos, segundo o título de anticorpos na MAT-AF .....	91
<b>Figura 23.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de bioensaio de cérebro por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF ..	97
<b>Figura 24.</b>	Frequência relativa de resultados da PCR de bioensaio de músculo por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF .	98
<b>Figura 25.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de isolamentos por grupo.....	100
<b>Figura 26.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos com cistos teciduais por grupo .....	100
<b>Figura 27.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos com taquizoítos por grupo .....	101

<b>Figura 28.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos soropositivos por grupo .....	101
<b>Figura 29.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos.....	102
<b>Figura 30.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de cérebro .....	102
<b>Figura 31.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de pulmão.....	103
<b>Figura 32.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de músculo .....	103
<b>Figura 33.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos com cistos inoculados com músculo .....	104
<b>Figura 34.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos positivos à PCR, inoculados com amostras de cérebro.....	104
<b>Figura 35.</b>	Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos positivos à PCR, inoculados com amostras de músculo.....	105
<b>Figura 36.</b>	Análise filogenética dos isolamentos de <i>T. gondii</i> das amostras de tecidos ovinos, com base em 12 marcadores genéticos.....	108
<b>Figura 37.</b>	Análise filogenética dos isolamentos de <i>T. gondii</i> obtidos no presente estudo, juntamente com os descritos por Pena et al. (2008) no Brasil.....	109
<b>Figura 38.</b>	Mapa referente a localização dos municípios de Santana do Livramento e Uruguaiana, RS, onde os animais positivos com genótipo tipo II eram criados.....	111
<b>Figura 39.</b>	Nested-PCR do gene 18S rRNA.....	112
<b>Figura 40.</b>	RFLP-PCR do gene 18S rRNA para cepas referências digeridas pelas enzimas de restrição <i>AluI</i> e <i>HhaI</i> .....	113
<b>Figura 41.</b>	RFLP-PCR do gene 18S rRNA para cepas referências digeridas pelas enzimas de restrição <i>DdeI</i> , <i>MspI</i> e <i>Hpy188III</i> .....	113

<b>Apêndice A.</b> Parecer de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal .....	154
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	M	Molar
<i>S. tenella</i>	<i>Sarcocystis tenella</i>	mM	Milimolar
<i>S. miescheriana</i>	<i>Sarcocystis miescheriana</i>	μM	Micromolar
<i>S. moulei</i>	<i>Sarcocystis moulei</i>	ATCC	coleção americana de cultura e tecido
<i>S. hominis</i>	<i>Sarcocystis hominis</i>	PA	puro para análise
<i>S. neurona</i>	<i>Sarcocystis neurona</i>	°C	graus centígrados
<i>S. capracanis</i>	<i>Sarcocystis capracanis</i>	2-ME	2-mercaptoetanol
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>	pH	potencial hidrogeniônico
<i>H. hammondi</i>	<i>Hammondia hammondi</i>	V	Voltz
BSA	albumina sérica bovina	<i>P</i>	valor de <i>P</i>
q.s.p.	quantidade suficiente para	$\alpha$	nível de significância
<i>g</i>	aceleração de gravidade (9,8m/s <sup>2</sup> )	$\kappa$	índice kappa
IgM	imunoglobulina M	$\chi^2$	teste de Qui-quadrado
IgG	imunoglobulina G	<i>r</i>	coeficiente de correlação de Spearman
IgA	imunoglobulina A	IC	intervalo de confiança
IgE	imunoglobulina E	OR	odds ratio
g	gramas	VPP	valor preditivo positivo
G	teste estatístico G	VPN	valor preditivo negativo
p.i.	pós-inoculação	p/v	peso/volume
mg	Miligramas	et al.	e colaboradores
μg	Microgramas	S	Sensibilidade
ng	Nanogramas	E	Especificidade
μL	Microlitros	pi	pré-bioensaio
pb	pares de base	po	pós-bioensaio
PM	peso molecular		

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>RESUMO.....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT..</b>	<b>20</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Delineamento experimental.....	37
4.2. Colheita das amostras.....	38
4.3. Cepas de <i>T. gondii</i> .....	39
4.4. Produção de antígeno .....	40
4.5. Exames sorológicos .....	42
4.6. Bioensaio em camundongos (isolamento).....	45
4.7. Genotipagem das amostras de <i>T. gondii</i> .....	46
4.8. Análise filogenética.....	51
4.9. Análise dos dados .....	53
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
5.1. Sorologias .....	54
5.2. Bioensaio em camundongos .....	63
5.3. Biologia molecular .....	82
<b>VI. DISCUSSÃO .....</b>	<b>114</b>
<b>VII. CONCLUSÕES .....</b>	<b>131</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>132</b>
<b>ARTIGO PUBLICADO .....</b>	<b>148</b>

DA SILVA, R.C. **Caracterização genotípica de amostras de *Toxoplasma gondii* isoladas de ovinos de abatedouro**. Botucatu, 2009. 156p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasito de grande importância no contexto de produção animal e saúde pública, sendo importante patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos. Este estudo objetivou determinar a soroprevalência de toxoplasmose em ovinos de abatedouros do estado de São Paulo, e a variabilidade genotípica dos isolamentos obtidos. A presença de anticorpos para *T. gondii* foi pesquisada em 602 amostras de soro pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação direta modificada (MAT), com antígeno fixado pelo metanol (AM) e formalina (AF). Bioensaio em camundongos e pesquisa do DNA do parasito pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) do gene 529 pares de bases (pb), repetitivo 300 vezes no genoma do parasito, foi realizado com cérebro, pulmão e músculo (“pool” de diafragma e coração) dos ovinos soropositivos. Das amostras positivas à PCR realizou-se a genotipagem pelas técnicas de multilocus-, nested-PCR e polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP-PCR) em 12 *loci* (SAG1, 5’SAG2, 3’SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, *PK1*, Apico, CS3), adicionado de ROP18Del e ROP18UPS, além da confirmação do parasito pelo *locus* 18S rRNA, diferenciando de *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, *S. moulei*, *S. miescheriana*, *S. hominis*, *S. capracanis* e *S. tenella*. 66/602 (11,0%) amostras de soro foram positivas para algum teste sorológico, com maior sensibilidade da MAT-AF, utilizado como teste de triagem. Amostras teciduais de 20/66 (30,3%) animais foram positivas ao isolamento, sendo detectados cistos em 12, taquizoítos em quatro e somente sorologia positiva em outras quatro. Detectou-se o DNA do parasito em amostras de 22/66 (33,3%) animais. O genótipo completo foi obtido em somente 13/22 (59,1%). Dez genótipos diferentes foram identificados, sendo seis novos genótipos. Duas amostras apresentaram tipo II, e foram isoladas da raça Polwarth (Ideal) com criação extensiva em Santana

do Livramento e Uruguaiana, RS. Outras duas amostras das mesmas cidades apresentaram co-infecção por *Sarcocystis tenella*, determinado a partir do sequenciamento do produto da nested-PCR do gene 18S rRNA, e desafiado à base de dados do GenBank (número de acesso L24.383-1). Estes resultados confirmam a variabilidade genotípica do parasito no Brasil, primeiro registro e co-infecção *S. tenella* e *T. gondii* em ovinos no Brasil, e indicam o primeiro registro do tipo II clonal de *T. gondii* na América do Sul, principal responsável pela ocorrência da doença em humanos imunocomprometidos.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; ovinos; abatedouro; genotipagem; técnicas moleculares.

DA SILVA, R.C. **Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* samples from sheep from slaughterhouse**. Botucatu, 2009. 156p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is a parasite with high importance to the animal production and public health, being important opportunistic pathogen in immunocompromised patients. This study was aimed to determine the seroprevalence of toxoplasmosis in ovines in slaughterhouses from State of de São Paulo, and the genotypic variability of the obtained isolates. *T. gondii* antibodies were researched in 602 serum samples by indirect fluorescent antibody test (IFAT) and modified agglutination test (MAT), with methanol- (AM) and formalin-fixed antigen (AF). Bioassay in mice and the research of DNA by polymerase chain reaction (PCR) of gene 529 base pairs (bp), 300 times repetitive in parasite genome, was assayed with brain, lung and muscle ("pool" of diaphragm and heart) from seropositive ovines. Genotyping of the PCR positive samples was performed by multilocus-, nested-PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) in 12 *loci* (SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, *PK1*, Apico and CS3), added of ROP18Del and ROP18UPS, beyond the confirmation by 18S rRNA *locus*, to differentiate *Hammondia hammondi*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, *S. moulei*, *S. miescheriana*, *S. hominis*, *S. capracanis* and *S. tenella*. 66/602 (11.0%) serum samples were positive to, at least, one serological test with high sensitivity to MAT-AF, used as screening test. Tissue samples of 20/66 (30.3%) animals were positive to the isolation, being detected cysts in 12, tachyzoites in four and in other four only positive result to the serology. DNA of the parasite was detected in samples of 22/66 (33.3%) animals. The complete genotype was detected in only 13/22 (59.1%). Ten different genotypes were identified, with six new genotypes. Two samples presented type II, isolated from Polwarth (Ideal) breed, bred extensively in Santana do Livramento and Uruguaiana, RS. Two other samples, from the same cities, presented co-infection with *Sarcocystis tenella*, detected by sequencing of nested-PCR

product of 18S rRNA gene, blasted to GenBank database (access number L24.383-1). These results confirmed the genotypic variability of *T. gondii* in Brazil, the first register and co-infection of *S. tenella* and *T. gondii* in sheep in Brazil, and indicate the diagnosis by the first time of clonal type II of the parasite in South America, main responsible for the occurrence of the disease in immunocompromised humans.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; sheep; slaughterhouse; genotyping; molecular techniques.

## I. INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário, parasito intracelular obrigatório, amplamente distribuído, capaz de infectar grande variedade de hospedeiros. Classificado no filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, família Sarcocystidae, é o causador da toxoplasmose, podendo infectar todos os animais homeotérmicos, inclusive humanos. A toxoplasmose é uma das zoonoses parasitárias mais comuns, causando também perdas econômicas significativas à pecuária, principalmente para a ovinocultura. O seu ciclo de vida é facultativamente heteroxeno apresentando como hospedeiros definitivos os gatos e outros felídeos e, como hospedeiros intermediários, os demais animais homeotérmicos, como os de produção. É responsável por altos índices de abortamentos, principalmente em ovinos. Apresenta considerável relevância quanto aos aspectos de produção animal, bem como para a saúde pública, pela transmissão pelos alimentos provenientes de animais infectados, sendo ainda uma zoonose oportunista em pacientes positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou que apresentam imunodeficiência severa (TENTER et al., 2000).

Por estas razões, a toxoplasmose é considerada uma das parasitoses de maior importância médica e veterinária, com necessidade do aprimoramento de técnicas diagnósticas de maior eficácia e precisão temporal da infecção. A grande maioria dos animais infectados por *T. gondii* resiste à infecção, tornando-se portadores, de modo que a toxoplasmose-infecção é muito difundida (CORRÊA & CORRÊA, 1992) e uma das mais comuns nos humanos, em todo o mundo (DUBEY et al., 1998; TENTER et al., 2000). A toxoplasmose-doença é mais rara, apesar de sua distribuição mundial.

A infecção pelo *T. gondii* constitui uma das zoonoses mais difundidas no mundo. Estima-se que até 500 milhões de pessoas estejam infectadas (DUBEY, 1996). Em todos os países, grande parte da população humana e animal (mais de 300 espécies de animais entre mamíferos e aves – domésticos ou silvestres) apresentam parasitismo pelo *T. gondii*. Há estimativa de custos de US\$ 369-8.756 milhões em relação à toxoplasmose congênita (ROBERTS e FRENKEL, 1990). Nos mais variados climas e condições sociais

chega a apresentar uma percentagem de indivíduos positivos que varia de 20 a 83% (1 a 2 bilhões de pessoas) da população.

Em algumas regiões, 40 a 70% de humanos adultos, aparentemente saudáveis, apresentam-se sorologicamente positivos. O número de pessoas com sorologia positiva para *T. gondii* é enorme sendo, talvez, o protozoário mais difundido entre a população humana e animal, incluindo as aves e excetuando-se os animais de sangue frio, como os répteis (DUBEY et al., 1998; TENTER et al., 2000). Nos Estados Unidos da América, pela análise dos dados de nove sistemas nacionais de notificação em saúde e dados publicados em periódicos especializados, estimam-se 1.500.000 infecções anuais, sendo cerca de 15% sintomáticas (MEAD et al., 1999).

A genotipagem em vários *loci* é necessária para revelar genótipos recombinantes e alelos atípicos, mais frequentemente encontrados em isolamentos obtidos em áreas remotas ou ambiente selvagem, avaliar a diversidade genética da população de *T. gondii*, encontrar os fatores genéticos que podem influenciar a virulência, entender eventuais mecanismos de seleção de genótipos de acordo com a espécie hospedeira e tentar encontrar relações entre o genótipo e a doença em humanos (DARDÉ, 2004; 2008).

## II. REVISÃO DE LITERATURA

Os humanos e os animais podem infectar-se pelas três formas do ciclo de vida do parasito: (1) via oral pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos e infectantes após esporulação no ambiente, (2) pela ingestão de cistos em tecidos de hospedeiros intermediários, e (3) via uterina pela transmissão transplacentária de taquizoítos. Pode ainda, ser transmitido a partir de produtos sanguíneos, nos transplantes de órgãos, ou pela ingestão de taquizoítos em leite caprino não submetido ao tratamento térmico pelo calor (TENTER et al., 2000; KIJLSTRA e JONGERT, 2009).

O taquizoíto é a forma encontrada durante a fase aguda da infecção, dentro de vacúolos parasitóforos de diferentes tipos de células, como nas do sistema fagocítico mononuclear, células hepáticas, pulmonares, nervosas, submucosas e musculares. Os bradizoítos são encontrados em cistos teciduais localizados predominantemente no sistema nervoso central (SNC), globo ocular, bem como nos músculos esquelético e cardíaco. O oocisto é a forma de resistência que possui uma parede dupla bastante resistente às condições ambientais, produzidos nas células intestinais de felídeos não imunes, e eliminados imaturos junto com as fezes, caracterizando o estágio enteroepitelial (TENTER et al., 2000).

Após o nascimento, os humanos infectam-se, na maioria das vezes, pela ingestão de oocistos esporulados encontrados no meio-ambiente, ou pela ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida de hospedeiros intermediários. A variação da prevalência parece ser devida a fatores climáticos, geográficos, hábitos alimentares, tipo de trabalho e hábitos culturais, indicando que os mecanismos de transmissão devem ocorrer de várias formas do parasito (TENTER, 2009; DUBEY et al., 2005b).

Estimativas atuais indicam que 1/50 da população norte-americana sofre de algum grau de imunodeficiência, o que pode contribuir para uma maior susceptibilidade a doenças oportunistas. Nesta população incluem-se mulheres grávidas, pessoas com mais de 65 anos de idade, pacientes sob tratamento para câncer, transplantados e portadores do HIV. O estado imunodeficiente

destes indivíduos pode colocá-los em risco de contrair toxoplasmose ou de reativação de infecções crônicas (TENTER et al., 2000; TENTER, 2009).

A toxoplasmose em humanos é na maioria das vezes benigna e assintomática em 60% dos casos (SAWADOGO et al., 2005). Entre 15 e 85% da população humana adulta é cronicamente infectada com *T. gondii*, dependendo da localização geográfica (DUBEY e BEATTIE, 1988). Nos Estados Unidos, a toxoplasmose foi responsável por cerca de 5.000 hospitalizações entre 1992 e 1996, com pelo menos 2.500 casos de origem alimentar, representando 4,1% das internações causadas por infecções alimentares. Foram registrados 750 óbitos por toxoplasmose, com cerca de 50% de infecções adquiridas pelo consumo de alimentos contaminados, o que representa 20,7% das mortes associadas às infecções de origem alimentar, inferior somente de *Salmonella* (30,6%) e de *Listeria monocytogenes* (27,6%). O desenvolvimento de casos crônicos da doença, como nos casos de infecção pela via congênita, com desenvolvimento de corioretinite e os casos de pacientes infectados pelo HIV, é estimado em 4.700 a 12.100 casos anuais (MEAD et al., 1999; DUBEY et al., 2005b).

Quanto aos animais, *T. gondii* tem sido relatado como importante agente causador de abortamentos na espécie ovina desde 1954, considerado uma das maiores causas de problemas reprodutivos nesta espécie. A avaliação dos dados de literatura aponta a toxoplasmose como a causa primária de perdas em 10 a 20% dos rebanhos com problemas de abortamento, absorção fetal e natimortos, com incidência anual de 1 a 2% (MASALA et al., 2003). Freyre et al. (1997) registraram taxas de abortamento no Uruguai variando de 28,7% a 38,5% em 2,5 anos de estudo, indicando taxa de 9,8% de incidência no período, com perdas reprodutivas variando de 1,4 a 3,9% e prejuízo anual de US\$ 1,4-4,7 milhões.

Além de causar prejuízos à pecuária, a toxoplasmose ovina tem impacto também na saúde humana, pois o animal infectado pode manter cistos teciduais durante longos períodos (BUXTON, 1990), e o consumo de sua carne pode levar a infecção humana. Por outro lado, placentas e fetos infectados com cistos de *T. gondii* servem como fontes de infecção para roedores, aves e gatos. A ingestão de roedores e pássaros infectados por gatos pode levar a

excreção de grande número de oocistos de *T. gondii*, favorecendo a disseminação e persistência do agente na natureza (TENTER et al., 2000).

Entre os animais de produção, os ovinos e caprinos apresentam-se mais suscetíveis à infecção toxoplásmica, quando comparados aos bovinos. De acordo com vários estudos, a soroprevalência é variável de 22,5% a 55,7%. Sawadogo et al. (2005) obtiveram 27,6% animais soropositivos em Marrocos, comparado a Oncel e Vural (2006) e Sevgili et al. (2005) na Turquia, que obtiveram 56/181 (31%) e 167/300 (55,66%), e a Hamzavi et al. (2007), detectando 54/240 (22,5%) ovinos no Irã.

Ducanson et al. (2001) verificaram que a transmissão congênita é capaz de explicar a manutenção do parasito em populações de ovinos sem a necessidade de reinfecções frequentes por oocistos excretados por gatos, obtendo 94% de tecidos fetais e 42% de tecidos placentários positivos à reação em cadeia pela polimerase (PCR). A ocorrência da transmissão vertical, o grau de virulência e a severidade da doença dependem de fatores como genótipo do parasito, hospedeiro, forma parasitária, dose infectante e via de infecção, além da duração da infecção antes da prenhez (DUBEY et al., 2002).

Dumètre et al. (2006) verificaram na França que 65,6% dos animais soropositivos eram adultos (mais de um ano de idade). Klun et al. (2006), na Sérvia, observaram o mesmo fato em 70 a 90% dos ovinos, e Clementino et al. (2007), em Lages, Brasil, em 51,85%. Vesco et al. (2007) observaram que 39,7% dos animais soropositivos tinham idade inferior a um mês de idade, e 57,5% superior a 36 meses.

Quando se analisa a idade e o grau de imunidade em ruminantes, deve-se considerar que as IgM não são transmitidas pelo colostro, somente as IgG. Além disso, as IgG maternas são transferidas aos cordeiros pelo colostro somente até três meses de idade (DUMÈTRE et al., 2006). Animais com idade inferior a três meses, soropositivos para IgG, podem ser interpretados como proteção conferida pelos anticorpos maternos como também pela própria imunidade desenvolvida pelo cordeiro ainda no útero, e a presença de IgM indica resposta imunológica ativa do hospedeiro, de caráter agudo.

Referente ao sexo, as fêmeas são mais predispostas à infecção (SEVGILI et al., 2005; DUMÈTRE et al., 2006; CLEMENTINO et al., 2007;

ROMANELLI et al., 2007) e a manifestação clínica é mais intensa durante a gestação, além da possibilidade de abortamentos.

Os ovinos são muitas vezes criados em ambientes contaminados com oocistos, e a infecção ocorre após a ingestão de água e/ou alimentos contaminados. As pastagens adubadas com esterco e restos de cama de locais frequentados pelos felídeos são as principais vias de transmissão. Desta forma, os felídeos são os maiores responsáveis, por terem facilidade de acesso aos abrigos dos ovinos e ao alimento estocado, onde defecam em alimentos, como feno e grãos, com considerável risco de contaminação para os animais (KLUN et al., 2006).

Os ovinos são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* e a prevalência de anticorpos entre eles é geralmente maior que em outros herbívoros domésticos. Apesar da importância dos levantamentos de anticorpos séricos como instrumento de vigilância epidemiológica, apenas o isolamento de parasitos viáveis de produtos cárneos permite avaliar o fator de risco para a saúde pública (ASPINALL et al., 2002).

A maioria dos surtos de toxoplasmose em humanos tem sido atribuída ao consumo de carne crua ou mal cozida (KIJLSTRA e JONGERT, 2009), e em pelo menos um deles, ficou bem determinado que a via de transmissão de seis de sete membros de uma família acometida de toxoplasmose aguda foi a carne de cordeiro mal cozida. Bonametti et al. (1997) relataram, no Brasil, surto de toxoplasmose aguda em 17 indivíduos, sintomáticos, após o consumo de carne crua de carneiro, na forma de quibe.

Entre os três estágios infecciosos de *T. gondii*, os oocistos são mais virulentos do que os taquizoítos ou bradizoítos para hospedeiros não felinos (DUBEY e BEATTIE, 1988). Os oocistos não são patogênicos para gatos (DUBEY, 2006). Tem-se verificado que os isolados da América do Sul, em comparação as da Europa e América do Norte, são mais virulentas quando avaliadas pelo bioensaio em camundongos (DUBEY et al., 2006c; 2007a; CAVALCANTE et al., 2007).

Fatores de risco podem predispor os animais de produção. Os principais descritos na literatura são a presença de gatos na criação, pois eles mantêm a eliminação dos oocistos no solo, principalmente quando jovens, contaminando o solo, fontes de água de superfície e pastagens com alta carga

parasitária, aumentando a soroprevalência em animais não carnívoros (ONCEL e VURAL, 2006; VESCO et al., 2007; ROMANELLI et al., 2007).

Masala et al. (2003) observaram que a disseminação de oocistos por gatos, em Sardenha, Itália, foi o fator responsável por 11% dos abortamentos ovinos. Vesco et al. (2007) identificaram 937/1876 (49,9%) ovinos soropositivos ao ELISA, na Sicília, Itália, e 54/62 (87%) das propriedades estudadas apresentavam pelo menos um animal soropositivo, e a presença de gatos e águas de superfície.

As provas sorológicas possibilitam a detecção da resposta do hospedeiro, frente à infecção, diferenciando seu estágio. Thulliez et al. (1986) definiram a importância da técnica de aglutinação utilizando taquizoítos inativados pelo metanol (MAT-AM) e formalina (MAT-AF), para quantificar os níveis de IgG de diferentes estágios da infecção, permitindo distinguir a fase aguda da fase crônica da infecção. A MAT não permite detectar a ação da IgM, que é uma imunoglobulina inespecífica. Pode ser utilizada para testar soros de qualquer espécie animal sem a necessidade de conjugado espécie-específico. Muitos inquéritos são realizados utilizando-se a MAT em diversas espécies animais, como em ovinos, com 24,2% de soropositividade entre 495 amostras no Brasil (RAGOZO et al., 2008).

*T. gondii* possui estrutura populacional altamente clonal (HOWE e SIBLEY, 1995), que consiste predominantemente de três linhagens, designadas I, II e III, indicando que sua propagação na natureza ocorre principalmente pela replicação assexuada ou por cruzamentos uniparenterais.

As cepas tipo I de *T. gondii* ocorrem predominantemente em casos de toxoplasmose aguda, enquanto que as cepas do tipo II são prevalentes em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida – Aids e na toxoplasmose congênita em humanos (HOWE e SIBLEY, 1995; FUENTES et al., 2001). As cepas tipo II têm sido identificadas como o genótipo prevalente tanto em animais como nos humanos (HOWE e SIBLEY, 1995; HONORÉ et al., 2000).

Segundo o estudo de Howe e Sibley (1995), a frequência das cepas tipo III é maior em animais do que em humanos, devendo-se considerar que, em geral, as amostras de *T. gondii* provenientes de casos humanos causam

doença clínica, enquanto que a maioria das amostras provenientes de animais é de infecções crônicas e subclínicas.

De acordo com Lehmann et al. (2000) variantes podem estar melhor adaptadas a diferentes hospedeiros intermediários. É importante a análise de maior número de amostras, originárias de múltiplas fontes de infecção, para avaliação de possíveis associações entre genótipos e a doença nos humanos e animais (OWEN e TREES, 1999).

Literak et al. (1998) analisaram 20 cepas de *T. gondii* isoladas de animais na República Tcheca, a partir do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição pela reação em cadeia pela polimerase (RFLP-PCR) do DNA genômico, e constataram que nove pertenciam a um genótipo não virulento e somente uma a um genótipo virulento. Owen e Trees (1999) determinaram que os tecidos naturalmente infectados pelo parasito, em 13 fetos ovinos, dois roedores selvagens e dois camundongos inoculados com material de cordeiros infectados, pertenciam ao genótipo II, indicando que os ovinos podem ser fontes potenciais de infecção para estes indivíduos. Dubey et al. (2002) isolaram 16 cepas do tipo I e nove do tipo III a partir de 82 galinhas assintomáticas no estado de São Paulo, e Dubey et al. (2003) isolaram sete cepas do tipo I e seis do tipo III a partir de 40 galinhas no estado do Paraná.

A possibilidade de que o genótipo do parasito tenha influência sobre a severidade da doença humana tem suporte nas diferenças de virulência das cepas em modelos experimentais animais, em trabalhos realizados nos EUA e Europa. As cepas do tipo II e III levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, enquanto que as cepas do tipo I são extremamente virulentas para camundongos, causando níveis significativos de parasitemia, aumentando o risco de transmissão transplacentária ou severidade de infecção fetal (HOWE e SIBLEY, 1995).

Em Botucatu, SP, foram analisadas nove cepas de *T. gondii* isoladas de amostras cerebrais oriundos de 111 cães com sinais neurológicos, dos quais quatro classificadas como genótipo I e cinco como genótipo III, pela RFLP-PCR do gene SAG2. Todas foram virulentas para camundongos (DA SILVA et al., 2005).

Helmick et al. (2002), no Reino Unido, identificaram 39,5% (167/660) de soropositividade pelo teste de aglutinação em látex (LAT) em ovinos que

havia abortado. Em Sardenha, Itália, Masala et al. (2003) observaram que a disseminação de oocistos por gatos, em Sardenha, Itália, foi o fator responsável por 11% dos abortamentos ovinos. Estes autores, identificaram 2.048 (28,4%) ovinos soropositivos para RIFI-IgG e 652 (9%) para RIFI-IgM, entre as 7.194 amostras de soro ovino examinadas. Dentre 2.471 amostras ovinas, a PCR da placenta apresentou a maior positividade. Os dados sorológicos foram semelhantes aos observados por Pereira-Bueno et al. (2004), na Espanha, com 23,1% (40/173) fetos soropositivos na RIFI, ELISA, histologia e/ou nested-PCR. Assim, verifica-se variação de soroprevalência de 4 a 92%, na Europa (TENTER et al., 2000). No Brasil, a prevalência de anticorpos IgG na população humana varia de 54% na Região Centro-Oeste a 75% na Região Norte do país. No estado do Rio de Janeiro 77,1% das gestantes são soropositivas para IgG, no estado de Pernambuco, 69,4%, e no estado do Rio Grande do Sul, 74,5% (GALISTEU et al., 2007).

A detecção molecular do DNA de *T. gondii* não substitui os métodos sorológicos tradicionais no diagnóstico da doença. Assim, a associação destes dois métodos pode revelar a infecção e estabelecer o seu estágio (KOMPALIC-CRISTO et al., 2004). É importante a detecção molecular mais detalhada do agente, permitindo caracterizar a estrutura populacional clonal. A caracterização fenotípica da infecção estará intimamente ligada às variações ocorridas dentro desta estrutura populacional.

*T. gondii* era considerado clonal antigamente e com baixa variabilidade genética. Contudo, a maior parte das informações foi derivada de isolamentos da Europa e América do Norte. Utilizando novos marcadores moleculares para a caracterização genética de cepas isoladas no Brasil e Guiana Francesa, verificou-se maior variabilidade genética em comparação às já registradas (AJZENBERG et al., 2004).

A análise das sequências polimórficas determina a cepa (SWITAJ et al., 2005). A maioria dos estudos de genotipagem de *T. gondii* é baseada na análise da RFLP-PCR do gene SAG2, porém este apresenta problemas técnicos, como a sua amplificação incompleta (FUENTES et al., 2001) e digestão incompleta do DNA pelas enzimas de restrição (LEHMANN et al., 2000), que são limitantes na reprodutibilidade. Há limitações na genotipagem de cepas baseada somente em um ou dois *loci* (LEHMANN et al., 2000;

AJZENBERG et al., 2002), pois exclui a possibilidade de identificação de genótipos recombinantes. Em contrapartida, a análise multilocus permite detectar eventos recombinantes e alelos atípicos, propiciando o melhor entendimento da estrutura populacional do *T. gondii*, para se estabelecer a relação do genótipo com a doença clínica (AJZENBERG et al., 2005).

Atualmente, a análise do perfil genotípico das amostras e cepas de *T. gondii* têm se baseado, principalmente, na análise de alelos recombinantes comuns no Brasil (PENA et al., 2008). Antigamente a avaliação baseada no *locus* SAG2 permitia a caracterização dos três genótipos baseados em isolamentos obtidos na Europa e América do Norte. Entretanto, verificou-se que as amostras comportavam-se fenotipicamente diferentes, com os mesmos genótipos. A análise em multilocus é importante para a avaliação desta diversidade em várias regiões do DNA do parasito (KHAN et al., 2005; DUBEY et al., 2006b; SU et al., 2006; FAZAELI e EBRAHIMZADEH, 2007).

Dubey et al. (2005a), utilizando frangos da Colômbia, obtiveram soroprevalência de 44,4%, isolando-se o agente em 24 amostras. A análise pelo *locus* SAG2 revelou sete isolamentos tipo I e 17 tipo III, similares aos obtidos no Brasil, porém diferentes da América do Norte e Europa. Em contraste, Dumètre et al. (2006), pesquisando o parasito em ovinos de abatedouro na França, isolaram oito amostras do coração, todas caracterizadas pelos *loci* TUB2, TgM-A, W35, B17 e B18, como tipo II, comum nos países europeus e considerado avirulento para camundongos. Utilizando os mesmos marcadores, Zia-Ali et al. (2007) identificaram dois genótipos (tipos II e III) em quatro isolamentos de 24/105 (22%) ovinos soropositivos pela LAT no Irã, sem a presença de infecções mistas.

Os genótipos recombinantes ou genótipos com alelos atípicos representam somente 5 a 10% na maior parte das coleções de isolamentos (HOWE e SILBEY, 1995), mas eles são mais frequentes entre as amostras de isolamentos de espécies hospedeiras exóticas ou de áreas remotas geograficamente ou de pacientes com apresentação clínica incomum. Além disso, as cepas recombinantes e cepas atípicas são resultados de pressões seletivas sobre a mais antiga cepa ancestral (tipo III), com forte influência sobre a virulência (KHAN et al., 2009). A tipificação genética baseada em um ou dois *loci* é muito limitada para detectar cepas recombinantes e atípicas,

caracterizadas por alelos incomuns em outros *loci*. Estudos baseados na genotipagem somente do *locus* SAG2 devem ser reconsiderados (DARDÉ, 2004; SU et al., 2006).

Dubey et al. (2006a) encontraram 47/85 (55,39%) frangos soropositivos pela MAT no Chile e isolaram o agente de 22 animais. Ao se analisar o polimorfismo nos *loci* SAG1, SAG2, SAG3, BTUB e GRA6, detectaram três genótipos. Destes, 17 isolamentos tinham alelos tipo II, quatro alelos tipo III, e um tinha combinação de alelos tipo I e III. Genotipicamente e fenotipicamente, os isolamentos obtidos no Chile em frangos se comportaram de forma similar aos da América do Norte, e diferentemente aos do Brasil e Colômbia, onde não há registro de isolamento de alelo tipo II. Em comparação, Dubey et al. (2006b) obtiveram 47 isolamentos de 85,70% frangos soropositivos, na Nicarágua, onde pela análise nos mesmos *loci* citados acima, oito genótipos foram caracterizados, apresentando os três genótipos clássicos de *T. gondii* obtidos no Velho Mundo, dois isolamentos com infecções mistas e 27 isolamentos com recombinações de alelos do tipo I e III, perfazendo quatro novos genótipos. Deste modo, se reconhece atualmente a presença de genótipos recombinantes, principalmente nos países da América do Sul (DUBEY et al., 2007a).

O estudo conduzido por Ferreira et al. (2006) permitiu, pela RFLP-PCR em oito *loci*, a constatação que 20 isolados de *T. gondii* oriundos de humanos e animais no Brasil, tinham genótipos recombinantes, com alelos característicos dos tipos I, II e III, justificado pela formação de recombinantes a partir do cruzamento entre membros de linhagens clonais. Este é o primeiro relato de cepas recombinantes de *T. gondii* no Brasil em hospedeiros diferentes. Isto sugere que combinações diferentes de alelos em vários *loci* podem ser responsáveis pela heterogeneidade observada na virulência das cepas de *T. gondii* (Sibley et al., 2002).

Vários estudos têm ilustrado a alta frequência de cepas tipo I e III, e a ausência de cepas tipo II (DUBEY et al., 2002; 2003). Contudo nestes estudos a análise em somente um ou dois *loci* não identificou as cepas brasileiras como híbridos.

Para permitir melhor avaliação da diversidade, Su et al. (2006) e Dubey et al. (2007e) padronizaram a utilização de mais seis marcadores

moleculares, totalizando 11 (SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, alt-SAG2, Apico), que permitem melhor avaliação da diversidade genética nas populações de *T. gondii*.

Su et al. (2006) verificaram pela RFLP-PCR em nove *loci*, que amostras de *T. gondii* de diferentes fontes, podem ser distinguidas e revelar a diversidade genética dos parasitos, com a limitação de não distinguir isolamentos de uma mesma linhagem clonal. Para resolver esta limitação, a análise de microssatélites pode ser utilizada em combinação com os marcadores de RFLP-PCR, o que é facilitado pela utilização da multiplex-PCR de microssatélites, desenvolvida para a tipagem de *T. gondii* (AJZENBERG et al., 2005).

A análise em multiplex-PCR é mais indicada que a RFLP-PCR, pois nem todo polimorfismo de comprimento pode ser devido a um polimorfismo de comprimento de regiões microssatélites, mas de raras inserções ou deleções de sequências, que são detectadas pela multiplex-PCR, com cinco marcadores (AJZENBERG et al., 2005).

Cavalcante et al. (2007), estudando seis *loci* gênicos do *T. gondii* (SAG2, SAG3, GRA6, L363, cS10-A6, cB21-4) em cabras, obtiveram 10/169 (5,9%) animais soropositivos, no estado do Ceará, Brasil, com somente dois isolamentos do parasito apresentando genótipos recombinantes, diferentes dos tipos I, II e III originalmente isolados no Velho Mundo.

Dubey et al. (2006c) identificaram 15 isolamentos de 45,2% gatos soropositivos na Colômbia. A presença dos genótipos tipo I e II, e 11 isolamentos com alelos tipo I e III e alguns *loci*, caracterizando três novos perfis de genótipos, e infecção mista em um gato. Assim, salienta-se a possibilidade da ocorrência da mesma, e a possibilidade de identificação quando analisado por mais *loci*, ao invés de somente o SAG2. Com isso, verifica-se que na América do Sul, múltiplos genótipos de *T. gondii* estão circulantes, permitindo a ocorrência de infecções mistas.

Diversos autores tem confirmado a alta diversidade genética do parasito na América do Sul sendo isolado de diversas espécies animais como cabras no Ceará, Brasil (CAVALCANTE et al., 2007), em cães (DUBEY et al., 2007c) e gatos, na Colômbia (DUBEY et al., 2006c), e em frangos na Nicarágua (DUBEY et al., 2006b) e no Brasil (DUBEY et al., 2007e).

Dubey et al. (2007c) obtiveram 20 isolamentos de 52/309 (16,8%) cães soropositivos na Colômbia, com dez genótipos expressos, sendo todos diferentes geneticamente como relatado por Dubey et al. (2005a) e Dubey et al. (2007e), com alta diversidade e população parasitária distinta. Dubey et al. (2007d) identificaram dois genótipos a partir de 17 isolamentos em gatos na China, confirmando a circulação de poucos genótipos nos países asiáticos. Por outro lado, no Brasil, Dubey et al. (2007e) obtiveram de frangos nos estados do Pará e Rio Grande do Sul, 11 e sete genótipos, respectivamente, a partir de 34 isolamentos (15 no PA; 19 no RS). Não houve infecções mistas, porém verificou-se que no Pará estavam presentes diversas combinações dos alelos I, II e III, enquanto no Rio Grande do Sul prevaleceram os genótipos tipo I ou III.

Baseado no estudo dos 11 novos marcadores moleculares, Dubey et al. (2007a), a partir de 8/21 (38%) isolamentos de 21/42 (50%) de cães saudáveis soropositivos do Vietnã, obtiveram dois genótipos distintos, o que permitiu caracterizá-los como originários de regiões com alta diversidade genética, como Colômbia e outros países da América do Sul (DUBEY et al., 2007c). Em outro estudo, Dubey et al. (2007b) obtiveram quatro genótipos a partir de 23 isolamentos positivos em cães do Sri Lanka, sendo três, tipo III (#1), e os demais com recombinações em diferentes *loci* (#2), ou alelos únicos em determinados *loci*. Dos quatro genótipos obtidos, dois foram considerados únicos, comparados aos isolados em cães (DUBEY et al., 2007c), gatos (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007d) e frangos (DUBEY et al., 2007e; 2008b), e o último foi o mesmo obtido nos outros estudos, o que poderia indicar a disseminação do parasito.

Recentemente, os estudos de genotipagem têm sido embasados na pesquisa em 12 *loci* gênicos (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, alt-SAG2, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3), como descrito por Pena et al. (2008), confirmando haver uma população clonal de *T. gondii* muito variada. Deste modo, o encontro de infecção mista em hospedeiros intermediários levará à maior diversidade genética entre diferentes linhagens do parasito a medida que os hospedeiros intermediários são presas dos hospedeiros definitivos, o que facilitará a evolução do *T. gondii* (DUBEY et al., 2006b; PENA et al., 2008; DARDÉ et al., 2008; KHAN et al., 2009).

Considerando a necessidade de identificação dos genótipos, alelos e recombinação em linhagens de *T. gondii* no Brasil, que contribuíram no esclarecimento da virulência do parasito, na epidemiologia da infecção e nos reflexos em saúde pública, o presente estudo objetivou determinar o perfil de anticorpos para *T. gondii* em ovinos destinados ao abate, isolar o parasito de amostras teciduais dos ovinos soropositivos, caracterizar e analisar os genótipos das amostras isoladas, pela RFLP-PCR para 12 diferentes sequências gênicas, e analisar o perfil genotípico dos isolados.

### **III. OBJETIVOS**

#### **Objetivos Gerais**

Os objetivos deste trabalho foram estudar a prevalência da toxoplasmose em ovinos destinados ao abate em abatedouros do estado de São Paulo, pela presença de anticorpos específicos, isolar o parasito, realizar a caracterização genotípica e fenotípica dos isolamentos de *T. gondii*, e comparar com aqueles já descritos na literatura nacional.

#### **Objetivos Específicos**

1. Isolar *T. gondii* a partir de amostras de cérebro, pulmão e músculo (“pool” de coração e diafragma) de ovinos abatidos para consumo humano;
2. Comparar os títulos de anticorpos obtidos em três provas sorológicas, permitindo determinar o estágio da infecção do animal no momento do abate;
3. Comparar a sensibilidade da PCR frente ao bioensaio positivo e negativo, na detecção do parasito em animais soropositivos;
4. Caracterizar os genótipos das amostras isoladas, pela RFLP-PCR para 12 diferentes sequências gênicas;
5. Comparar o perfil genotípico dos isolados obtidos de ovinos com os genótipos já isolados no Brasil.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento experimental

As colheitas foram realizadas em dois abatedouros localizados na região de Botucatu, SP. As provas sorológicas, bioensaio e genotipagem foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Zoonoses - NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP. Nova genotipagem foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Patogênese, da Universidade do Tennessee, Knoxville, TN, nos Estados Unidos da América, para confirmação dos resultados, assim como o sequenciamento do DNA.

Utilizou-se o programa Epi Info 3.5.1 (CDC, 2002) para se determinar o cálculo do número de amostras (n). Utilizando-se como referência uma frequência observada de 7,7%, segundo Da Silva e Langoni (2001), nível de significância  $\alpha = 1\%$ , nível de confiança de 99% e margem de erro de 3%, encontrou-se um “n” de 523 animais, ajustando-se para 602 animais. Amostras de sangue, cérebro, pulmão, e músculo (“pool” de diafragma e coração) de ovinos foram colhidas em dois abatedouros da região de Botucatu, SP (“A” e “B”), os quais recebem animais dos estados da região Sudeste e Sul. Durante as colheitas, obtiveram-se dados sobre idade, sexo e procedência dos animais (estados de São Paulo e Rio Grande do Sul).

Dos animais positivos às provas sorológicas para anticorpos anti-*T. gondii*, os órgãos e tecidos respectivos, devidamente identificados, foram submetidos à digestão ácida por pepsina e, a seguir, inoculados em camundongos para isolamento do parasito. As amostras, cujo parasito foi isolado no bioensaio ou fora detectado seu DNA na PCR convencional, foram submetidas ao protocolo de RFLP-PCR no Brasil (FMVZ-UNESP, Botucatu, SP) e Estados Unidos da América (Universidade do Tennessee, Knoxville, TN), para determinação do perfil genotípico de cada amostra em 12 *loci* gênicos e, posteriormente, sequenciadas.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, SP, protocolo # 65/2006-CEEA (Apêndice A).

#### 4.2. Colheita das amostras

As amostras de sangue foram colhidas, no momento da sangria (Figura 1), sendo acondicionadas em tubos de ensaio com tampa de borracha, esterilizados, devidamente identificados por número de protocolo. Após a colheita, os tubos foram imediatamente colocados em posição inclinada para acelerar o processo de dessora.



**Figura 1.** Colheita de sangue de ovinos em abatedouro. Botucatu, 2009.

No momento da limpeza da carcaça, as cabeças dos animais foram identificadas de acordo com o número de protocolo, referente às amostras de sangue (Figura 2). Metade do diafragma, dois lobos pulmonares, e o coração inteiro (Figuras 3A, 3B e 3C, respectivamente) foram imediatamente acondicionados individualmente em sacos plásticos, devidamente identificados, e armazenados em caixa térmica, sob refrigeração, e encaminhadas ao laboratório para processamento, juntamente com as cabeças acondicionadas em sacos plásticos de 100 litros. No laboratório, os órgãos e tecidos, e as cabeças foram mantidas sob temperatura de refrigeração até o momento da retirada do cérebro, que se deu após a obtenção dos resultados das provas sorológicas, no período máximo de 24 horas.



**Figura 2.** Identificação das cabeças segundo protocolo numérico utilizado no dia da colheita. Botucatu, 2009.



**Figura 3.** Diafragma (A), pulmão (B), e coração (C) de ovinos abatidos. Botucatu, 2009.

#### **4.3. Cepas de *T. gondii***

Foram utilizadas as cepas RH, genótipo tipo I, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (SABIN, 1941) para a produção de antígeno para as provas sorológicas, e como controle na prova de biologia molecular.

A cepa RH é mantida por inoculação intraperitoneal semanal de camundongos Swiss, albinos, com 30 dias de idade, com 30 a 40g, com 1mL de exsudato peritoneal obtido de camundongos previamente inoculados. Todos os camundongos utilizados neste projeto foram obtidos no Biotério Central da UNESP.

Amostras referência de DNA de *T. gondii*, GT1, PTG, CTG, MAS, TgCgCa1, TgCatBr5, TgCatBr64 e TgToucan, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Chunlei Su, para controle de amplificação e padrões de genotipagem.

#### **4.4. Produção de antígeno**

Foram inoculados 20 camundongos, via intraperitoneal, com 1mL das suspensões da cepa RH, previamente selecionadas. Após três dias, os animais foram eutanasiados e foi colhido o exsudato peritoneal, inoculando-se 10mL de solução fisiológica 0,9% estéril, por animal, e aspirando-se em seguida. Foram avaliados ao microscópio e, àqueles ricos em parasitos e livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos, misturou-se, volume a volume, com líquido ascítico tumoral (células de sarcoma murino TG180, derivadas do sarcoma ATCC - CCRFS-180 II, em 1958), previamente diluído a 1/10 em solução fisiológica 0,9% estéril, para se obter volume final de 120mL de suspensão. Com esta suspensão de taquizoítos e células tumorais, devidamente homogeneizada, e mantida em gelo, 60 camundongos Swiss, com 30 dias de idade, foram inoculados com 2mL da suspensão, via intraperitoneal. Dois dias após a inoculação, realizou-se o lavado peritoneal, com 10mL de solução fisiológica 0,9% estéril (DESMONTS e REMINGTON, 1980; SILVA, 2006). Cada lavado foi acondicionado separadamente em tubo de ensaio esterilizado, com tampa de borracha, e mantido em repouso por uma hora.

Todos os lavados foram avaliados microscopicamente quanto a presença de células inflamatórias, sanguíneas, sarcomatosas e bacterianas. Os ricos em parasitos e livres de contaminação bacteriana, hemácias e leucócitos, foram transferidos por inversão dos tubos em recipiente apropriado, homogeneizando-se cuidadosamente, procedendo-se a seguir a centrifugação em diferentes rotações, de acordo com Silva (2006).

##### **4.4.1. Preparação de antígeno inativado pela formalina (MAT-AF)**

Adicionou-se (volume/volume) formalina-12%<sup>1</sup> (formaldeído-6%), diluída em SST 0,01M pH7,2 à suspensão com parasitos, incubando-a

---

<sup>1</sup> Formaldeído PA - Synth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

“overnight” a temperatura ambiente. No dia seguinte, centrifugou-se a 600 x g durante 10 minutos e ressuspendeu-se o sedimento em 50mL de SST 0,01M pH7,2. Esse processo foi repetido por mais três vezes, para remover os restos celulares e o formaldeído. Finalmente, ressuspendeu-se o sedimento em solução tampão borato pH8,7, ajustando-se a suspensão final para  $2 \times 10^4$  parasitos por  $\mu\text{L}$ , e acondicionada a 4°C até o momento da sua utilização (DESMONTS e REMINGTON, 1980).

#### **4.4.2. Preparação de antígeno inativado pelo metanol (MAT-AM)**

Centrifugou-se a suspensão de antígenos a 700 x g por 10 minutos, ressuspendendo-se o sedimento em 150mL de SST 0,01M pH7,2, contendo 3mL de tripsina 2,5%<sup>2</sup> e 4000U de heparina sódica<sup>3</sup>, incubando-se em estufa a 37°C sob agitação constante por 30 minutos. A seguir, centrifugou-se a 1500 x g por 15 minutos e, lavou-se o sedimento obtido duas vezes em SST 0,01M pH7,2 contendo albumina bovina 1%<sup>4</sup>, centrifugando-se novamente a 700 x g por 15 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 120mL SST 0,01M pH7,2 contendo albumina bovina 1%, mantendo-se sob agitação constante, em temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, adicionou-se 40mL de metanol<sup>5</sup>, de modo que a concentração final fosse de 25% de metanol, mantendo sob agitação constante por 15 minutos, sob temperatura ambiente. A seguir, incubou-se a solução sob repouso a 4°C por 36 horas. Ao final, a solução foi homogeneizada e centrifugada a 4000 x g por 30 minutos, lavando-se o sedimento duas vezes, com 10mL de SST 0,01M pH7,2 contendo albumina bovina 1%, centrifugando-se novamente a 4000 x g por 10 minutos. Por fim, ressuspendeu-se o sedimento final em 20 a 30mL de SST 0,01M pH7,2 contendo albumina bovina 1% e azida sódica 0,15% ( $\text{NaN}_3$ ), estocando-se a 4°C até o momento da utilização. Somente previamente a sua utilização como antígeno, ajustou-se a concentração de taquizoítos fixados em metanol para 1,5 a  $2 \times 10^4$  parasitos por  $\mu\text{L}$  em tampão borato pH 8,95.

---

<sup>2</sup> Tripsina 1:250 - Difco<sup>®</sup>, Estados Unidos

<sup>3</sup> Heparina sódica 5000U/mL - Ariston<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup> Albumina bovina fração V, segundo Cohn, lote 824.759 - Inlab<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

<sup>5</sup> Metanol PA - Synth<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

#### **4.4.3. Inativação e sensibilização de lâminas para a reação de imunofluorescência indireta – RIFI**

Ao exsudato peritoneal rico em taquizoítos misturou-se igual volume de solução formalina 2%, obtendo-se uma suspensão de exsudato-formol a 1%. Esta foi transferida para um tubo de centrífuga e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 30 minutos, agitando-a por inversão delicada do tubo, a cada 10 minutos. A seguir, centrifugou-se a 1600 x g por cinco minutos, desprezando-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o sedimento obtido em 2mL de solução salina 0,85%, centrifugando-se a 1600 x g por 10 minutos. Novamente desprezou-se o sobrenadante, ressuspendendo-se o sedimento em solução salina 0,85% até se obter de 20 a 30 parasitos por campo microscópico, colocando-se 50µL da suspensão final entre a lâmina e a lamínula 24x60mm, utilizando-se o aumento de 40 vezes para a realização da leitura, para a observação e contagem dos taquizoítos.

A fixação do antígeno na lâmina foi procedida transferindo-se 10µL da solução antigênica, sobre os orifícios de lâmina especial de vidro para a RIFI<sup>6</sup>, aspirando-se a seguir o excesso, restando somente uma fina película sobre cada orifício, após secagem à temperatura ambiente. As lâminas assim preparadas foram mantidas em caixas de madeira e laminários a -20°C, até o momento de uso, mantendo-se em estoque por período máximo de dois meses.

#### **4.5. Exames sorológicos**

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1600 x g por 10 minutos, para obtenção do soro sanguíneo, que foram imediatamente acondicionados em microtubos plásticos devidamente identificados com o número de protocolo e processadas de acordo com a técnica utilizada.

##### **4.5.1. Aglutinação direta modificada (MAT-AF/MAT-AM)**

Nas técnicas de aglutinação direta modificada utilizou-se um dos dois antígenos segundo o proposto por Desmonts e Remington (1980), para

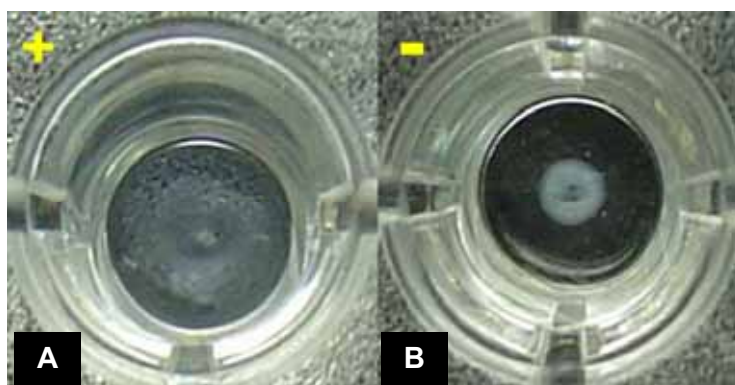
---

<sup>6</sup> Perfecta<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

MAT-AF utilizando formalina, e por Thulliez et al. (1986) e Silva (2006), para MAT-AM utilizando metanol.

As amostras de soro foram diluídas em microplacas de fundo chato<sup>7</sup>, adicionando-se 150µL de SST 0,01M pH7,2 na primeira cavidade e 50µL em todas as demais utilizadas. Na primeira delas, adicionou-se 10µL de soro (diluição 1:16) e, após homogeneização com auxílio de micropipeta, transferiu-se 50µL para a cavidade seguinte, equivalendo a diluição 1:64, procedendo-se assim até a diluição 1:16384. A seguir, dependendo da prova sorológica realizada, 25µL (MAT-AF) e 50µL (MAT-AM) de cada diluição do soro foram transferidos para as respectivas cavidades de microplacas com fundo em “V”<sup>8</sup>. Posteriormente, adicionou-se 25µL de 2-mercaptoetanol 0,2M, diluído em SST 0,01M pH7,2 (MAT-AF) e 50µL de 2ME em solução tampão borato pH8,97 (MAT-AM), e finalmente a adição de 50µL do antígeno, diluído em solução tampão borato pH8,7 (MAT-AF) e pH8,97 (MAT-AM).

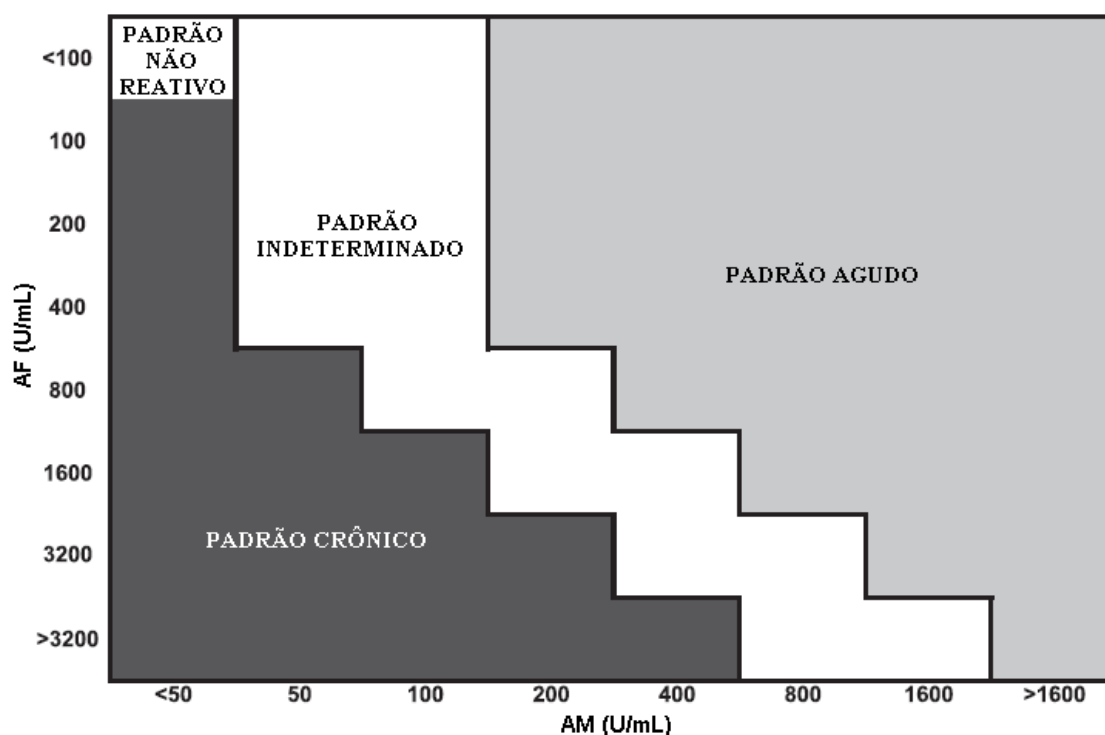
Em provas separadas, as amostras de soro foram testadas frente aos antígenos inativados pela formalina e pelo metanol. As placas foram seladas com filme plástico, homogeneizadas por um minuto e incubadas em estufa de 37°C por seis a 12 horas (MAT-AF e MAT-AM), procedendo-se a leitura com interpretação dos resultados. Consideraram-se positivas as diluições onde houve a formação de uma película cobrindo pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativo quando ocorreu a formação de “botão ou anel no fundo” (Figura 4).



**Figura 4.** Técnica de aglutinação direta modificada (MAT). Reação positiva (A) e negativa (B). Botucatu, 2009.

<sup>7</sup> MaxiSorp™, Estados Unidos

Baseados na comparação entre os resultados da MAT-AM e MAT-AF determinou-se o perfil sorológico dos animais infectados, no momento do abate. Tal comparação e determinação foram realizadas baseadas no protocolo descrito por Montoya et al. (2007), apresentado na Figura 5.



**Figura 5.** Protocolo para determinação do perfil sorológico da infecção por *Toxoplasma gondii* pela comparação dos resultados da MAT-AM e MAT-AF, adaptado de Montoya et al. (2007). Botucatu, 2009.

#### 4.5.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada segundo Camargo (1974), utilizando-se conjugado comercial anti-IgG de ovinos<sup>8</sup>, diluído 1:100, para detecção de anticorpos anti-*T. gondii*. Os soros foram diluídos em SST 0,01M pH7,2, a partir da diluição 1:16, duplicando-se até a obtenção do título final.

<sup>8</sup> Greiner Bio-One®, Estados Unidos

<sup>9</sup> Sheep IgG (h&l) antibody FITC conjugated, cat. A130-101F - Bethyl laboratories Inc.®, Estados Unidos

A leitura das lâminas foi realizada em objetiva de 40x, em microscópio de fluorescência<sup>10</sup>, com sistema de filtros para fluorescência e lâmpada de mercúrio de 100V, considerando-se positiva a diluição onde os taquizoítos apresentaram uma clara fluorescência verde na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo Azul de Evans. O título final foi obtido como a maior diluição do soro em que ainda houve fluorescência completa na borda de pelo menos 50% dos taquizoítos. A ausência de fluorescência ou apenas na extremidade dos parasitos, conhecida como fluorescência polar, foi considerada como reação negativa.

#### **4.6. Bioensaio em camundongos (isolamento)**

As amostras de cérebro, pulmão, e músculo de todos os animais soropositivos para MAT-AF e/ou RIFI-IgG foram inoculadas em camundongos Swiss, com 30 a 40 dias de idade, para tentativa de isolamento do parasito. Inicialmente as amostras de cada tecido foram pesadas (20g de cada tecido – cérebro, pulmão e “pool” de diafragma e coração), e homogeneizadas 1:5 (p/v) em solução de cloreto de sódio 0,18%, adicionada de penicilina<sup>11</sup> (500.000U/mL) e estreptomicina<sup>12</sup> (100mg/mL) (SSA). Após, cada órgão foi macerado isoladamente e submetido ao protocolo de digestão em solução ácida de pepsina (DUBEY, 1998). Realizou-se também o bioensaio de amostras de 20 animais soronegativos aleatoriamente selecionados para se obter controle para especificidade e sensibilidade da prova biológica, assim como das provas sorológicas.

##### **4.6.1. Digestão em solução ácida de pepsina**

Para a digestão em solução ácida de pepsina<sup>13</sup>, as suspensões de cada tecido foram transferidas para um béquer e aquecidas a 37°C, adicionando-se então igual volume de solução ácida de pepsina pré-aquecida a 37°C. A seguir, incubou-se sob agitação constante por 60 minutos a 37°C, e filtrou-se em gaze estéril, centrifugando-se a 1200 x g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, homogeneizando-se o sedimento em 20mL de

---

<sup>10</sup> Microscópio Zeiss SH250 - Carl Zeiss®, Alemanha

<sup>11</sup> Penicilina G potássica - Prodotti®, São Paulo, Brasil

<sup>12</sup> Estreptomicina - Farmavet®, São Paulo, Brasil

SST, adicionando-se 10mL de solução de bicarbonato de sódio 6%, centrifugando-se a 1200 x g por dez minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 5mL de SSA. A seguir, foram inoculados quatro camundongos por amostra digerida, pela via subcutânea, com 1mL da suspensão obtida.

Três alíquotas de 1mL da suspensão final de cada órgão dos animais soropositivos foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior realização da PCR, além do bioensaio. Independentemente do resultado do bioensaio todas as amostras de cérebro, pulmão e músculo de animais soropositivos foram submetidas à pesquisa de DNA.

#### **4.6.2. Manutenção e observação dos animais inoculados**

Os animais inoculados foram mantidos em observação por período de no máximo 60 dias, em caixas de propileno, em estante ventilada ALESCO<sup>14</sup>, com no-break, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Os animais que morreram durante o período de observação foram examinados na busca de taquizoítos de *T. gondii* no líquido peritoneal. Dos animais que sobreviveram ao período de observação, foi colhido o sangue pela punção do seio retro-orbital, e após separação do soro, realizada a MAT-AF para detecção de anticorpos para *T. gondii*. Foram consideradas positivas aquelas amostras em que foram observadas formas parasitárias, no líquido peritoneal ou cérebro, ou nos animais soropositivos à MAT-AF (DUBEY e BEATTIE, 1988).

#### **4.7. Genotipagem das amostras de *T. gondii***

As amostras de *T. gondii* isoladas foram genotipadas pela combinação das técnicas de multilocus-, nested-PCR e análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP-PCR) dos genes SAG1, 5'SAG2, 3'SAG2, alt-SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1, Apico e CS3, conforme descrito por Su et al. (2006), Ferreira et al. (2006) e Pena et al. (2008). Adicionalmente, analisou-se os marcadores ROP18Del e ROP18UPS (KHAN et al., 2009), e 18S rRNA.

---

<sup>13</sup> Pepsina - Nuclear®, São Paulo, Brasil

<sup>14</sup> Estante ventilada ALESCO - modelo ALE99002-001 - ALESCO®, São Paulo, Brasil

Medidas para evitar a contaminação entre amostras foram utilizadas em todas as fases do protocolo experimental, desde a colheita das mesmas, pela utilização de materiais individuais e estéreis, bem como para as etapas características da PCR, seguindo as recomendações de Kwok (1990), tais como utilização de salas diferentes para a extração de DNA, preparação de reagentes, amplificação e análise das amostras, troca frequente de luvas, material plástico individual e descartável, e utilização de controles dos reagentes de extração e amplificação.

#### **4.7.1. Extração de DNA**

Para a extração de DNA foram utilizadas amostras dos parasitos presentes nos tecidos ovinos e também aqueles isolados e mantidos em camundongos, seja na forma de taquizoítos obtidos do líquido peritoneal, seja na forma de bradizoítos obtidos de fragmentos de cérebro. A extração e purificação de DNA das amostras teciduais foi realizada utilizando-se kit de extração, Illustra Tissue and cells genomic Prep Mini spin kit (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda<sup>®</sup>, Brasil), com algumas alterações, conforme instrução do fabricante. Foi realizada a extração de todos os isolamentos positivos, assim como de todos os tecidos ovinos de animais soropositivos, positivos e negativos ao bioensaio, e de 20 tecidos ovinos soronegativos, também negativos ao isolamento.

#### **4.7.2. Determinação do limiar de detecção**

Para a determinação do limiar de detecção da PCR para o gene de *T. gondii* analisado, uma suspensão de  $10^7$  taquizoítos por mL de *T. gondii*, contados em câmara de Neubauer foi diluída em 900 $\mu$ L de água ultrapura a fim de se obter diluições sucessivas de  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos por mL. A mesma suspensão foi diluída em 225 $\mu$ L de uma suspensão de cérebro, de pulmão e de músculo de ovino soronegativo a 20% em tampão TRIS-EDTA pH 8,5 (TE), a fim de se obter diluições sucessivas de  $10^0$ ,  $10^1$  e  $10^2$  parasitos por mL de suspensão de cada tecido. A mesma concentração determinada foi também utilizada para contaminar amostras de tecidos cerebral, pulmonar e muscular, de ovinos soronegativos e negativos ao

isolamento, diluídos a 20%, determinando-se as concentrações  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  parasitos por mL.

#### 4.7.3. PCR convencional de amostras soropositivas

Para a confirmação da negatividade e positividade ao bioensaio, as amostras teciduais dos ovinos soropositivos, negativos e positivos ao bioensaio, foram submetidas à extração de DNA, já descrita anteriormente, e a PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos TOX4 (5'CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG3') e TOX5 (5'CGCTGCAGACACGTGCATCTGGATT3'), segundo descrito por Homan et al. (2000), amplificando uma região de 529 pares de base (pb). Cada microtubo de reação de 0,2mL recebeu 2,5µL tampão de PCR 10x, sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 0,75µL  $MgCl_2$  (1,5mM), 0,25µL de solução de deoxinucleotídeos (1,25mM), *Taq* DNA polimerase (0,15U)<sup>15</sup>, 5µL de cada oligonucleotídeo (10µM)<sup>16</sup>, 10µL de amostra, e 17,35µL água ultrapura (q.s.p.). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador MasterCycler EP gradient<sup>17</sup>, utilizando-se uma incubação inicial de 7 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, com incubação final de 10 minutos a 72°C.

#### 4.7.4. Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 3µL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x, adicionado de 2µL de brometo de etídio. A corrida foi realizada inicialmente a 80V por 60 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc it<sup>18</sup> e fotografado.

---

<sup>15</sup> Invitrogen®, São Paulo, Brasil

<sup>16</sup> Prodimol Ltda.®, São Paulo, Brasil

<sup>17</sup> Eppendorf®, São Paulo, Brasil

<sup>18</sup> UVP®, Califórnia, Estados Unidos

#### 4.7.5. Genotipagem

A princípio, os DNAs alvo foram amplificados em protocolo de PCR em vários *loci* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores externos (Quadro 1) para todos os 12 genes, segundo descrito por Su et al. (2006), Ferreira et al. (2006) e Pena et al. (2008). Utilizaram-se as amostras de referências GT1, PTG, CTG, TgCgCa1, MAS, TgCatBr5, TgCatBr64 e TgToucan, gentilmente cedidas pelo Prof. Ass. Chunlei Su<sup>19</sup>, como controle para os cortes das enzimas. Para a multilocus-PCR (oligonucleotídeos externos), utilizou-se o protocolo descrito pelo Prof. Dr. Chunlei Su, onde cada tubo de reação de 0,2mL recebeu 2,5µL de tampão de PCR 10x, sem magnésio (50mM KCl, 10mM Tris-HCl), 2,0µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2,0µL de cada deoxinucleotídeos (2,5mM), 0,2µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 0,15µL de mix de oligonucleotídeos (25µM), 16,5µL de água ultrapura, atingindo volume final de 23,5µL, e 1,5µL de amostra. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: denaturação inicial de 95°C por 4 minutos, 30 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos. Aos produtos da PCR foi adicionado 25µL de água ultrapura para diluir o produto da PCR (protocolo original – A). Os produtos foram armazenados a 4°C. Quando a carga parasitária foi insuficiente para amplificar os produtos na multilocus- e nested-PCR, realizou-se uma adaptação no protocolo, não se adicionando os 25µL de água ultrapura ao produto da multilocus-PCR (protocolo adaptado – B).

Para a nested-PCR (oligonucleotídeos internos) cada tubo de reação de 0,2mL recebeu a mesma quantidade e concentração de reagentes utilizados na multilocus-PCR, com exceção da concentração dos oligonucleotídeos, onde cada região do DNA foi amplificada separadamente com 0,15µL de cada oligonucleotídeo (50µM)<sup>16</sup>. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: denaturação inicial de 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos. Para confirmação da amplificação, pipetou-se 5µL do produto da nested-PCR, homogeneizou-se em 2µL de tampão de “loading” 5x<sup>20</sup> e foram

---

<sup>19</sup> Prof. Ass. Chunlei Su. Department of Microbiology. The University of Tennessee. Knoxville, TN, Estados Unidos

<sup>20</sup> Uniscience do Brasil<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

examinados em eletroforese de gel de agarose 1,5% com 0,3 $\mu$ L/mL de brometo de etídio em tampão TBE 1x, inicialmente a 80V por 60 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc it<sup>18</sup>, sob luz ultravioleta.

Após a obtenção dos produtos finais de reação, procedeu-se a RFLP-PCR em um microtubo de 0,5mL, onde 3 $\mu$ L dos mesmos foram homogeneizados a uma mistura de 2,0 $\mu$ L de tampão NEB 10x específico, 0,2 $\mu$ L de albumina sérica bovina (BSA) 100x, 0,1 $\mu$ L da(s) enzima(s) de restrição apropriada(s) (Quadro 1)<sup>20</sup>, e 14,6 $\mu$ L água ultrapura, totalizando 20 $\mu$ L e incubando-se as amostras por período e em temperatura apropriada para cada enzima ou enzimas utilizadas, de acordo com o fabricante.

Após a digestão, homogeneizou-se 4 $\mu$ L do produto da RFLP-PCR, em 2 $\mu$ L de tampão de "loading" 5x e foram examinados em eletroforese de gel de agarose 2,5% (3,0% para o gene Apico) com 0,3 $\mu$ L/mL de brometo de etídio em tampão TBE 1x, inicialmente a 80V por 60 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado em sistema de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc it, sob luz ultravioleta e em computador específico. Fotos foram obtidas para posterior análise dos cortes das enzimas.

As provas de genotipagem foram realizadas em duplicata no Brasil e nos Estados Unidos para confirmação dos resultados, análise em programas específicos e sequenciamento das amostras positivas à genotipagem.

Os perfis de cortes das amostras foram comparados aos das cepas referências e aos padrões também gentilmente fornecidos pelo Prof. Ass. Chunlei Su.

#### **4.7.6. Confirmação do parasito**

A nested- e RFLP-PCR no *locus* 18S rRNA foram realizadas devido a esta região apresentar número de 200 repetições no genoma do parasito e, portanto, alta sensibilidade analítica, além de diferenciar o produto amplificado em *T. gondii*, *H. hammondi*, *N. caninum* (Nc-Liv), *S. miescheriana*, *S. capracanis*, *S. moulei*, *S. gigantea*, *S. hominis*, *S. tenella* e *S. neurona*, pela RFLP-PCR. Os protocolos para a PCR, oligonucleotídeos externos e internos, assim como a RFLP-PCR seguem como descritos no item 3.7.5.

#### **4.7.7. Purificação e sequenciamento**

Os produtos da nested PCR no *locus* 18S rRNA foram purificados utilizando-se o kit de purificação Montage<sup>®</sup> PCR Centrifugal Filter Devices, P36461 (Millipore, EUA) e o DNA quantificado utilizando-se Hoefer fluorometer DNA Quantitation DQ200 (Hoefer, EUA).

O sequenciamento direto dos produtos purificados da nested PCR foi realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia, Universidade do Tennessee (UTK), Knoxville, TN, EUA, utilizando-se 5µL dos oligonucleotídeos internos utilizados na nested PCR (Tg18s58F and Tg18s348R) e aproximadamente 50ng/µL de produto de DNA purificado. O sequenciamento foi realizado em 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, EUA). O produto de 18S rRNA sequenciado foi editado no programa BioEdit e submetido ao BLAST na base de dados do GenBank no website do NCBI.

#### **4.8. Análise filogenética**

Os padrões de bandas da eletroforese (dados genotípicos de polimorfismos de restrição) obtidas pelos cortes das enzimas na RFLP-PCR dos isolamentos foram transformados em dados binários (“0”, ausência de banda; “1”, presença de banda) e tabulados, de acordo com o marcador, em programa específico de reconstrução filogenética, SplitsTree (HUSON, 1998; MORRISON, 2005; HUSON e BRYANT, 2006), a fim de se obter a relação filogenética entre os genótipos obtidos no estudo e os já isolados no Brasil, descritos por Pena et al. (2008) (Apêndice B).

**Quadro 1.** Genes, oligonucleotídeos iniciadores externos e internos, tamanho e enzimas de restrição. Botucatu, 2009.

Gene	Oligonucleotídeos externos	Oligonucleotídeos internos	Tamanho (pb)	Enzimas de restrição
SAG1	S: GTTCTAACCCACGCACCCCTGAG AS: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	S: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC AS: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG S: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC	390	HaeII + Sau96I
5'SAG2***		AS: GCAAGAGCGAACITGAACAC S: ATTTCTCATGCCCTCCGCTTC	242	MboI
3'SAG2	S: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC AS: TCAAAGCGTGCAATTATCGC	AS: AACGTTTCACGAAGGCACAC S: TCTTGTCCGGTGTTCACCTCA	222	HhaI
SAG3	S: CAACTCTCACCAATCCACCC AS: GCGCGTTGTAGACAAGACA	AS: CACAAGGAGACCAGAGAAGGA S: GAGGTCATCTCGGACGAACA	225	NciI
BTUB	S: TCCAAAATGAGAGAAAATCGT AS: AAATTGAAAATGACGGAAAGAA	AS: TTGTAGGAACACCCGGACGC S: TTCCGAGCAGGTGACCT	411	BsEI + TaqI
GRA6	S: ATTTGTGTTCCGAGCAGGT AS: GCACCTTCGCTTGTTGTT	AS: TCGCCGAAGAGTTGACATAG S: TCTCTACGTGGACGCC	344	MseI
c22-8	S: TGATGCATCCATGCGTTTAT AS: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	AS: AGGTGCTTGGATAATTGC S: AGTCTGCAGAGTGTCCG	521	BsmAI + MboI
c29-2	S: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AS: AGGGTCTCTTCCGCATACAT	AS: TGCTAGGAAAAGAGGCCG S: AGGAGCGGTAGCGCAAGT	446	HpyCHV4IV + RsaI
L358	S: TCTCTCGACITCGCCTCTTC AS: GCAATTTCTCGAAGACAGG	AS: CCTCTGGCTGCAGTGCT S: CGCAAAGGGAGACAATCAGT	418	HaeIII + NlaIII
PK1	S: GAAAGCTGCCACCCCTGAAA AS: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	AS: TCATCGCTGAATCTCATTGC S: ACCCATCTCGAAAGAAAACG	903	AvaI + RsaI
alt-SAG2	S: GGAACGCGAACAATGAGTTT AS: GCACTGTTGTCAGGGTTT	AS: ATTCGACCAGCGGGAGCAC S: TGCAAAATCTTGAATTCAGTT	546	HinfI + TaqI
Apico	S: TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG AS: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	AS: GGGATTCGAACCCCTTGATA S: AGCGGATTTCCAACACTGTC	640	AflIII + DdeI
CS3	S: GTGTATCTCCGAGGGGTCT AS: TGTGACTTCTTCGCATCGAC	AS: CTGCTGCATTCACAACTCC S: AGTCCCTCCCTGGTGTCT	557	NlaIII + MboI
ROP18Del	Del-S: CTCGTCGACCACACAGCTAA UPS-AS: GAGTGTCTTCTGTCGCTCCT	AS: ACAAACTGGACTGGGGTGAG S: CACAGCATGAGCTTAAGAGTTG	210	SacFI + MfeI
ROP18UPS		AS: CACCGCAAGACAGGCTGTCTTC S: CCATGCATGTCTAAGTATAAGC	267	sem digestão (positivo somente para tipo III)
18S rRNA	S: GTTACCCCGTCACTGCCAC	S: CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC AS: TGCCACGGTAGTCCCAATAC	291	DdeI + MspI + Hpy188III AluI + HhaI

S=oligonucleotídeo *anti-sense*; ■ utilizado somente para diferenciar *T. gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona*.

#### 4.9. Análise dos dados

A associação entre os resultados da RIFI-IgG, MAT-AM e MAT-AF foi verificada pelo teste de McNemar. As amostras positivas em uma ou outra técnica foram consideradas como positivas para a presença de anticorpos para *T. gondii*.

As associações entre a presença de anticorpos para *T. gondii*, independente do teste e as variáveis epidemiológicas, foram verificadas pelos testes de Qui-quadrado com correção de Yates, teste Exato de Fischer ou teste G com correção de Yates, de acordo com a distribuição dos resultados. Da mesma forma, as frequências das variáveis relacionadas ao bioensaio em camundongos ou à PCR nas amostras dos ovinos, foram comparadas com os títulos de anticorpos à MAT-AF pelo teste G com correção de Yates.

As correlações entre os títulos de anticorpos nos testes sorológicos, e as correlações entre os títulos de anticorpos e as variáveis relacionadas à detecção de *T. gondii* nas amostras, foram verificadas pelo teste de Spearman.

O tratamento estatístico relacionado à performance dos resultados obtidos pelo bioensaio e pela PCR foram calculados tendo a detecção de anticorpos como padrão-ouro, utilizando-se a planilha descrita por Mackinnon (2000). Para as outras análises estatísticas foram utilizados os programas Epi Info 3.5.1 e BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Sorologias

Das 602 amostras de soro colhidas, 66 (11,0%; IC95% 8,6-13,8) foram positivas para a pesquisa de anticorpos para *T. gondii* em pelo menos uma das provas sorológicas utilizadas. No abatedouro A, somente 4/92 (4,4%) amostras foram positivas, comparadas a 62/510 (12,2%) amostras colhidas no abatedouro B (Tabela 1).

Dos animais soropositivos, independente da prova utilizada, tentou-se o isolamento do agente. A maioria dos animais apresentou títulos sorológicos para MAT-AF, onde somente uma amostra foi positiva na RIFI-IgG. Das demais amostras, 27 não apresentaram títulos na MAT-AM e cinco na RIFI-IgG. A ocorrência de anticorpos foi baseada nos resultados da MAT-AF, e da RIFI-IgG, em um caso. Todos os títulos das demais provas sorológicas foram iguais ou inferiores à MAT-AF.

Observou-se que a MAT-AF foi mais sensível quando comparada à RIFI-IgG. Os títulos obtidos na MAT-AF foram superiores às demais provas, oscilando de 16 a 1024, em contrapartida a uma variação de 64 a 256 para a RIFI-IgG, e de 16 a 4096 e 16 a 1024 para MAT-AF e RIFI-IgG, respectivamente, no abatedouro B (Tabelas 1 a 4).

**Tabela 1.** Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes dos abatedouros A e B, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM. Botucatu, 2009.

	Abatedouro A ( $n_A=92$ )		Abatedouro B ( $n_B=510$ )		Total ( $n_t=602$ )
	Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)	positivos/ $n_t$ (%)
MAT-AM	1 (0,4)	91 (98,9)	33 (6,9)	477 (93,5)	34/602 (5,6)
MAT-AF	4 (4,4)	88 (95,6)	61 (12,0)	449 (88,0)	65/602 (10,8)
RIFI-IgG	3 (3,3)	89 (96,7)	58 (11,4)	452 (88,6)	61/602 (10,1)
Frequência	4 (4,4)	88 (95,6)	62 (12,2)	448 (87,8)	66/602 (11,0)

Legenda:  $n$  = número de amostras;  $n_t$  = número total de amostras

**Tabela 2.** Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes dos abatedouros A e B, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM, segundo os títulos de anticorpos. Botucatu, 2009.

Títulos	Provas sorológicas (n=602)		
	MAT-AM (%; IC95%)	MAT-AF (%; IC95%)	RIFI-IgG (%; IC95%)
Negativo	568 (94,4; 92,2-95,9)	537 (89,2; 86,5-91,4)	541 (89,9; 87,2-92,0)
16	25 (4,2; 2,8-6,1)	4 (0,7; 0,3-1,7)	13 (2,2; 1,3-3,7)
64	9 (1,5; 0,8-2,8)	4 (0,7; 0,3-1,7)	32 (5,3; 3,8-7,4)
256	-	22 (3,6; 2,4-5,5)	13 (2,2; 1,3-3,7)
1024	-	30 (5,0; 3,5-7,0)	2 (0,3; 0,1-1,2)
4096	-	5 (0,8; 0,4-1,9)	1 (0,2; 0,0-0,9)
Total	602 (100,0; -)	602 (100,0; -)	602 (100,0; -)

Legenda: *n* = número de amostras; IC95% = intervalo de confiança 95%

No abatedouro A (Tabela 3), duas amostras apresentaram títulos 256 e 1024 na MAT-AF, enquanto somente uma amostra com título 256 foi observada na RIFI-IgG, e duas amostras reagiram com título 64. Ao se analisar os resultados do abatedouro B (Tabela 4), esta diferença de sensibilidade entre as provas pôde ser melhor observada, pois somente uma amostra reagiu para o título 16, na MAT-AF, e cinco, dez e duas amostras para os títulos 256, 1024 e 4096, respectivamente, enquanto que na RIFI-IgG, cinco e dez amostras reagiram para os títulos 16 e 64, e somente duas e uma para 256 e 1024, respectivamente.

**Tabela 3.** Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes do abatedouro A, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM, segundo os títulos de anticorpos. Botucatu, 2009.

Títulos	Provas sorológicas (n=92)		
	MAT-AM (%; IC95%)	MAT-AF (%; IC95%)	RIFI-IgG (%; IC95%)
16	-	1 (25,0; 5,3-71,6)	-
64	1 (100,0; -)	1 (25,0; 5,3-71,6)	2 (66,7; 19,4-93,2)
256	-	1 (25,0; 5,3-71,6)	1 (33,3; 6,8-80,6)
1024	-	1 (25,0; 5,3-71,6)	-
Total	1 (100,0; -)	4 (100,0; -)	3 (100,0; -)

Legenda: n = número de amostras; IC95% = intervalo de confiança 95%

**Tabela 4.** Frequência de resultados dos exames sorológicos dos ovinos provenientes do abatedouro B, pela RIFI-IgG, MAT-AF e MAT-AM, segundo títulos de anticorpos. Botucatu, 2009.

Títulos	Provas sorológicas (n=510)		
	MAT-AM (%; IC95%)	MAT-AF (%; IC95%)	RIFI-IgG (%; IC95%)
16	25 (75,8)	3 (4,9)	13 (22,4)
64	8 (24,2)	3 (4,9)	30 (51,7)
256	-	21 (34,4)	12 (20,7)
1024	-	29 (47,5)	2 (3,4)
4096	-	5 (8,2)	1 (1,7)
Total	33 (100,0%)	61 (100,0)	58 (100,0)

Legenda: n = número de amostras; IC95% = intervalo de confiança 95%

Nas tabelas abaixo podem ser observadas a distribuição dos animais, frequências e respectivas porcentagens de ovinos soropositivos ao abate de acordo com sexo, idade, município de procedência, estado de procedência, sistema de criação (Tabela 5) e raça (Tabela 6). 59/66 (89,39%) animais infectados eram fêmeas, 49/66 (74,24%) tinham até 2 anos, 52/66 (78,78%) eram oriundos do estado do Rio Grande do Sul, sendo 40/52

(76,92%) de Santana do Livramento, onde o sistema de criação é predominantemente extensivo, que neste estudo apresentou 95,45% (63/66 animais) de prevalência, com as raças merinas [Ideal (Polwarth) – 32/66, 48,48% – e Corriedale – 10/66, 15,15%] sendo as mais acometidas.

A MAT-AF apresentou alta sensibilidade (98,4%) e especificidade (99,1%) e uma concordância quase perfeita ( $\kappa = 0,9468$ ) (Tabela 7) e correlação forte ( $r = 0,7942$ ) (Tabelas 8 e 9; Figura 6), com os resultados da RIFI-IgG, considerada padrão-ouro, onde ambas detectaram 60 amostras positivas. Na Tabela 9 é apresentada a associação entre os títulos sorológicos obtidos na MAT-AF e na RIFI-IgG, apresentando diferença significativa entre os títulos ( $P < 0,0001$ ), verificando-se maior sensibilidade na RIFI-IgG. Tanto a MAT-AF como a RIFI-IgG apresentaram correlação regular (Tabela 10) quando comparados à MAT-AM, teste sorológico que detectou somente baixos títulos sorológicos (até 64) e em poucas amostras (Tabelas 10 e 11; Figuras 7 e 8).

**Tabela 5.** Frequência de ovinos soropositivos para *T. gondii* pela MAT-AF e/ou RIFI-IgG, de acordo com o sexo, idade, procedência e sistema de criação. Botucatu, 2009.

Variáveis		N	MAT-AF <sup>a</sup>	Variável (%); IC95% <sup>b</sup>	OR (IC95%) <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>
Sexo	Macho	247	7	2,8; 1,4–5,7	6,8 (3,1–15,2)	<0,0001 <sup>f</sup>
	Fêmea	355	59	16,6; 13,1–20,8		
Idade animal (anos)	0-1	112	7	6,3; 3,1–12,3	-	0,0258 <sup>g</sup>
	1-2	412	42	10,2; 7,6–13,5		
	>2	78	17	21,8; 14,1–32,2		
Procedência (Estado)	SP	172	14	8,1; 4,9–13,2	1,6 (0,8–2,9)	0,1021 <sup>f</sup>
	RS	430	52	12,1; 9,3–15,5		
Procedência (Município)	Avaré (SP)	17	3	17,6; 6,4–41,4	-	0,1157 <sup>e</sup>
	Uruguaiana (RS)	75	12	16,0; 9,4–25,9		
	Duartina (SP)	27	1	3,6; 0,8–18,3		
	Holambra (SP)	1	0	0,0; 0,0–0,0		
	Itapira (SP)	3	0	0,0; 0,6–60,2		
	Manduri (SP)	27	2	7,4; 2,3–23,5		
	Ourinhos (SP)	15	2	13,3; 4,0–38,3		
	Pirajuí (SP)	30	6	20,0; 9,6–37,5		
	Santana do Livramento (RS)	354	40	11,3; 8,4–15,0		
	São Manuel (SP)	53	0	0,0; 0,0–6,6		
Sistema de criação	Intensivo	45	2	4,4; 1,3–14,8	-	0,0061 <sup>g</sup>
	Semi-intensivo	62	1	1,6; 0,4–8,5		
	Extensivo	495	63	12,7; 10,0–15,9		

Legenda: <sup>a</sup> Título  $\geq 16$ ; <sup>b</sup> Frequência de positivos baseada na variável estudada, com intervalo de confiança de 95%; <sup>c</sup> OR: Odds ratio ; <sup>d</sup> P: valor de P para  $\alpha = 5$ ; <sup>e</sup> Teste de Qui-Quadrado; <sup>f</sup> Teste Exato de Fisher; <sup>g</sup> Teste-G

**Tabela 6.** Frequência de ovinos soropositivos para *T. gondii* pela MAT-AF e/ou RIFI-IgG, de acordo com a raça. Botucatu, 2009.

Variável	N	MAT-AF <sup>a</sup>	Variável (%); IC95% <sup>b</sup>	OR (IC95%) <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>
Raças					
Mestiço	156	11	7,1; 4,0–12,2		
Corriedale	104	10	9,6; 5,4–16,8		
Santa Inês	38	6	15,8; 7,5–30,5		
Bergamácia	3	0	0,0; 0,0–0,0	-	0,0061 <sup>e</sup>
Polwarth ou Ideal	178	32	18,0; 13,0–24,3		
Ille de France	106	4	3,8; 1,5–9,3		
Hampshire Down	17	3	17,6; 6,4–41,4		

Legenda: <sup>a</sup> Título  $\geq 16$ ; <sup>b</sup> Frequência de positivos baseada na variável estudada, com intervalo de confiança de 95%; <sup>c</sup> OR: Odds ratio ; <sup>d</sup> P: valor de P para  $\alpha = 5$ ; <sup>e</sup> Teste-G

**Tabela 7.** Associação entre MAT-AF e RIFI-IgG na pesquisa de anticorpos para *T. gondii* nos ovinos examinados. Botucatu, 2009.

RIFI-IgG	MAT-AF		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	536	05	541
Positivo	01	60	61
Total	537	65	602

Estatística: Teste de McNemar;  $\chi^2 = 1,50$ ; valor de P = 0,2207;  $\kappa = 0,9468$  (0,9045-0,9891)  
S=98,4; E=99,1%; VPP=92,3%; VPN=99,8%

**Tabela 8.** Correlações entre os títulos de anticorpos nos testes de MAT-AF, MAT-AM e RIFI. Botucatu, 2009.

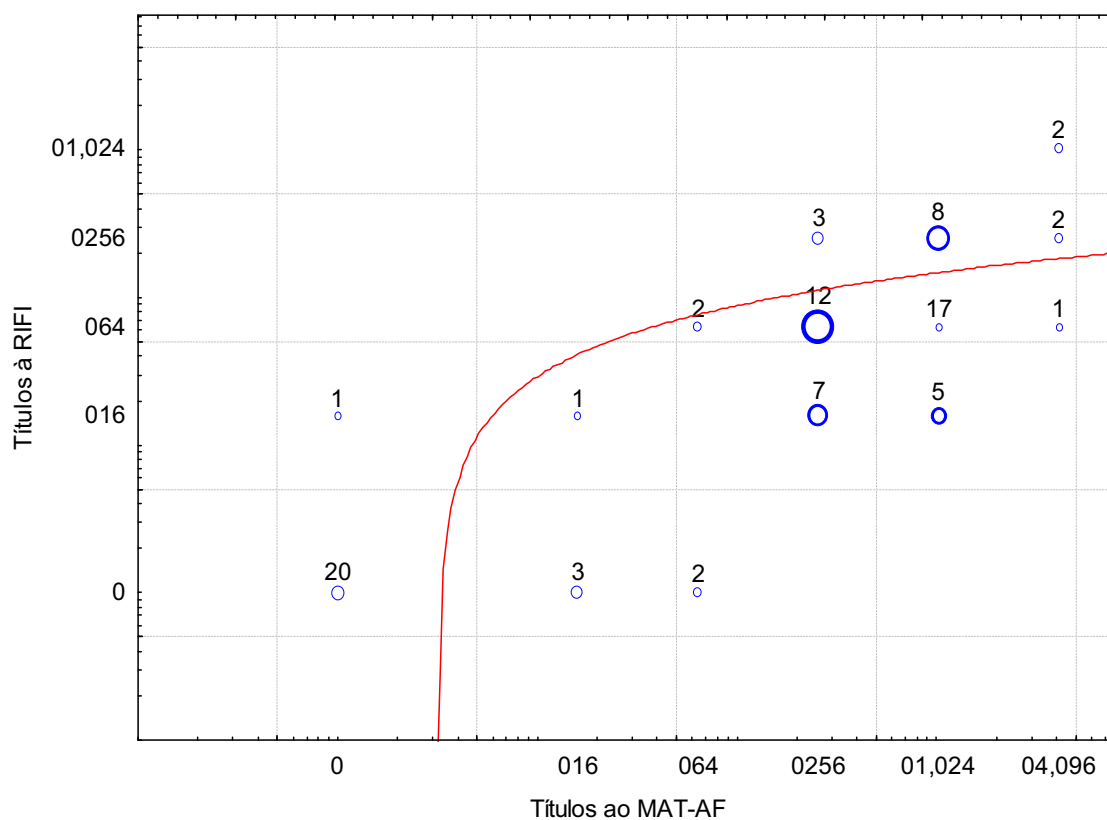
Pares de variáveis	Coefficiente r	Valor de P	Interpretação
MAT-AM x MAT-AF	0,3714	0,0004	Correlação regular
MAT-AM x RIFI-IgG	0,3686	0,0005	Correlação regular
MAT-AF x RIFI-IgG	0,7942	< 0,0001	Correlação forte

Estatísticas: valores de P menores que 0,05 indicam correlação significativa entre os pares de variáveis, pelo teste de Spearman.

**Tabela 9.** Comparação entre os títulos de MAT-AF e RIFI-IgG. Botucatu, 2009.

RIFI-IgG	MAT-AF						Total (%)
	Negativo (%)	16 (%)	64 (%)	256 (%)	1024 (%)	4096 (%)	
Negativo	376 (98,9)	2 (0,5)	2 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	380 (86,2)
16	1 (7,1)	1 (7,1)	0 (0,0)	7 (50,0)	5 (37,5)	0 (0,0)	14 (2,9)
64	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,3)	12 (37,5)	17 (53,1)	1 (3,1)	32 (7,3)
256	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (23,1)	8 (61,5)	2 (15,4)	13 (2,9)
1024	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	2 (0,5)
Total	377 (85,5)	3 (0,7)	4 (0,9)	22 (5,0)	30 (6,8)	5 (1,1)	441 (100,0)

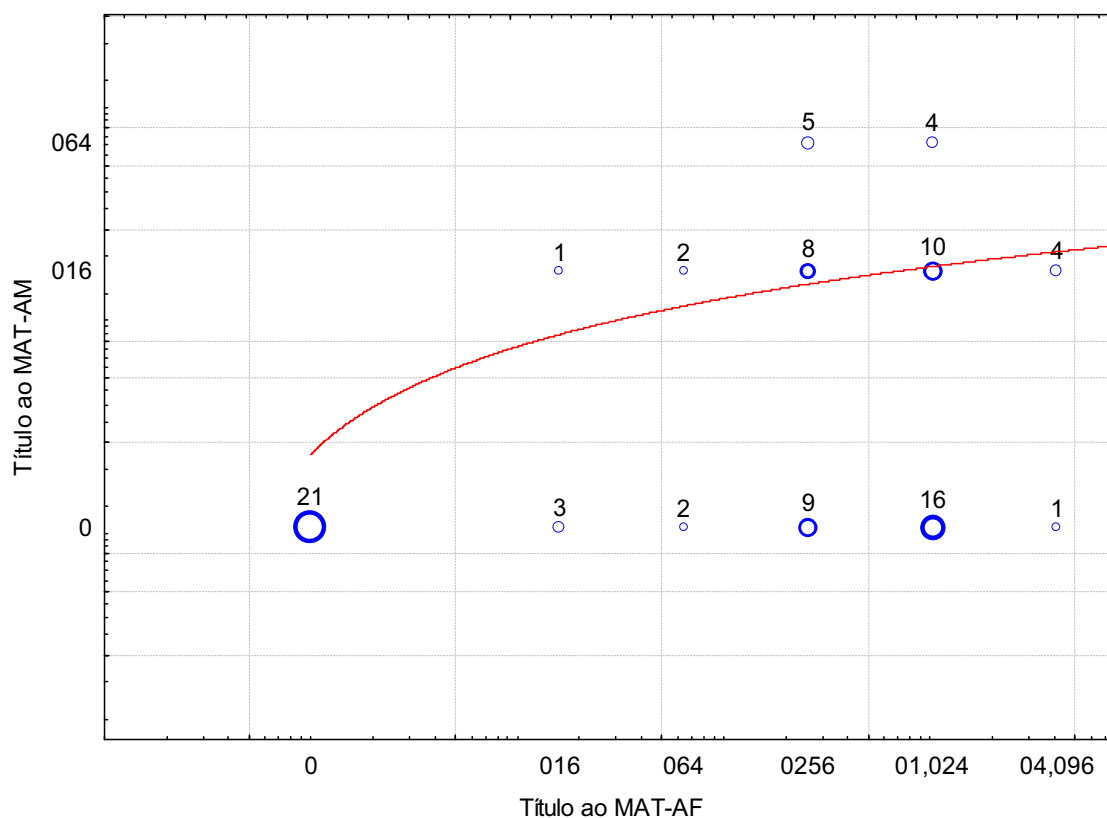
Estatística: Teste-G = 112,88; valor de  $P < 0,0001$ .

**Figura 6.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e RIFI-IgG. Botucatu, 2009.

**Tabela 10.** Comparação entre os títulos de MAT-AM e MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF	MAT-AM			Total (%)
	Negativo (%)	16 (%)	64 (%)	
Negativo	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	93 (69,4)
16	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	2 (1,5)
64	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (1,5)
256	0 (0,0)	8 (61,5)	5 (38,5)	13 (9,7)
1024	5 (26,3)	10 (52,6)	4 (21,1)	19 (14,2)
4096	1 (20,0)	4 (80,0)	0 (0,0)	5 (3,7)
Total	100 (74,6)	25 (18,7)	9 (6,7)	134 (100,0)

Estadística: Teste-G = 95,95; valor de  $P < 0,0001$ .

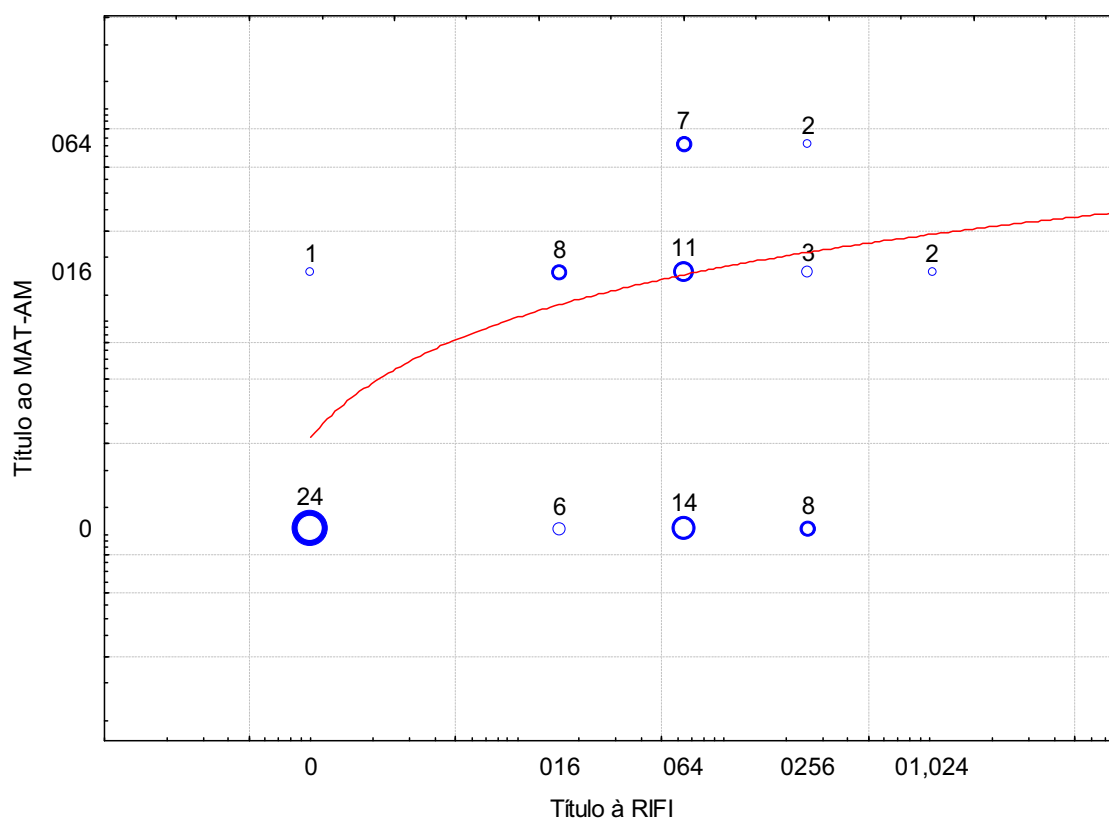


**Figura 7.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e MAT-AM. Botucatu, 2009.

**Tabela 11.** Comparação entre os títulos de MAT-AM e RIFI-IgG. Botucatu, 2009.

RIFI-IgG	MAT-AM			Total (%)
	Negativo (%)	16 (%)	64 (%)	
Negativo	90 (98,9)	1 (1,1)	0 (0,0)	91 (70,0)
16	1 (11,1)	8 (88,8)	0 (0,0)	9 (6,2)
64	4 (18,2)	11 (50,0)	7 (31,8)	22 (16,9)
256	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	6 (4,6)
1024	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (1,5)
Total	96 (73,8)	25 (19,2)	9 (6,9)	130 (100,0)

Estatística: Teste-G = 85,06; valor de  $P < 0,0001$ .



**Figura 8.** Correlação entre os títulos da MAT-AM e RIFI-IgG. Botucatu, 2009.

## 5.2. Bioensaio em camundongos

Todos os isolamentos foram obtidos de animais apresentando anticorpos característicos de estágio crônico, e com predileção pelo tecido cerebral (Tabela 12), em detrimento do pulmão (Tabela 13) e músculo (Tabela 14).

**Tabela 12.** Frequência de resultados de bioensaio de cérebro de ovinos soropositivos, de acordo com o estágio da infecção. Botucatu, 2009.

Estágio sorológico	Bioensaio (cérebro)		
	Negativo	Positivo	Total
Agudo	00	00	00
Crônico	44	17	61
Indeterminado	05	00	05
Total	49	17	66

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,2134$ )

**Tabela 13.** Frequência de resultados de bioensaio de pulmão de ovinos soropositivos, de acordo com o estágio da infecção. Botucatu, 2009.

Estágio sorológico	Bioensaio (pulmão)		
	Negativo	Positivo	Total
Agudo	00	00	00
Crônico	57	04	61
Indeterminado	05	00	05
Total	62	04	66

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,7241$ )

**Tabela 14.** Frequência de resultados de bioensaio de músculo de ovinos soropositivos, de acordo com o estágio da infecção. Botucatu, 2009.

Estágio sorológico	Bioensaio (músculo)		
	Negativo	Positivo	Total
Agudo	00	00	00
Crônico	54	07	61
Indeterminado	05	00	05
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>07</b>	<b>66</b>

Estadística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,5602$ )

Nas Tabelas 15 e 17 pode-se observar que com os 66 bioensaios realizados obteve-se o isolamento em 20/66 (30,3%), referente aos animais B052, B076, B081, B082, B105, B180, B183, B185, B193, B198, B251, B252, B271, B298, B303, B377, B439, B465, B496 e B510, com uma especificidade de 100% e concordância com a sorologia de 0,17. A especificidade analítica dos testes utilizados pode ser conferida na Tabela 16, onde 20 animais soronegativos foram negativos ao bioensaio e à PCR, conferindo a confiabilidade dos testes.

Do total de 66 bioensaios realizados, 61 (92,4%) se caracterizaram por estágio crônico e cinco (7,6%) estágio indeterminado, pois seria necessária a realização de sorologia pareada para se ter conhecimento real do *status* imunológico.

**Tabela 15.** Relação de amostras soropositivas de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR. Botucatu, 2009.

Registro	Estágio	Sorologia				Bioensaio				PCR		
		MAT-AM	MAT-AF	RIFI-IgG	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão
A001	Crônico	16	1024	256	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
A005	Crônico	-	16	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
A064	Indeterminado	64	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
A067	Crônico	16	64	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B023	Indeterminado	64	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	-
B046	Crônico	16	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B047	Crônico	64	1024	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B052	Crônico	-	1024	64	3/4 (+)	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	+
B076	Crônico	-	1024	64	0/4 (+)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B079	Indeterminado	64	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	-
B081	Crônico	16	4096	1024	4/4	1/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	-
B082	Crônico	16	1024	16	2/4 (+)	0/4 (+)	0/4 (-)	+	-	-	-	-
B086	Crônico	16	1024	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B089	Crônico	16	1024	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B093	Crônico	16	4096	256	0/4 (-)	1/4 (-)	1/4 (-)	-	-	-	-	-
B098	Crônico	64	1024	256	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B102	Crônico	-	1024	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B104	Indeterminado	64	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B105	Crônico	-	1024	64	0/4 (-)	0/4 (-)	1/4 (-)	-	-	-	-	-

**Tabela 15.** Relação de amostras soropositivas de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR (continuação). Botucatu, 2009.

Registro	Estágio	Sorologia				Bioensaio				PCR		
		MAT-AM	MAT-AF	RIFI-IgG	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão
B110	Crônico	16	1024	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B139	Crônico	16	16	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	+	+	+	+
B149	Indeterminado	64	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B153	Crônico	-	16	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B156	Crônico	-	1024	256	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	+	+	+	-
B180	Crônico	-	1024	64	1/4 (-)	0/4 (-)	1/4 (-)	+	-	-	-	-
B183	Crônico	-	1024	16	0/4 (+)	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	-
B185	Crônico	16	1024	256	3/4 (+)	0/4 (+)	0/4 (-)	+	-	-	-	+
B187	Crônico	-	1024	256	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B190	Crônico	16	256	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B193	Crônico	16	256	16	0/4 (+)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B198	Crônico	-	1024	64	0/4 (+)	0/4 (-)	0/4 (+)	-	-	-	-	-
B239	Crônico	16	256	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B240	Crônico	16	1024	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	-
B251	Crônico	-	1024	64	1/4 (-)	0/4 (-)	4/4	-	-	-	-	+
B252	Crônico	-	256	256	4/4	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	+

Legenda: X/Y = X (número de animais mortos) / Y (número de animais inoculados)  
(+) sorologia positiva; (-) sorologia negativa

**Tabela 15.** Relação de amostras soropositivas de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR (continuação). Botucatu, 2009.

Registro	Estágio	Sorologia				Bioensaio				PCR		
		MAT-AM	MAT-AF	RIFI-IgG	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão
B271	Crônico	16	4096	64	4/4	4/4	2/4 (+)	+	-	-	+	
B275	Crônico	-	1024	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B279	Crônico	-	256	16	0/4 (-)	0/4 (-)	1/4 (-)	-	-	-	-	
B281	Crônico	-	1024	64	1/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B283	Crônico	16	256	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B298	Crônico	16	1024	64	0/4 (+)	0/4 (-)	0/4 (+)	+	-	-	+	
B303	Crônico	-	16	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (+)	-	-	-	-	
B311	Crônico	-	64	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B316	Crônico	-	64	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B355	Crônico	-	-	16	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B373	Crônico	-	256	64	0/4 (-)	1/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B375	Crônico	-	256	16	3/4 (-)	2/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	
B376	Crônico	16	256	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	
B377	Crônico	-	1024	64	0/4 (+)	2/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	
B388	Crônico	-	1024	256	1/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	+	-	-	-	
B391	Crônico	64	1024	64	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	
B400	Crônico	-	4096	256	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	-	-	

Legenda: X/Y = X (número de animais mortos) / Y (número de animais inoculados)  
(+) sorologia positiva; (-) sorologia negativa

**Tabela 15.** Relação de amostras soropositivas de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR (continuação).  
Botucatu, 2009.

Registro	Estágio	Sorologia				Bioensaio				PCR			
		MAT-AM	MAT-AF	RIFI-IgG	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo
B433	Crônico	-	256	256	0/4 (-)	*	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B439	Crônico	-	256	64	0/4 (-)	*	0/4 (-)	-	-	0/4 (+)	-	-	-
B443	Crônico	64	1024	256	2/4 (-)	*	1/4 (-)	-	-	1/4 (-)	-	-	-
B451	Crônico	16	256	16	0/4 (-)	*	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B453	Crônico	-	1024	64	0/4 (-)	*	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B455	Crônico	16	256	64	1/4 (-)	*	1/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B462	Crônico	-	1024	256	0/4 (-)		0/4 (-)	0/4 (-)	-	0/4 (-)	-	-	-
B465	Crônico	-	256	64	0/4 (+)		0/4 (+)	0/4 (-)	-	0/4 (-)	-	-	-
B470	Crônico	-	256	64	0/4 (-)		0/4 (-)	0/4 (-)	-	0/4 (-)	-	-	-
B471	Crônico	16	4096	1024	4/4		4/4	0/4 (-)	-	1/4 (-)	-	-	+
B478	Crônico	-	256	256	0/4 (-)		0/4 (-)	0/4 (-)	-	0/4 (-)	-	-	-
B487	Crônico	16	64	64	1/4 (-)		1/4 (-)	0/4 (-)	-	0/4 (-)	-	-	-
B496	Crônico	16	1024	64	0/4 (+)		0/4 (+)	0/4 (-)	+	0/4 (-)	-	-	+
B510	Crônico	16	1024	64	0/4 (+)		0/4 (+)	0/4 (-)	+	0/4 (-)	-	-	-

Legenda: X/Y = X (número de animais mortos) / Y (número de animais inoculados)

(+) sorologia positiva; (-) sorologia negativa

\* bioensaio não realizado

**Tabela 16.** Relação de amostras soronegativas, de acordo com os resultados das sorologias, bioensaio e PCR. Botucatu, 2009.

Registro	Sorologia				Bioensaio				PCR			
	MAT-AM	MAT-AF	RIFI-IgG	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo	Cérebro	Pulmão	Músculo
A002	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A013	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A014	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A015	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A016	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A017	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A018	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A019	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A020	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A021	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A022	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A023	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A024	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A046	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
A065	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B001	-	-	-	0/4 (-)	1/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B006	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B034	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B039	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-
B049	-	-	-	0/4 (-)	0/4 (-)	0/4 (-)	-	-	0/4 (-)	-	-	-

Legenda: (+) sorologia positiva; (-) sorologia negativa

**Tabela 17.** Frequência de resultados do bioensaio e sorologia, independente do tecido analisado e método sorológico utilizado. Botucatu, 2009.

Resultado do Bioensaio	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (30,3)	46 (69,7)	66 (76,7)
Positivo	0 (0,0)	20 (30,3)	20 (23,3)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 44,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,17 \pm 0,05$  (0,08-0,26)  
 S=30,30%; E=100%; VPP=100; VPB=30,30%

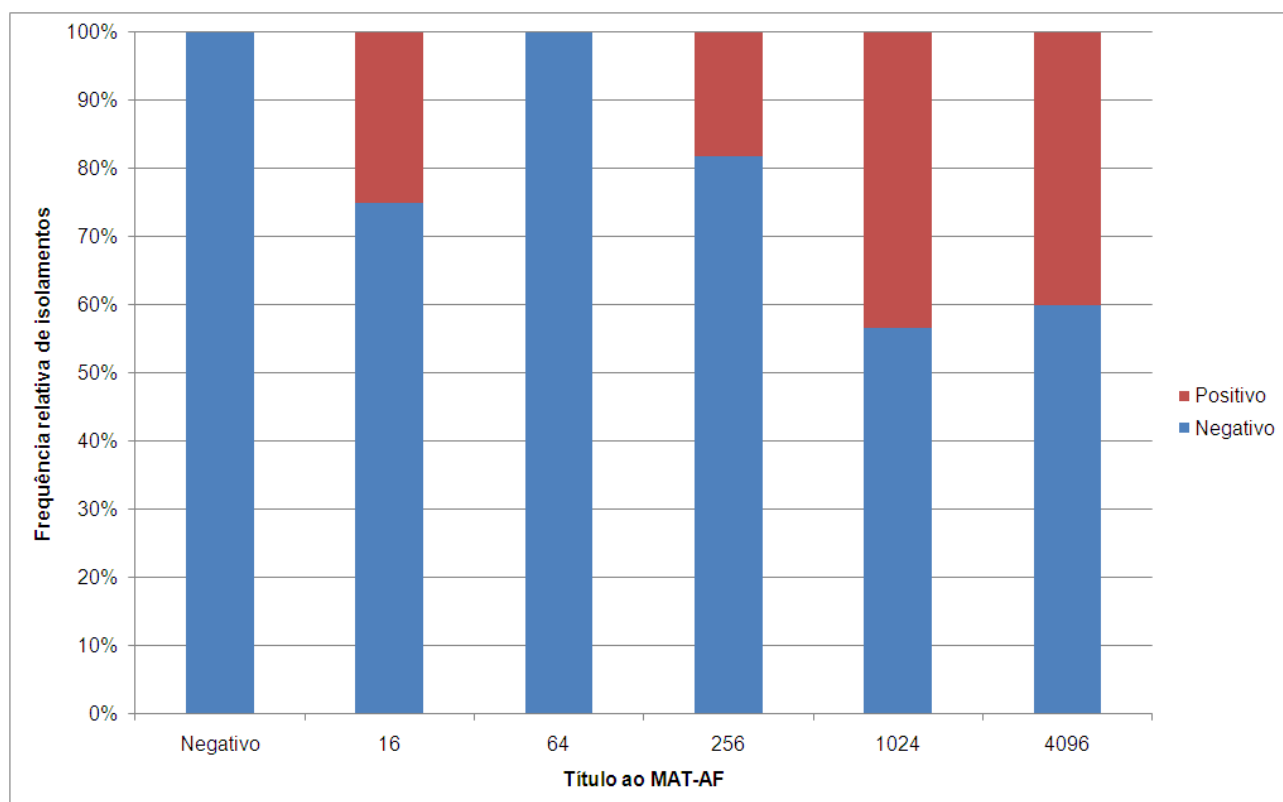
Diferença significativa pode ser observada entre a MAT-AF e o bioensaio, independente do tecido analisado (Tabela 18). Quanto maiores os títulos maior chance de isolamento, como observado na Figura 9. Com exceção de uma amostra isolada com título 16, 19 amostras foram isoladas de animais com títulos mais elevados.

Cistos teciduais foram verificados em 12/20 (60%; IC95% 38,4-78,2%) isolamentos de amostras cerebral, pulmonar e/ou muscular, 8/12 (66,7%; IC95% 38,6-86,1%) foram virulentos para alguns ou todos camundongos. Enquanto isso, 4/20 (20%; IC95% 8,2-41,9%) observou-se estruturas semelhantes à taquizoítos no líquido peritoneal de animais que morreram, e em 4/20 (20%; IC95% 8,2-41,9%) não se identificou taquizoítos e/ou cistos, resultando somente soroconversão após o período de 60 dias de avaliação (Tabelas 19 e 20; Figuras 10).

**Tabela 18.** Frequência relativa de isolamentos, independente do tecido analisado, segundo o título de anticorpos obtidos pela MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	Bioensaio		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	18 (81,8)	4 (18,2)	22 (25,9)
1024	17 (56,7)	13 (43,3)	30 (35,3)
4096	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (5,9)
<b>Total</b>	<b>65 (76,5)</b>	<b>20 (23,5)</b>	<b>85 (100,0)</b>

Estatística: Teste-G = 17,44; valor de  $P = 0,0037$



**Figura 9.** Frequência relativa de isolamentos segundo o título de anticorpos obtido na MAT-AF. Botucatu, 2009.

**Tabela 19.** Frequência de isolamentos de acordo com os resultados sorológicos, independente do método sorológico utilizado. Botucatu, 2009.

Resultado do isolamento	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (30,3)	46 (69,7)	66 (76,7)
Cisto	0 (0,0)	12 (100,0)	12 (14,0)
Taquizoítos	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (4,7)
Sorologia	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (4,7)
<b>Total</b>	<b>20 (23,3)</b>	<b>66 (76,7)</b>	<b>86 (100,0)</b>

Estatística: Teste-G = 10,71; valor de  $P = 0,0134$ .

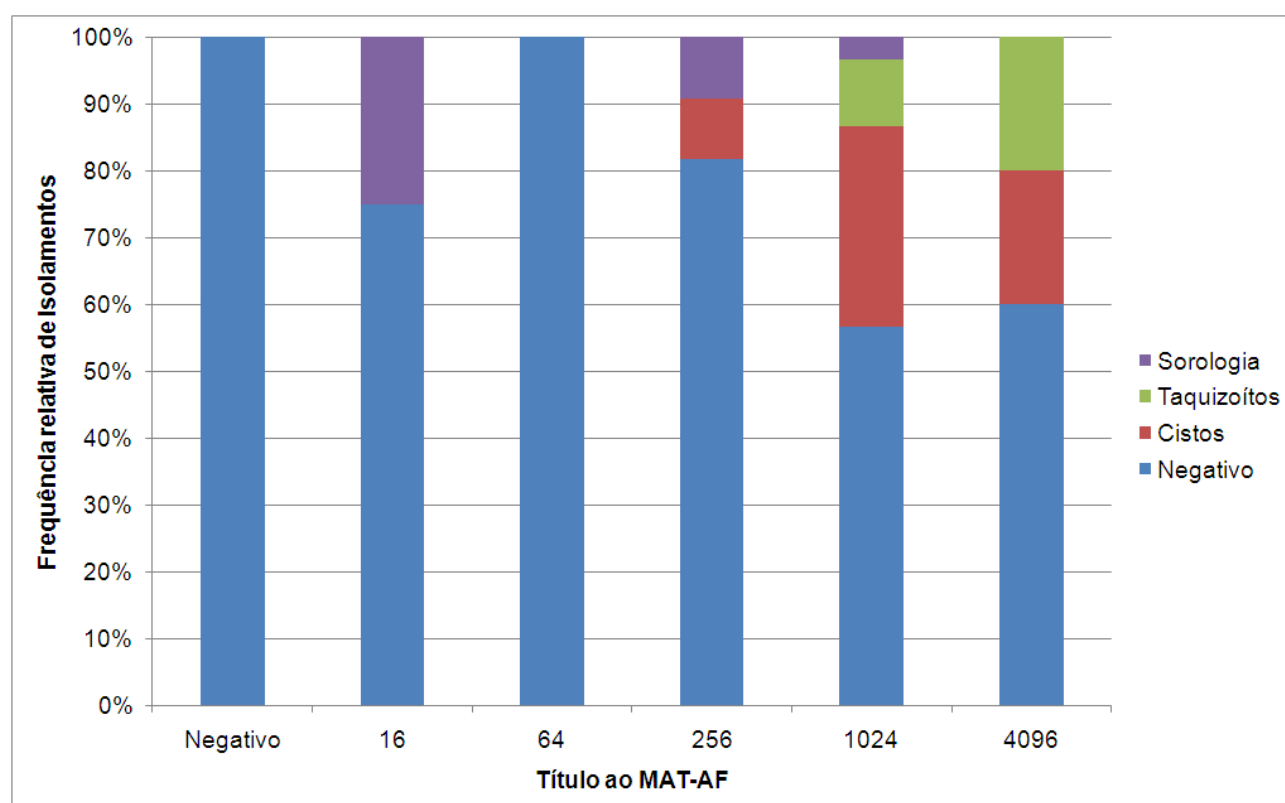
Na Figura 10 observa-se a frequência relativa de isolamento, de acordo com o resultado do bioensaio e o título obtido na MAT-AF.

Em todos os bioensaios com isolamento e identificação de cistos teciduais, de um a quatro camundongos apresentaram o parasito, com a localização no cérebro ou músculo, e raramente no pulmão. Os materiais que resultaram isolamento com formação de cistos foram provenientes dos animais B052, B076, B082, B183, B185, B252, B271, B298, B377, B465, B496 e B510.

**Tabela 20.** Frequência relativa de isolamentos, independente do tecido analisado, segundo o “tipo” de isolamento e títulos obtidos pela MAT-AF. Botucatu, 2009.

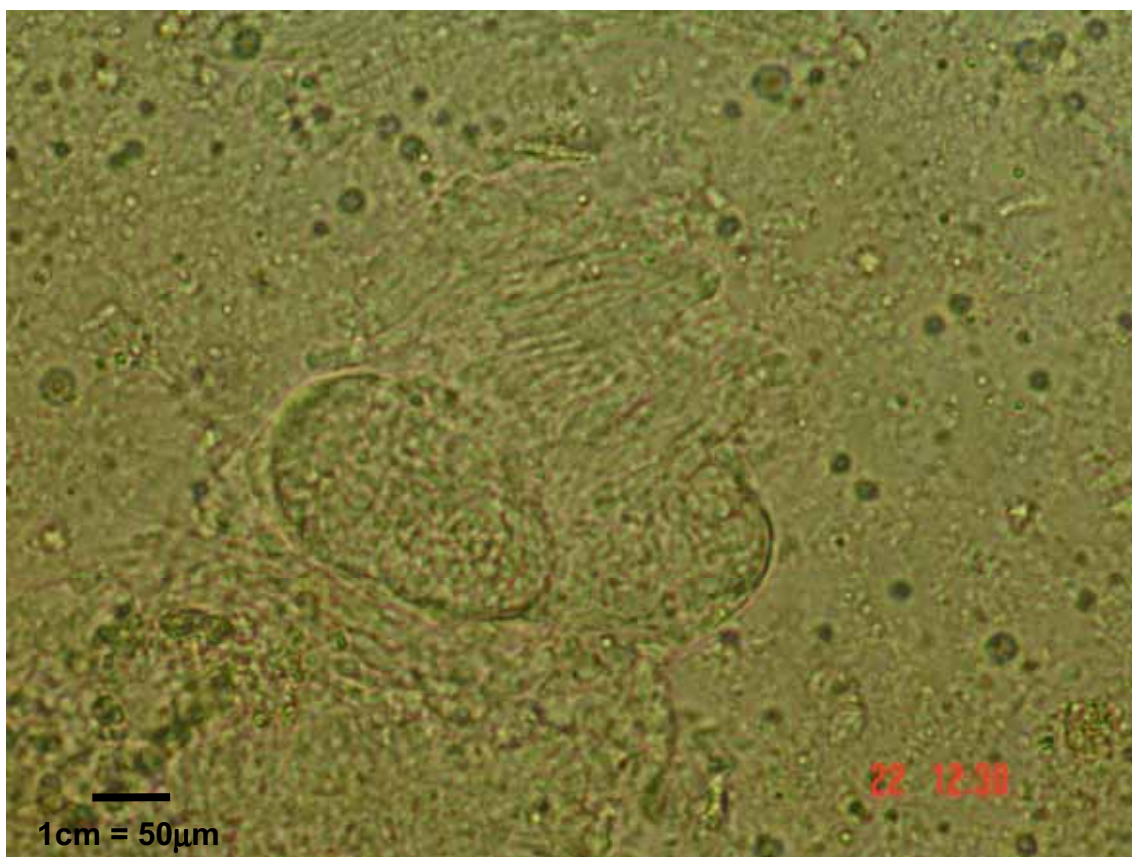
MAT-AF (títulos)	Tipo de isolamento				
	Negativo (%)	Cistos (%)	Taquizoítos (%)	Sorologia (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	3 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	18 (81,8)	2 (9,1)	0 (0,0)	2 (9,1)	22 (25,9)
1024	17 (56,7)	9 (30,0)	3 (10,0)	1 (3,3)	30 (35,3)
4096	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	5 (5,9)
<b>Total</b>	<b>65 (76,5)</b>	<b>12 (14,1)</b>	<b>4 (4,7)</b>	<b>4 (4,7)</b>	<b>85 (100,0)</b>

Estatística: Teste-G = 19,79; valor de  $P = 0,1802$



**Figura 10.** Frequência relativa de isolamentos, de acordo com o resultado do bioensaio, segundo o título de anticorpos obtido na MAT-AF. Botucatu, 2009.

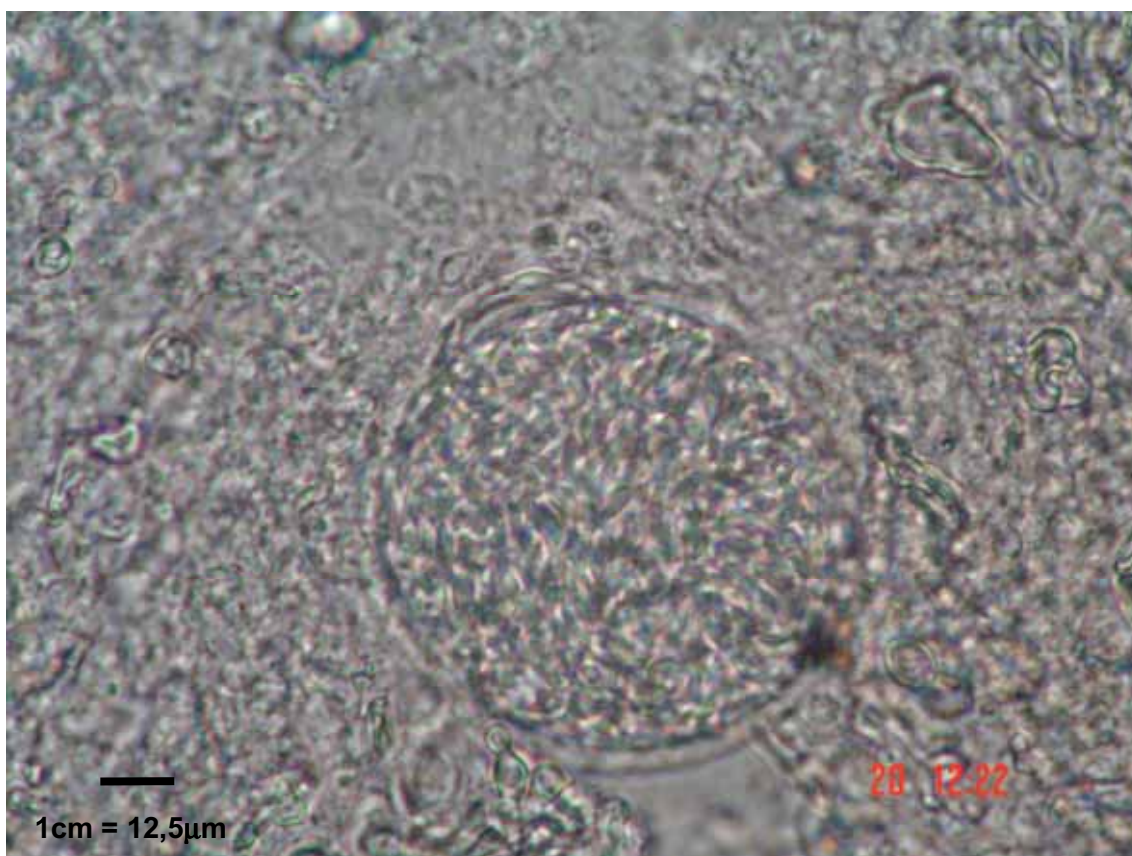
No bioensaio referente ao ovino B052, somente três de quatro (75,0%) dos camundongos inoculados com material cerebral morreram no 19º, 20º e 26º dia pós-inoculação (p.i.), e o outro sobreviveu durante o período de observação de 60 dias, revelando soroconversão. Procedendo-se a pesquisa citológica de cistos teciduais no material cerebral, de coração e de pulmão deste camundongo, observou-se de três (pulmão, e coração – Figura 11) a sete (cérebro – Figura 12) cistos em 25µL, de um volume de 0,5mL de cada suspensão, com valor aproximado de 60 a 140 cistos/0,5mL.



**Figura 11.** Cisto tecidual de *T. gondii* identificado no coração de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B052. Microscópio óptico JENAMED (400x). Botucatu, 2009.

Com o material do ovino B076, todos os animais sobreviveram aos 60 dias, e somente dois camundongos, inoculados com material cerebral, soroconverteram, e foram positivos na pesquisa de cistos teciduais, com média de 240 cistos/0,5mL.

Referente ao material do ovino B082, dois camundongos, inoculados com material cerebral morreram aos 21 e 29 dias p.i., apresentando estruturas semelhantes à taquizoítos no líquido peritoneal. Além destes, após 60 dias p.i. um camundongo soroconverteu, e outro não. Outros três camundongos inoculados com material pulmonar também soroconverteram, com identificação de cistos cerebrais (200 cistos/0,5mL). Todos os demais, incluindo o bioensaio do músculo, foram negativos sorologicamente.



**Figura 12.** Cisto tecidual de *T. gondii* identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B052. Microscópio óptico JENAMED (1000x). Botucatu, 2009.

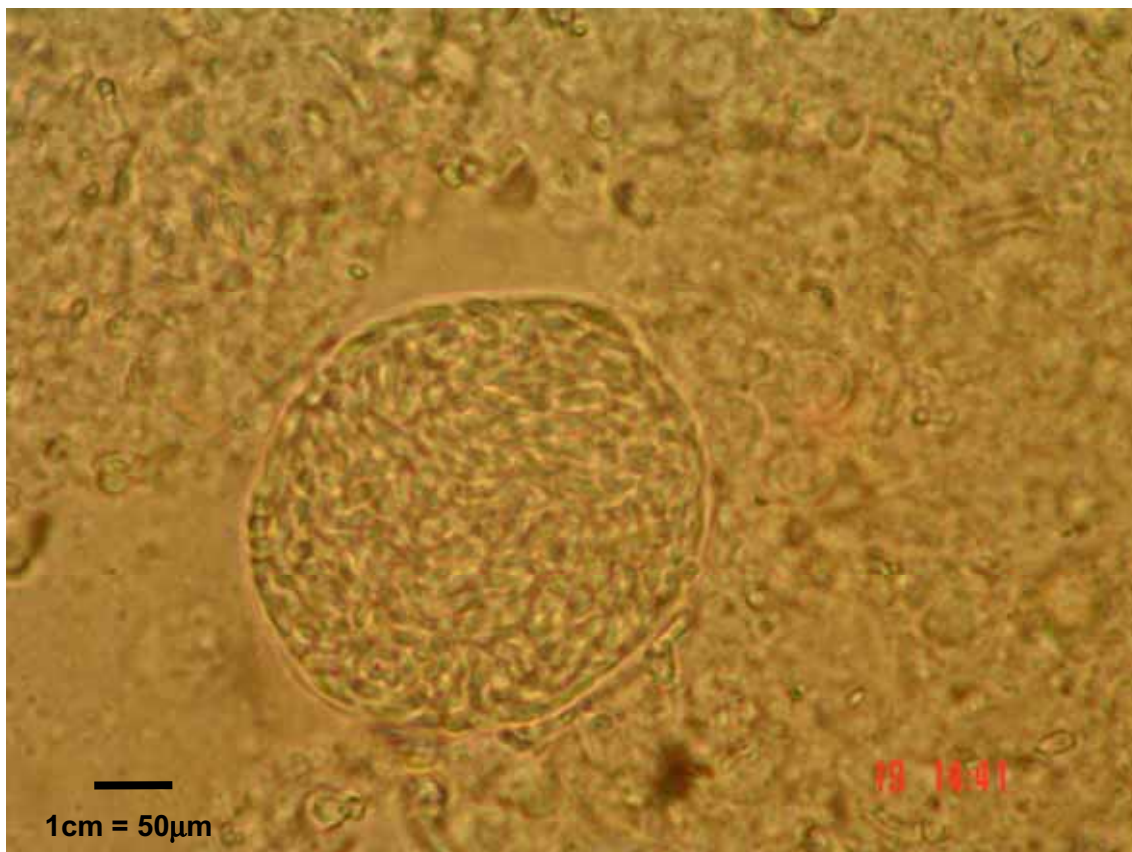
Dos materiais dos animais B185, B252 e B271, os camundongos inoculados com suspensão cerebral vieram a óbito (24, 13 e 12 dias p.i., respectivamente), com produção de cistos no cérebro. Além disso, foram observados também nos outros camundongos, como no caso do B185 (um camundongo inoculado com material cerebral – 14 dias p.i. – Figura 13), B252 (três camundongos inoculados com material cerebral – 12 dias p.i.) e B271 (um

camundongo inoculado com material cerebral – 11 dias p.i.). Nos demais bioensaios com isolamento do agente, os camundongos sobreviveram aos 60 dias de bioensaio, e apresentaram soroconversão. Revelaram ainda cistos em material cerebral e, em alguns casos, taquizoítos no líquido peritoneal.

Com relação ao material do B185, encontrou-se uma média de 770 cistos/0,5mL em material cerebral; 200cistos/0,5mL do B252, também no cérebro, e 200 cistos/0,5mL do B271, em cérebro, pulmão e músculo. Os cistos isolados no B185 foram obtidos a partir de camundongo que morreu 24 dias p.i. e 60 dias p.i. (Figura 14). No caso do B252, de animal que morreu 13 dias p.i., e quanto ao B271, obtido do cérebro 12 dias p.i., de pulmão 24 dias p.i., e músculo 16 e 60 dias p.i. No último caso, verificou-se um número muito maior de cistos nos animais que sobreviveram até o final do período de observação (500 cistos/0,5mL) comparado aos que morreram no início do bioensaio (40 a 60 cistos/0,5mL). No bioensaio do material do ovino B252, o camundongo positivo 13 dias p.i., com cistos cerebrais, apresentou também estruturas semelhantes à taquizoítos.



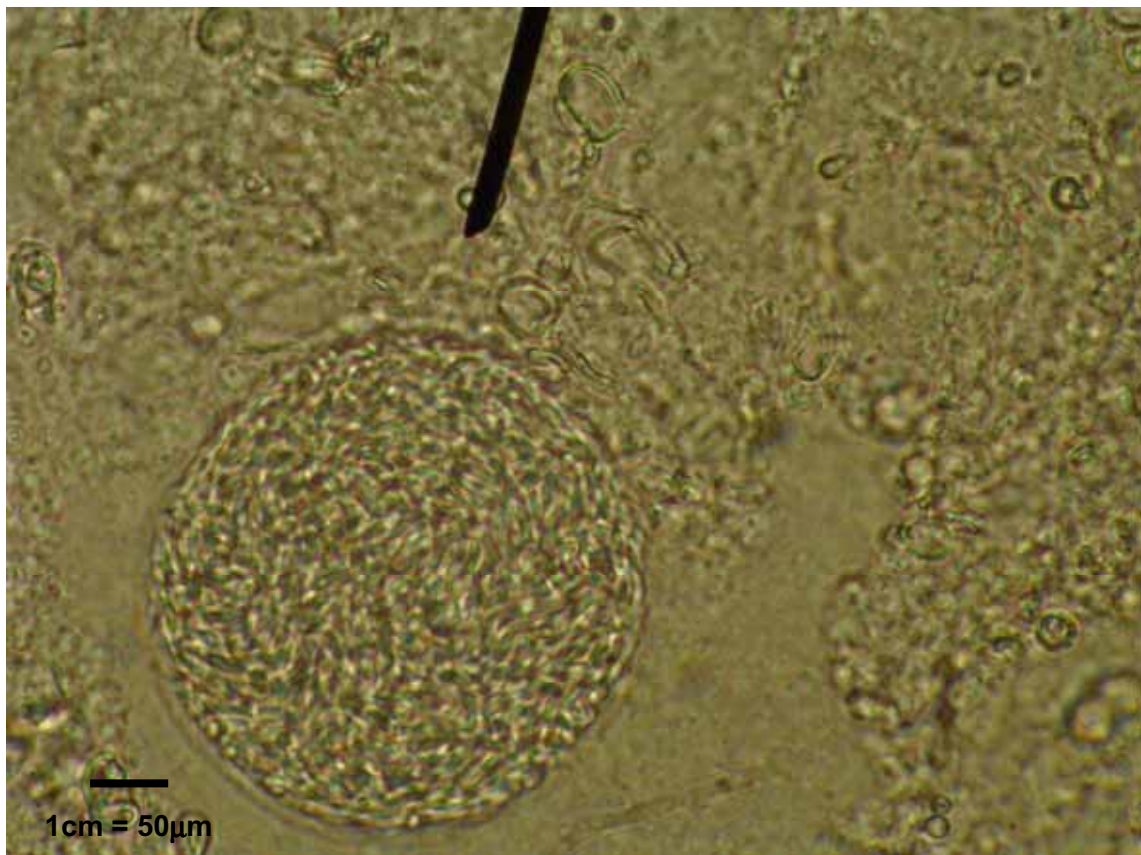
**Figura 13.** Taqizoóito de *T. gondii* identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B185. Microscópio óptico JENAMED (1000x). Botucatu, 2009.



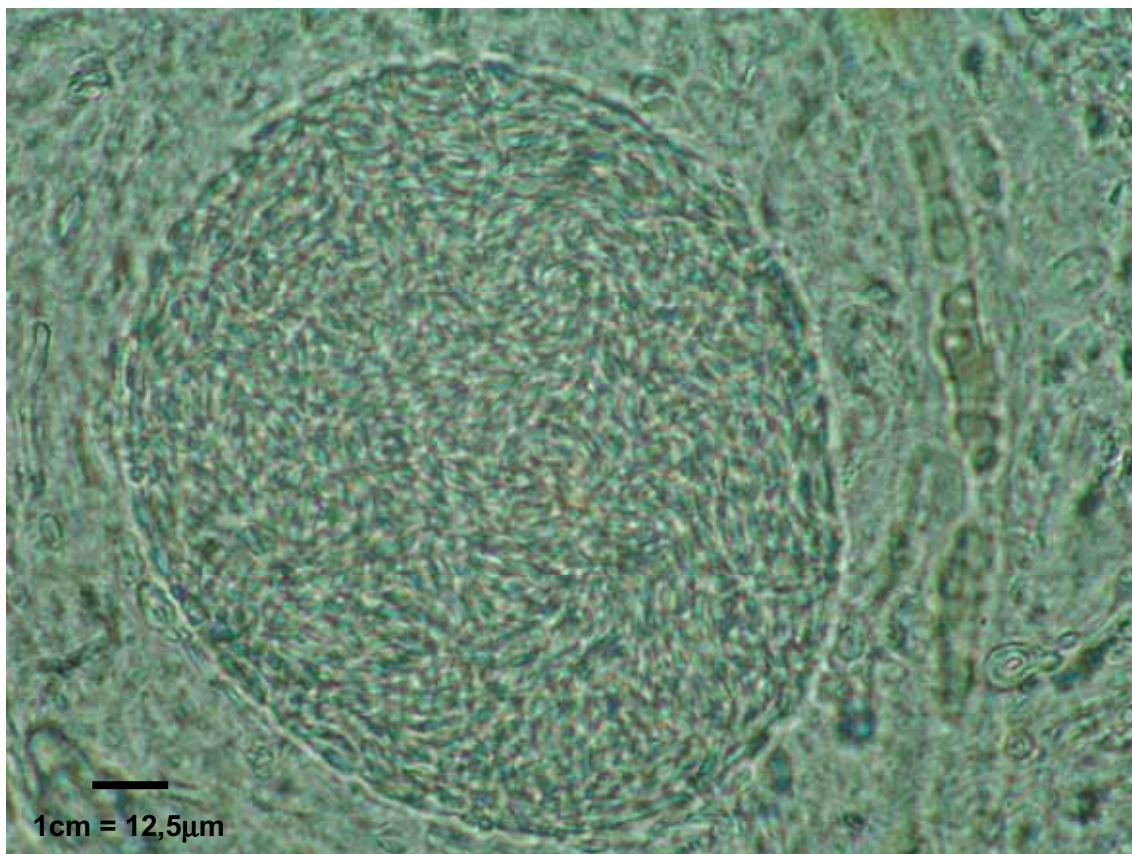
**Figura 14.** Cisto tecidual de *T. gondii* identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B185. Microscópio óptico JENAMED (400x). Botucatu, 2009.

Nos demais bioensaios com detecção de cistos teciduais (B183, B298, B377, B465, B496, B510), todos os isolamentos foram obtidos ao final do período de observação, sendo caracterizadas como amostras avirulentas para camundongos. Nos bioensaios B183, B496 e B510 (Figura 15), todos os camundongos inoculados somente com material cerebral foram soropositivos, detectando-se em média 1120 cistos/0,5mL, 1280 cistos/0,5mL e 720 cistos/0,5mL, respectivamente. Enquanto isso, no B465, somente três camundongos inoculados com material cerebral soroconverteram, apresentando uma média de 360 cistos/0,5mL. Os animais do bioensaio para todos os demais tecidos não soroconverteram. No B298 todos os camundongos inoculados com material cerebral e somente dois camundongos inoculados com material muscular soroconverteram, apresentando uma média de 480 cistos/0,5mL para cada tecido inoculado. No B377, ao final do período

de observação somente um animal inoculado com material cerebral soroconverteu, apresentando 820cistos/0,5mL no cérebro (Figura 16).



**Figura 15.** Cisto tecidual de *T. gondii* identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B510. Microscópio óptico JENAMED (400x). Botucatu, 2009.



**Figura 16.** Cisto tecidual de *T. gondii* identificado no material cerebral de camundongo sorologicamente positivo para MAT-AF, inoculado com material cerebral do ovino B377. Microscópio óptico JENAMED (1000x). Botucatu, 2009.

Referente aos bioensaios B081, B105, B180 e B251, detectou-se somente estruturas semelhantes à taquizoítos no líquido peritoneal de todos os camundongos que morreram durante o experimento, porém nenhum animal soroconverteu, e tampouco apresentou cistos cerebrais.

No bioensaio do ovino B081, os quatro camundongos inoculados com material cerebral morreram 13, 22, 25 e 30 dias p.i., enquanto somente um inoculado com pulmão, morreu 23 dias p.i. Observaram-se estruturas semelhantes à taquizoítos no lavado peritoneal de dois camundongos inoculados com cérebro, e com pulmão. Em um dos animais inoculados com suspensão cerebral não foi possível obter o lavado peritoneal pela intensa reação inflamatória no tecido subcutâneo. No bioensaio dos ovinos B105, B180 e B251, também se detectou somente estruturas semelhantes à taquizoítos no líquido peritoneal em um camundongo morto, inoculado com material muscular (11 dias p.i. – B105; 14 dias p.i. – B251), e em outro inoculado com material

cerebral (21 dias p.i. – B180). Ainda neste último bioensaio, um camundongo inoculado com material muscular morreu 37 dias p.i., porém devido à intensa reação inflamatória no tecido subcutâneo, não foi possível a obtenção de líquido peritoneal. Ainda referente ao B251, um camundongo inoculado com material cerebral e três inoculados com material muscular morreram entre 14 a 19 dias p.i., sendo negativos para a pesquisa de taquizoítos e/ou cistos cerebrais.

Por outro lado, em alguns bioensaios não foram detectados taquizoítos ou cistos teciduais, porém os animais ao final do experimento soroconverteram, como no caso dos bioensaios dos animais B193 (inoculados com material cerebral), B198 (inoculados com material cerebral e um com material muscular), B303 (inoculados com material muscular) e B439 (um camundongo inoculado com material muscular). Desta forma, foram considerados positivos devido à soroconversão.

Todos os demais camundongos inoculados, referente aos ovinos com isolamento positivo, foram negativos sorologicamente ao final do período de observação. Verifica-se assim, que o parasito pode estar presente em determinados tecidos ou órgãos, com carga parasitária insuficiente para induzir a doença, ou sensibilizar o sistema imunológico.

Nos bioensaios B433, B439, B443, B451, B453 e B455 não foi realizada a inoculação de material pulmonar em virtude do número limitado de camundongos fornecido pelo Biotério Central, e, portanto, foi dada preferência para a inoculação de material cerebral e muscular. Mesmo assim, o material pulmonar foi processado assim como os demais tecidos, e aliquotado para a PCR.

Já no bioensaio B471, todos os camundongos inoculados com material cerebral morreram 2 dias p.i. Procedeu-se nova inoculação, mas o resultado foi o mesmo, fato que ocorreu provavelmente por contaminação da amostra. Separou-se alíquota para a PCR para confirmação da infecção toxoplásmica. Com os demais tecidos o mesmo não ocorreu.

Pode-se observar nas Tabelas 21 a 23 que houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os bioensaios realizados dos diferentes tecidos ovinos, com maior positividade para o tecido cerebral, e igual positividade com pulmão e músculo quando analisados em conjunto.

**Tabela 21.** Associação entre os resultados do bioensaio de material cerebral e do pulmão. Botucatu, 2009.

<b>Pulmão</b>	<b>Cérebro</b>		<b>Total</b>
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
Negativo	49	13	62
Positivo	00	04	04
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,0033$ )

**Tabela 22.** Associação entre os resultados do bioensaio de material cerebral e do músculo. Botucatu, 2009.

<b>Músculo</b>	<b>Cérebro</b>		<b>Total</b>
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
Negativo	46	13	59
Positivo	03	04	07
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,0664$ ); OR = 4,7179 (0,9350-23,8075)

**Tabela 23.** Associação entre os resultados do bioensaio de material muscular e do pulmão. Botucatu, 2009.

<b>Pulmão</b>	<b>Músculo</b>		<b>Total</b>
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
Negativo	56	06	62
Positivo	03	01	04
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>07</b>	<b>66</b>

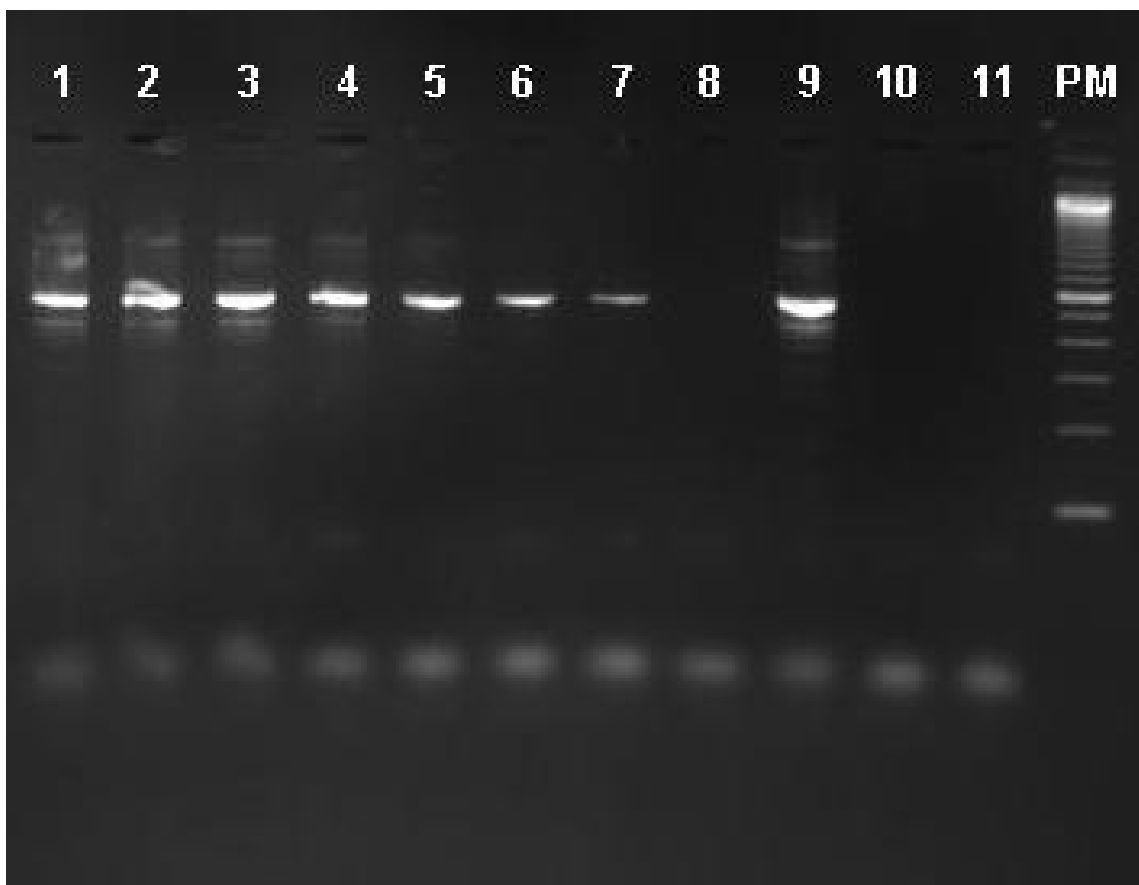
Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,3685$ ); OR = 3,1111 (0,2781-34,8038)

### 5.3. Biologia molecular

#### 5.3.1. Limiar de detecção

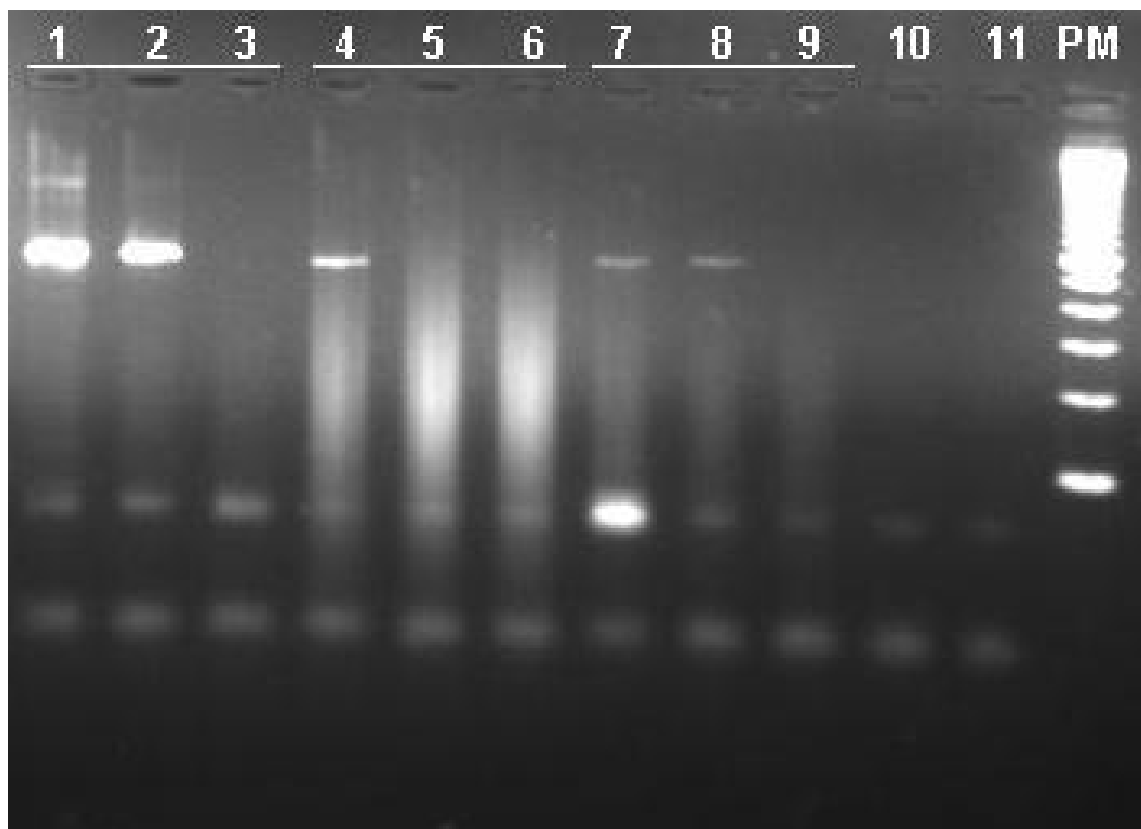
A PCR para a detecção da sequência repetida de 529pb detectou  $10^0$  taquizoítos/mL em água (Figura 17),  $10^1$  taquizoítos/mL em suspensões de

tecido cerebral e muscular, e  $10^2$  taquizoítos/mL em suspensão de tecido pulmonar (Figura 18).



**Figura 17.** Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR, em água contaminada experimentalmente. Botucatu, 2009.

Legenda: 1)  $10^6$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 2)  $10^5$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 3)  $10^4$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 4)  $10^3$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 5)  $10^2$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 6)  $10^1$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 7)  $10^0$  taquizoítos da cepa RH / mL de água; 8) água ultrapura (controle negativo da extração); 9) controle positivo; 10) água ultrapura (controle negativo da extração); 11) água ultrapura (controle negativo da PCR); PM) padrão de peso molecular 100 pares de bases (pb), Invitrogen®.



**Figura 18.** Detecção de DNA de *Toxoplasma gondii* pela PCR, em amostras teciduais de ovinos, contaminadas experimentalmente. Botucatu, 2009.

Legenda: 1)  $10^2$  taquizoítos da cepa RH / mL de cérebro; 2)  $10^1$  taquizoítos da cepa RH / mL de cérebro; 3)  $10^0$  taquizoítos da cepa RH / mL de cérebro; 4)  $10^2$  taquizoítos da cepa RH / mL de pulmão; 5)  $10^1$  taquizoítos da cepa RH / mL de pulmão; 6)  $10^0$  taquizoítos da cepa RH / mL de pulmão; 7)  $10^2$  taquizoítos da cepa RH / mL de músculo; 8)  $10^1$  taquizoítos da cepa RH / mL de músculo; 9)  $10^0$  taquizoítos da cepa RH / mL de músculo; 10) água ultrapura (controle negativo da extração); 11) água ultrapura (controle negativo da PCR); PM) padrão de peso molecular 100 pares de bases (pb), Invitrogen®.

### 5.3.2. PCR das amostras ovinas

A PCR detectou o DNA de *T. gondii* em 21/66 (31,8%) ovinos soropositivos (Tabela 24), com uma sensibilidade de 31,8%, especificidade de 100%, e concordância de 0,18 com a MAT-AF, apresentando uma associação significativa quando analisados os resultados da PCR com os títulos de anticorpos da MAT-AF, onde quanto maior a titulação, maiores as chances de se obter um resultado positivo na PCR (Tabela 25; Figura 19). Em um ovino, detectou-se DNA a partir do cérebro de camundongos do bioensaio com cérebro do ovino B465, com 360 cistos/0,5mL, constituindo-se, portanto, 22/66 (33,3%) amostras positivas de ovinos para a pesquisa de DNA de *T. gondii* para a caracterização genotípica.

**Tabela 24.** Frequência de animais positivos a sorologia em relação a PCR dos ovinos, independente do teste e tecido analisado. Botucatu, 2009.

PCR (ovino)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (30,8)	45 (69,2)	65 (75,6)
Positivo	0 (0,0)	21 (100,0)	21 (24,4)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 43,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,18 \pm 0,04$  (0,08-0,27)  
 S=31,8%; E=100%; VPP=100%; VPN=30,8%

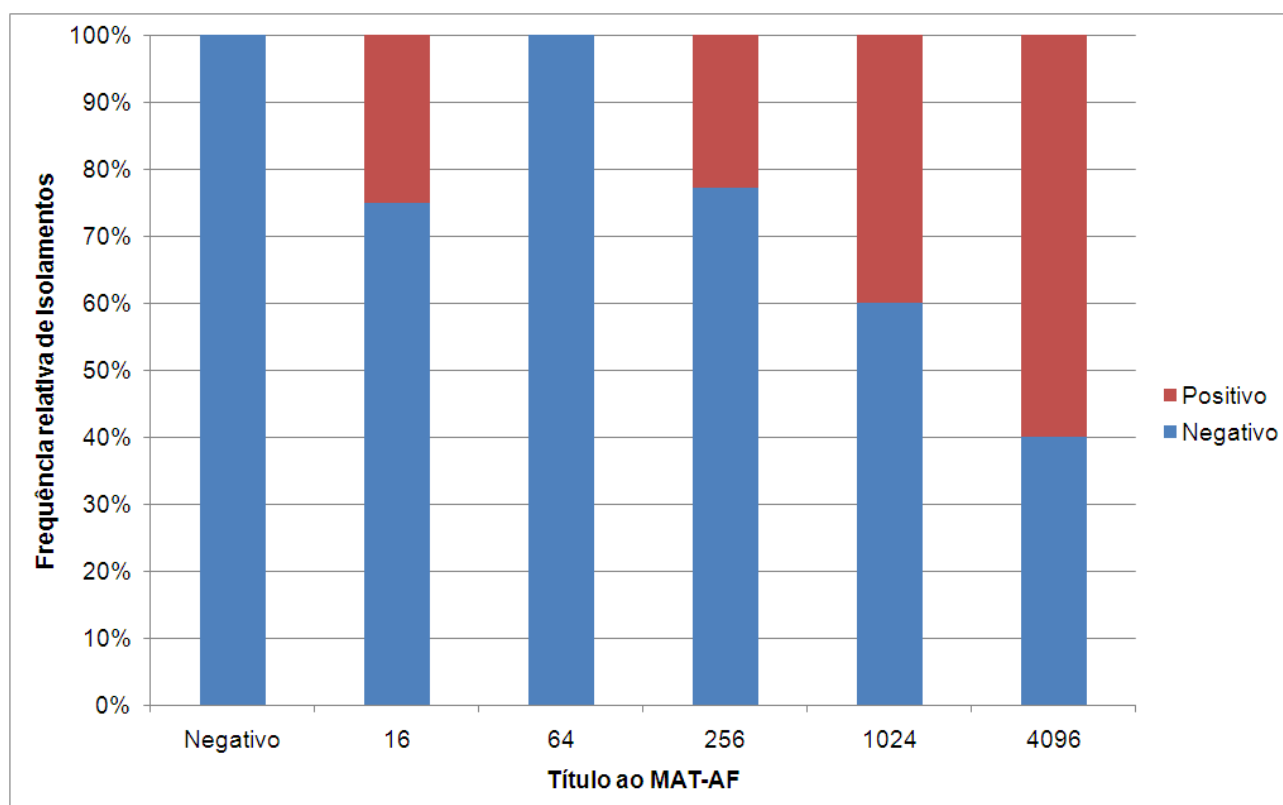
Houve predileção pelo tecido cerebral (Tabela 26), em relação ao pulmão (Tabela 27) e músculo (Tabela 28). Destes, 14 apresentaram também isolamento do parasito. 28 amostras teciduais foram positivas à PCR, sendo 17 cérebros, dois pulmões e nove músculos (Tabela 15). Dos resultados positivos à PCR e ao isolamento, em 11 foram identificados cistos e em três observaram-se estruturas semelhantes à taquizoítos. Concomitantemente, realizou-se também a PCR de animais controle sorologicamente negativos, para a confirmação da especificidade da técnica, não se detectando DNA do parasito a partir de amostras teciduais de ovinos sorologicamente negativos, também negativos ao isolamento (Tabela 16).

Animais com títulos iguais ou superiores a 256 na MAT do bioensaio apresentaram cistos, principalmente no cérebro, permitindo um direcionamento quanto ao órgão de eleição na localização do parasito na epidemiologia da infecção.

**Tabela 25.** Frequência relativa de resultados da PCR dos ovinos, independente do tecido analisado, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	PCR (ovino)		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	17 (77,3)	5 (22,7)	22 (25,9)
1024	18 (60,0)	12 (40,0)	30 (35,3)
4096	2 (40,0)	3 (60,0)	5 (5,9)
<b>Total</b>	<b>64 (75,3)</b>	<b>21 (24,7)</b>	<b>85 (100,0)</b>

Estatística: Teste-G = 17,74; valor de  $P = 0,0033$



**Figura 19.** Frequência relativa de resultados da PCR dos ovinos, segundo o título de anticorpos obtido na MAT-AF. Botucatu, 2009.

Analisando-se cada tecido separadamente, a PCR direta do cérebro ovino apresentou maior sensibilidade 25,8%, comparada a do músculo (13,6%) e pulmão (7,6%) (Tabelas 26 a 28). Porém, ao se analisar os títulos de anticorpos, somente a PCR de cérebro apresentou associação significativa ( $P < 0,05$ ) com a sorologia, onde quanto maiores os títulos, maiores as chances de detecção de resultado positivo à PCR (Tabela 29; Figura 20). O mesmo resultado foi observado para músculo (Tabela 30; Figura 21) e pulmão (Tabela 31; Figura 22), porém sem associação significativa.

**Tabela 26.** Frequência de animais positivos a sorologia, independente do teste sorológico utilizado, em relação a PCR de cérebro dos ovinos. Botucatu, 2009.

PCR (cérebro:ovino)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (20,9)	49 (71,0)	69 (80,2)
Positivo	0 (0,0)	17 (100,0)	17 (19,8)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 47,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,14 \pm 0,04$  (0,06-0,22)  
S=25,8%; E=100%; VPP=100%; VPN=29,0%

**Tabela 27.** Frequência de animais positivos a sorologia, independente do teste utilizado, em relação a PCR de pulmão dos ovinos. Botucatu, 2009.

PCR (pulmão:ovino)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (24,7)	61 (75,3)	81 (94,2)
Positivo	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (5,8)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 59,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,04 \pm 0,02$  (0,00-0,07)  
S=7,6%; E=100%; VPP=100%; VPN=24,5%

**Tabela 28.** Frequência de animais positivos a sorologia, independente do teste utilizado, em relação a PCR de músculo dos ovinos. Botucatu, 2009.

PCR (músculo:ovino)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (26,0)	57 (74,0)	77 (89,5)
Positivo	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (10,5)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

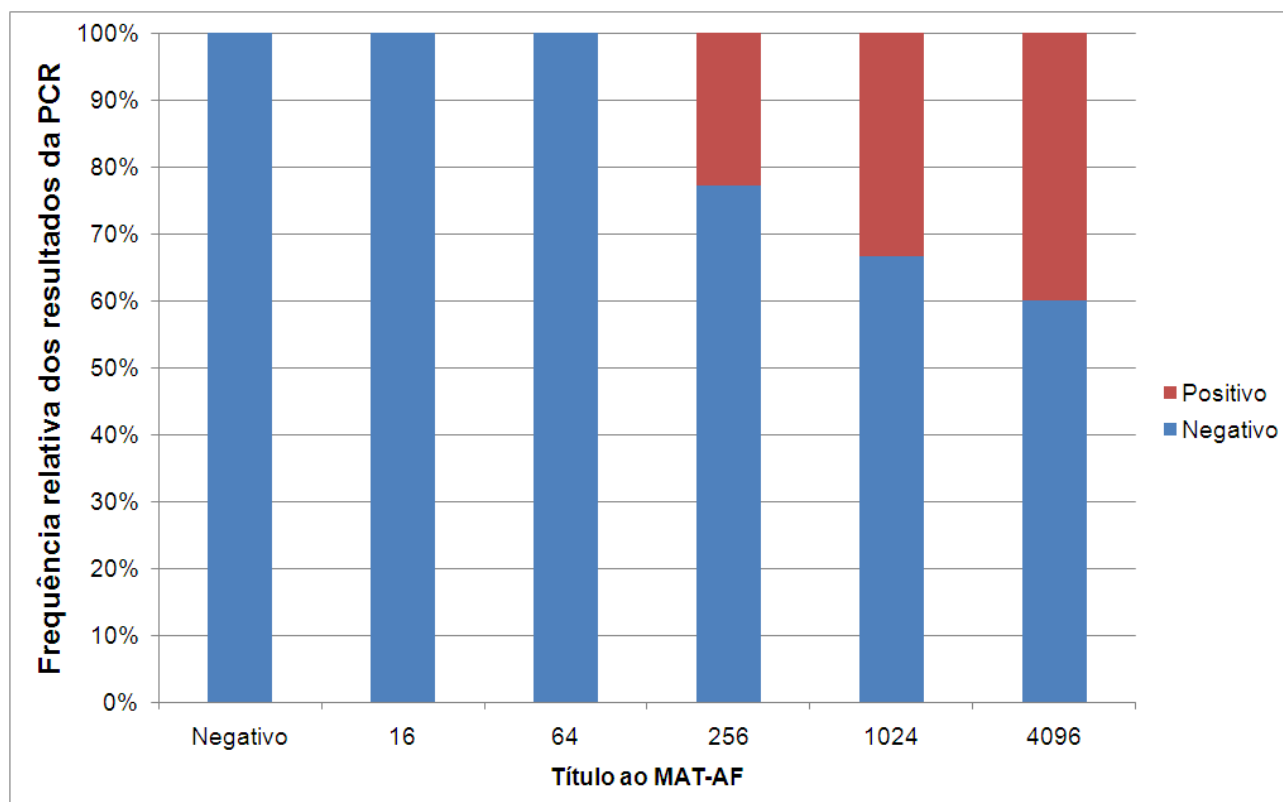
Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 55,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,07 \pm 0,03$  (0,02-0,12)  
 S=13,6%; E=100%; VPP=100%; VPN=26,0%

Somente dois ovinos apresentaram PCR positiva de cérebro em estágio intermediário de infecção. Porém, o isolamento do parasito resultou negativo, fato que comprometeu a genotipagem pela baixa carga parasitária (Tabelas 32 a 34). Associação significativa não foi observada entre a PCR dos tecidos e os estágios de infecção no momento do abate.

**Tabela 29.** Frequência relativa de resultados da PCR de cérebro dos ovinos, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	PCR (cérebro:ovino)		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	17 (77,3)	5 (22,7)	22 (25,9)
1024	20 (66,7)	10 (33,3)	30 (35,3)
4096	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (5,9)
Total	68 (80,0)	17 (20,0)	85 (100,0)

Estatística: Teste-G = 14,49; valor de  $P = 0,0128$

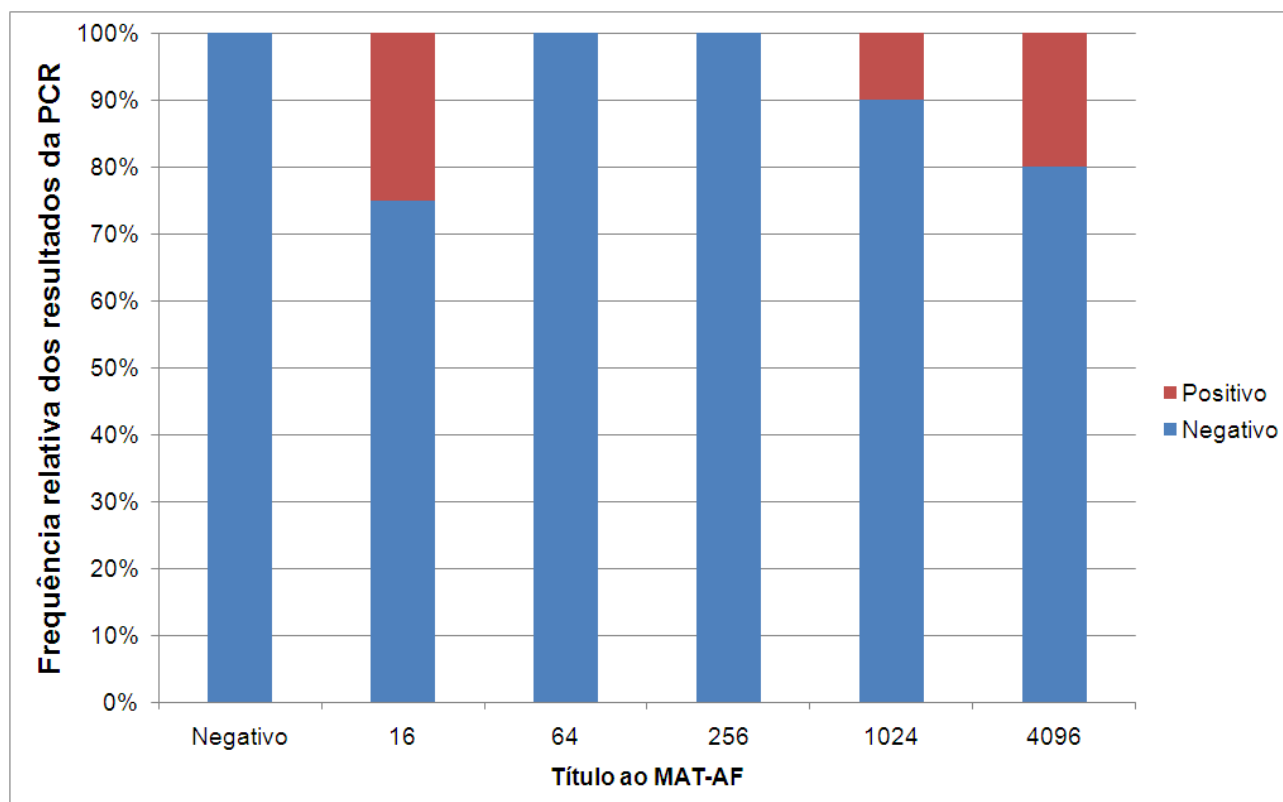


**Figura 20.** Frequência relativa de resultados da PCR de cérebro dos ovinos, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

**Tabela 30.** Frequência relativa de resultados da PCR de pulmão dos ovinos, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	PCR (pulmão:ovino)		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	22 (100,0)	0 (0,0)	22 (25,9)
1024	27 (90,0)	3 (10,0)	30 (35,3)
4096	4 (80,0)	1 (20,0)	5 (5,9)
<b>Total</b>	<b>80 (94,1)</b>	<b>5 (5,9)</b>	<b>85 (100,0)</b>

Estatística: Teste-G = 6,16; valor de  $P = 0,2908$

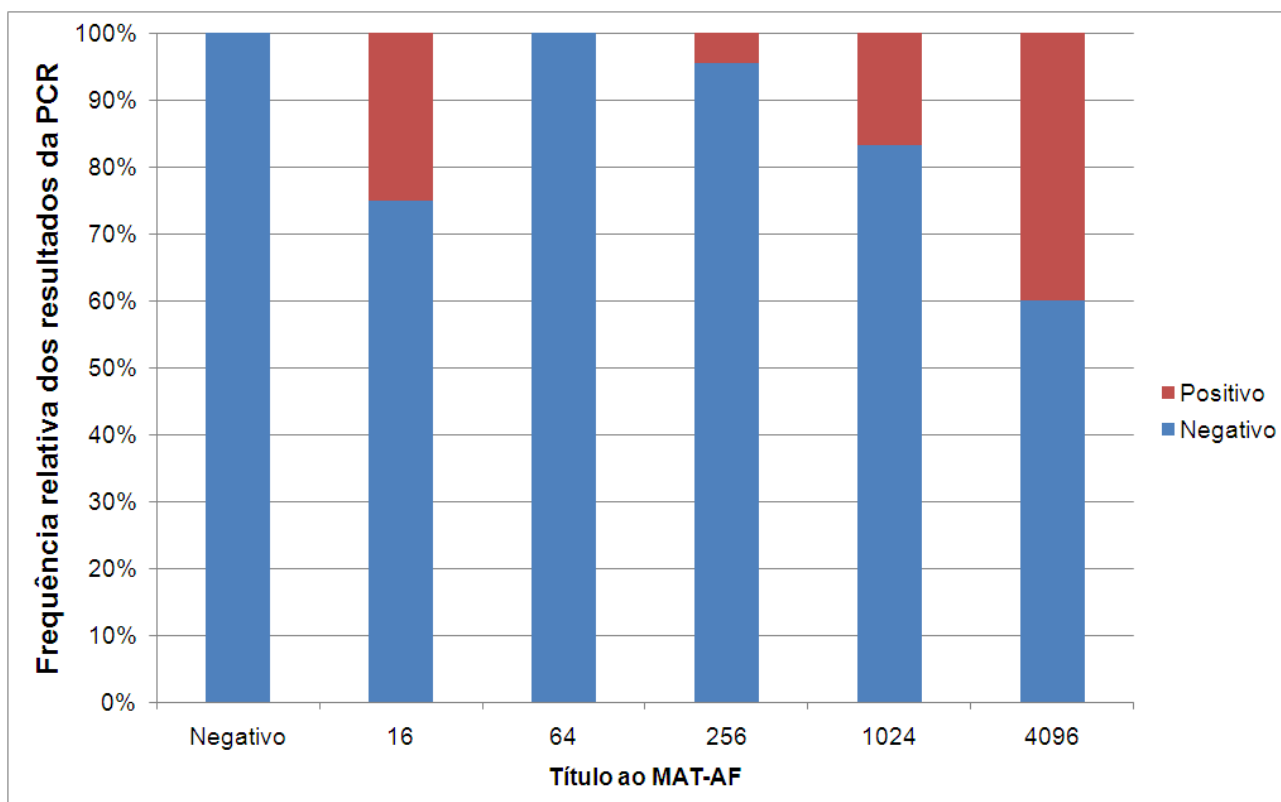


**Figura 21.** Frequência relativa de resultados da PCR de pulmão dos ovinos, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

**Tabela 31.** Frequência relativa de resultados da PCR de músculo dos ovinos, segundo o título de anticorpos pela MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	PCR (músculo:ovino)		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	21 (95,5)	1 (4,5)	22 (25,9)
1024	25 (83,3)	5 (16,7)	30 (35,3)
4096	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (5,9)
<b>Total</b>	<b>76 (89,4)</b>	<b>9 (10,6)</b>	<b>85 (100,0)</b>

Estatística: Teste-G = 8,75; valor de  $P = 0,1194$



**Figura 22.** Frequência relativa de resultados da PCR de músculo dos ovinos, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

**Tabela 32.** Frequência de resultados da PCR de cérebro dos ovinos em relação o estágio da infecção, independente do teste. Botucatu, 2009.

Estágio sorológico	PCR (cérebro:ovino)		
	Negativo	Positivo	Total
Agudo	00	00	00
Crônico	46	15	61
Indeterminado	03	02	05
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,3836$ ); OR = 2,0444 (0,3114-13,4216)

**Tabela 33.** Frequência de resultados da PCR de pulmão dos ovinos em relação o estágio da infecção, independente do teste. Botucatu, 2009.

Estágio de infecção	PCR (pulmão:ovino)		
	Negativo	Positivo	Total
Agudo	00	00	00
Crônico	59	02	61
Indeterminado	05	00	05
Total	64	02	66

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,8531$ )

**Tabela 34.** Frequência de resultados da PCR de músculo dos ovinos de acordo com o estágio da infecção, independente do teste. Botucatu, 2009.

Estágio sorológico	PCR (músculo:ovino)		
	Negativo	Positivo	Total
Agudo	00	00	00
Crônico	52	09	61
Indeterminado	05	00	05
Total	57	09	66

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,4685$ )

Pode-se observar nas Tabelas 35 a 37 que houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) somente entre as PCRs realizadas a partir de cérebro e de músculo (Tabela 36), com seis amostras positivas para ambas as técnicas. Por outro lado, as associações entre PCR de cérebro e pulmão (Tabela 35), e músculo e pulmão (Tabela 37) não apresentaram diferença significativa, com nenhuma e uma amostra positiva detectada pelas associações, respectivamente.

**Tabela 35.** Associação entre os resultados da PCR de cérebro e pulmão. Botucatu, 2009.

<b>Pulmão</b>	<b>Cérebro</b>		<b>Total</b>
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
Negativo	47	17	64
Positivo	02	00	02
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,5482$ )

**Tabela 36.** Associação entre os resultados da PCR de cérebro e músculo. Botucatu, 2009.

<b>Músculo</b>	<b>Cérebro</b>		<b>Total</b>
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
Negativo	46	11	57
Positivo	03	06	09
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>17</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,0068$ ); OR = 8,3636 (1,8036-38,7845)

**Tabela 37.** Associação entre os resultados da PCR de músculo e pulmão. Botucatu, 2009.

<b>Pulmão</b>	<b>Músculo</b>		<b>Total</b>
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	
Negativo	56	08	64
Positivo	01	01	02
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>09</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,2559$ ; OR = 7,0000 (0,3972-123,3538))

Dos 20 isolamentos obtidos, sete animais apresentaram a infecção em dois tecidos, sendo seis no cérebro e músculo, e somente um no tecido pulmonar e músculo (Tabelas 38 a 40). Na Tabela 38, pode-se observar que a PCR e o bioensaio de cérebro apresentaram sensibilidade idênticas, visto que

ambas detectaram um número elevado (12) de amostras verdadeiramente positivas e cinco falso-positivas. Em contrapartida, na Tabela 39, o bioensaio de pulmão detectou quatro animais com a presença de estruturas semelhantes a taquizoítos, não confirmadas na PCR. Enquanto isso, a Tabela 40 expressa a diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre o bioensaio e a PCR de músculo, com apenas três amostras detectadas simultaneamente.

Observou-se uma sensibilidade maior do bioensaio, na detecção do DNA do parasito em amostras de pulmão (ovinos B82, B185, B252 e B271), porém para músculo e cérebro, a PCR apresentou melhor resultado (B52, B139, B185, B252, B471 e B496), comparado ao bioensaio (B105, B198, B303 e B439), de acordo com a Tabela 15. Na mesma tabela as amostras M040, C079, C388 e M388 foram relacionadas, pois apesar de soropositivas e apresentarem resultado negativo ao bioensaio, apresentaram fraco produto ou resultado negativo à PCR, impossibilitando a genotipagem completa da amostra.

**Tabela 38.** Frequência de resultados da PCR de cérebro dos ovinos em relação ao bioensaio, independente do tecido analisado. Botucatu, 2009.

Bioensaio	PCR (cérebro)		
	Negativo	Positivo	Total
Negativo	44	05	49
Positivo	05	12	17
Total	49	17	66

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,0000$ ); OR = 21,1200 (5,2379-85,1593)

**Tabela 39.** Frequência de resultados da PCR de pulmão dos ovinos em relação ao bioensaio, independente do tecido analisado. Botucatu, 2009.

<b>Bioensaio</b>	<b>PCR (pulmão)</b>		
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total</b>
Negativo	60	02	62
Positivo	04	00	04
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>02</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,8815$ )

**Tabela 40.** Frequência de resultados da PCR de músculo dos ovinos em relação ao bioensaio, independente do tecido analisado. Botucatu, 2009.

<b>Bioensaio</b>	<b>PCR (músculo)</b>		
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Total</b>
Negativo	53	06	59
Positivo	04	03	07
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>09</b>	<b>66</b>

Estatística: Teste Exato de Fisher (valor de  $P = 0,0476$ ); OR = 6,6250 (1,1879-36,9468)

### 5.3.3. PCR das amostras do bioensaio

As associações da PCR do bioensaio com os resultados da sorologia são apresentados nas Tabelas 41 a 43. Independente do tecido obtido dos camundongos, a PCR do bioensaio apresentou sensibilidade de 22,7%, especificidade de 100% e concordância de 0,12 com a sorologia. Dentre os dois tecidos testados, o cérebro (Tabela 42) foi mais sensível em relação ao músculo (Tabela 43), porém ambos apresentaram maior positividade à PCR em animais com títulos altos. No cérebro, a detecção foi a partir do título 256 (Tabela 44; Figura 23), enquanto no músculo a partir de 1024 (Tabela 45; Figura 24).

**Tabela 41.** Frequência de ovinos soropositivos, independente do teste, em relação a PCR do bioensaio por grupo, independente do tecido analisado. Botucatu, 2009.

PCR (bioensaio/grupo)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (28,2)	51 (71,8)	71 (82,6)
Positivo	0 (0,0)	15 (22,7)	15 (17,4)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 49,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,12 \pm 0,04$  (0,05 – 0,19)  
S=22,7%; E=100%; VPP=100%; VPN=28,2%

**Tabela 42.** Frequência de ovinos soropositivos, independente do teste, em relação a PCR do bioensaio de cérebro, por grupo. Botucatu, 2009.

PCR (bioensaio/cérebro)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (27,8)	52 (72,2)	72 (83,7)
Positivo	0 (0,0)	14 (100,0)	14 (16,3)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 50,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,11 \pm 0,04$  (0,04 – 0,18)  
S=21,2%; E=100%; VPP=100%; VPN=27,8%

**Tabela 43.** Frequência de ovinos soropositivos, independente do teste, em relação a PCR do bioensaio de músculo, por grupo. Botucatu, 2009.

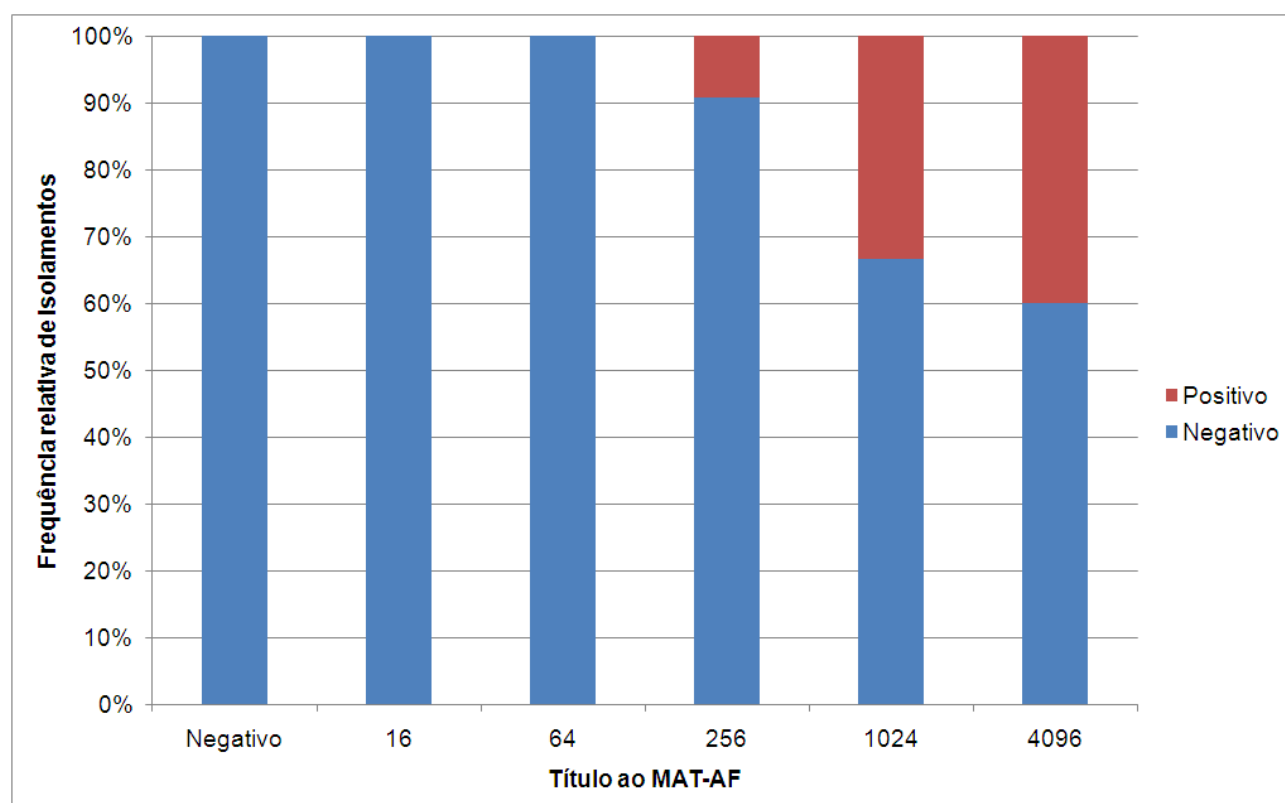
PCR (bioensaio/músculo)	Sorologia		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (25,0)	60 (75,0)	80 (93,0)
Positivo	0 (0,0)	6 (100,0)	6 (7,0)
Total	20 (23,3)	66 (76,7)	86 (100,0)

Estatística:  $\chi^2$  (McNemar) = 58,02 (valor de  $P < 0,0001$ );  $\kappa = 0,04 \pm 0,02$  (0,01 – 0,08)  
S=9,1%; E=100%; VPP=100%; VPN=25%

**Tabela 44.** Frequência relativa de resultados da PCR do bioensaio de cérebro por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	PCR (bioensaio:cérebro)		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	20 (90,9)	2 (9,1)	22 (25,9)
1024	20 (66,7)	10 (33,3)	30 (35,3)
4096	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (5,9)
Total	71 (83,5)	14 (16,5)	85 (100,0)

Estadística: Teste-G = 15,15; valor de  $P = 0,0098$

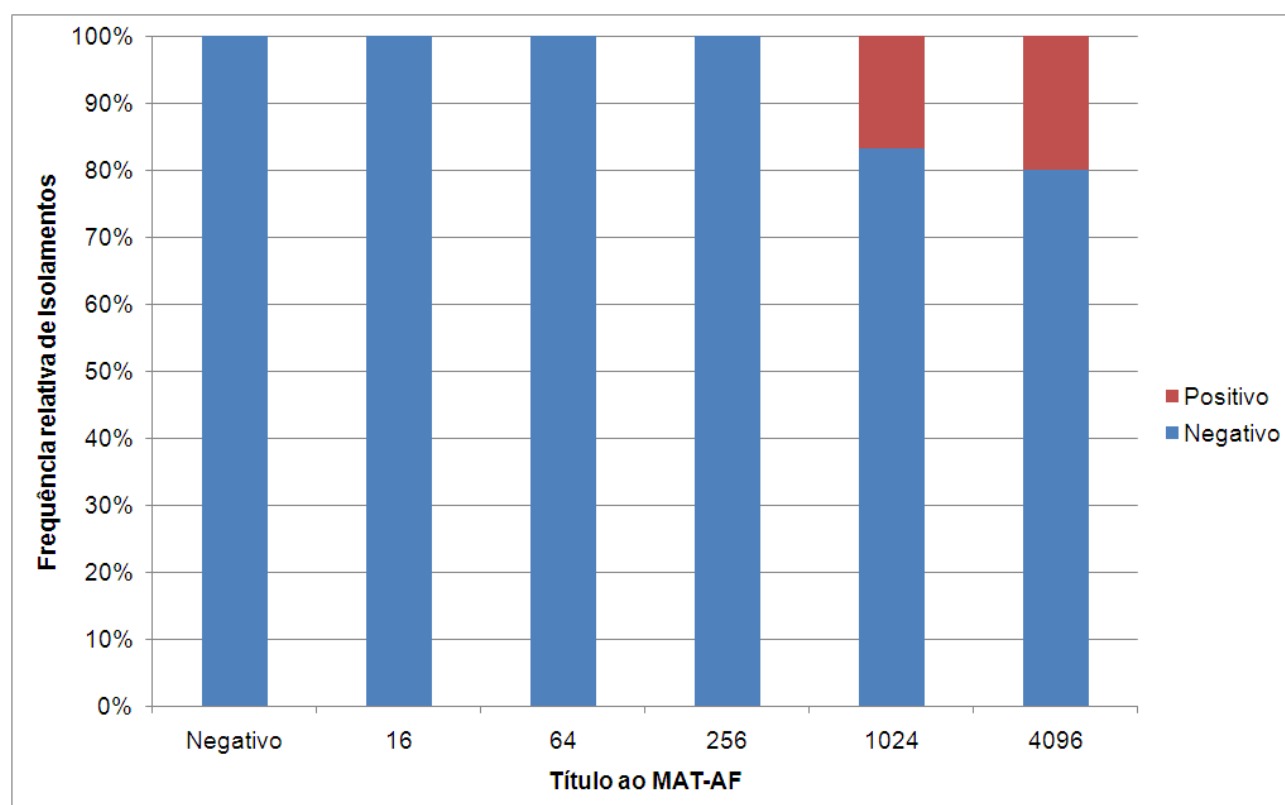


**Figura 23.** Frequência relativa de resultados da PCR de bioensaio de cérebro por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

**Tabela 45.** Frequência relativa de resultados da PCR do bioensaio de músculo por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

MAT-AF (títulos)	PCR (bioensaio:músculo)		
	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Negativo	20 (100,0)	0 (0,0)	20 (23,5)
16	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
64	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (4,7)
256	22 (100,0)	0 (0,0)	22 (25,9)
1024	25 (83,3)	5 (16,7)	30 (35,3)
4096	4 (80,0)	1 (20,0)	5 (5,9)
Total	79 (92,9)	6 (7,1)	85 (100,0)

Estadística: Teste-G = 8,17; valor de  $P = 0,1471$



**Figura 24.** Frequência relativa de resultados da PCR de bioensaio de músculo por grupo, segundo o título de anticorpos na MAT-AF. Botucatu, 2009.

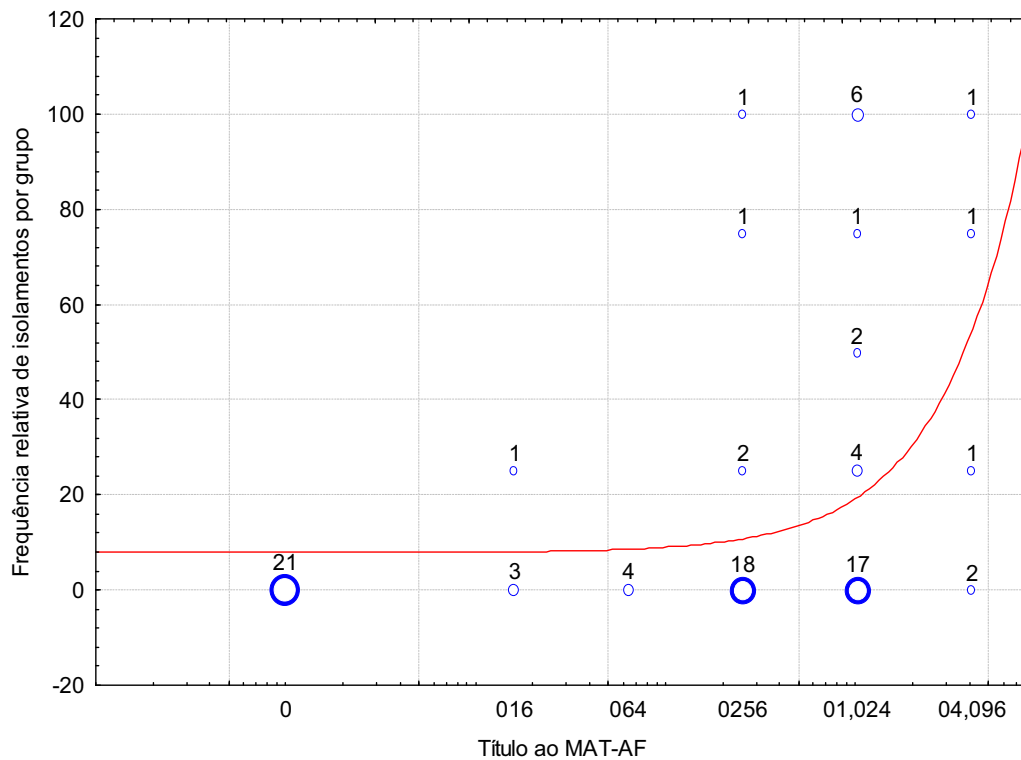
Correlação regular foi obtida entre a MAT-AF e a maioria dos resultados para o bioensaio (Tabela 46; Figuras 25 a 35).

**Tabela 46.** Correlações entre os títulos de anticorpos no teste de MAT-AF e variáveis relacionadas à detecção de *T. gondii*. Botucatu, 2009.

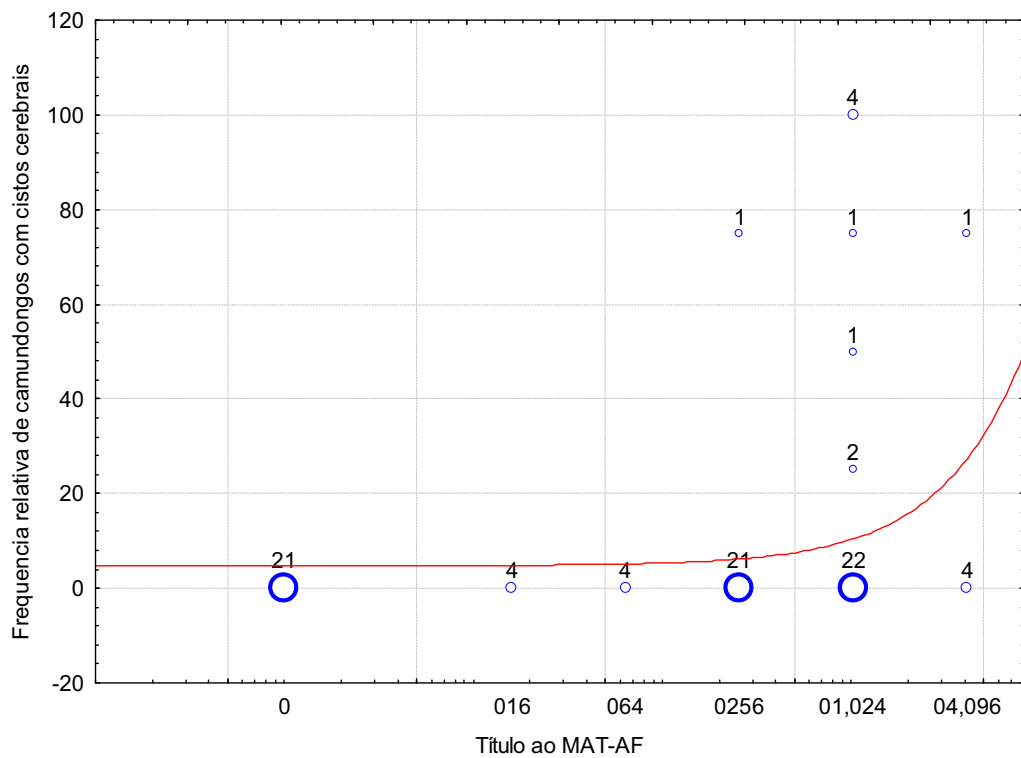
<b>Pares de variáveis</b>	<b>Coefficiente <i>r</i></b>	<b>Valor de <i>P</i></b>	<b>Interpretação</b>
MAT-AF x FIP	0,4466	< 0,0001	Correlação regular
MAT-AF x FIC	0,3357	0,0016	Correlação regular
MAT-AF x FIT	0,3852	0,0002	Correlação regular
MAT-AF x FIS	-0,0044	0,9681	Não significativa
MAT-AF x Sobrevida (Geral)	-0,3099	0,0037	Correlação regular
MAT-AF x Sobrevida (Cérebro)	-0,3478	0,0010	Correlação regular
MAT-AF x Sobrevida (Pulmão)	-0,2141	0,0477	Correlação fraca
MAT-AF x Sobrevida (Músculo)	-0,3048	0,0043	Correlação regular
MAT-AF x PCMC	0,2044	0,0589	Não significativa
MAT-AF x PCR-PCC	0,3966	0,0002	Correlação regular
MAT-AF x PCR-PCM	0,2973	0,0054	Correlação fraca

Estatística: valores de P menores que 0,05 indicam correlação significativa entre os pares de variáveis, pelo teste de Spearman.

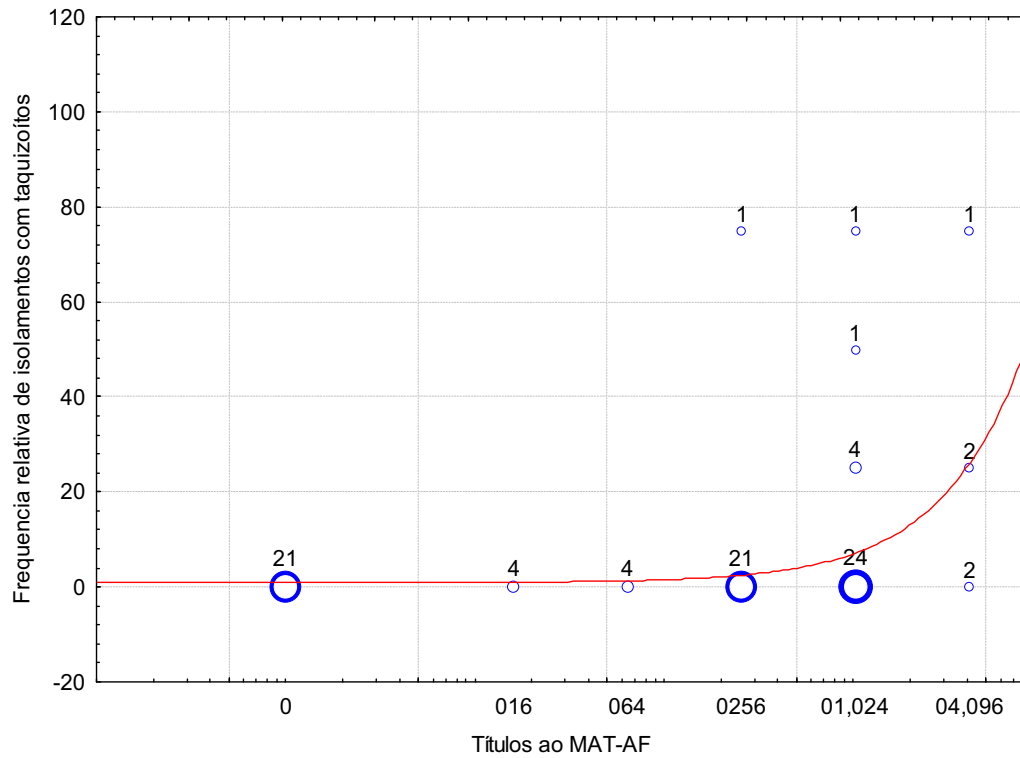
Legenda: FIP: frequência de isolamento por grupo;  
 FIC: frequência relativa de camundongos com cistos teciduais por grupo;  
 FIT: frequência relativa de camundongos com taquizoítos por grupo;  
 FIS: frequência relativa de camundongos soropositivos por grupo;  
 PCMC: frequência relativa de camundongos com cistos inoculados com amostras de músculo;  
 PCR-PCC: frequência relativa de resultados positivos à PCR em camundongos inoculados com amostras de cérebro;  
 PCR-PCM: frequência relativa de resultados positivos à PCR em camundongos inoculados com amostras de músculo.



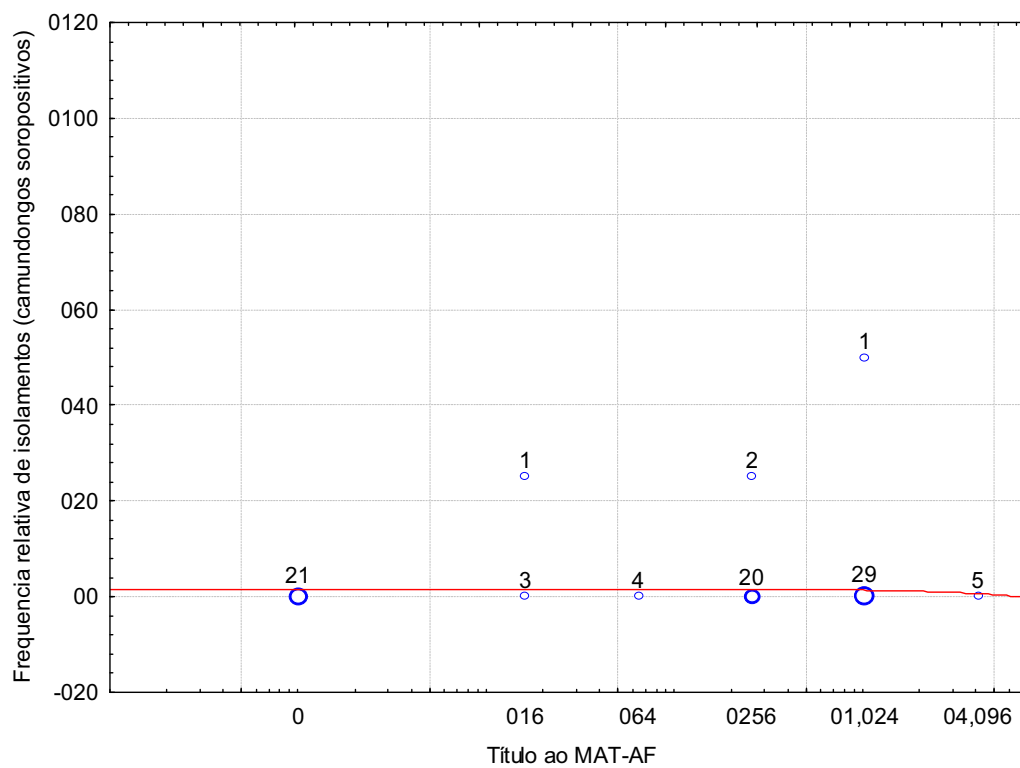
**Figura 25.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de isolamentos por grupo. Botucatu, 2009.



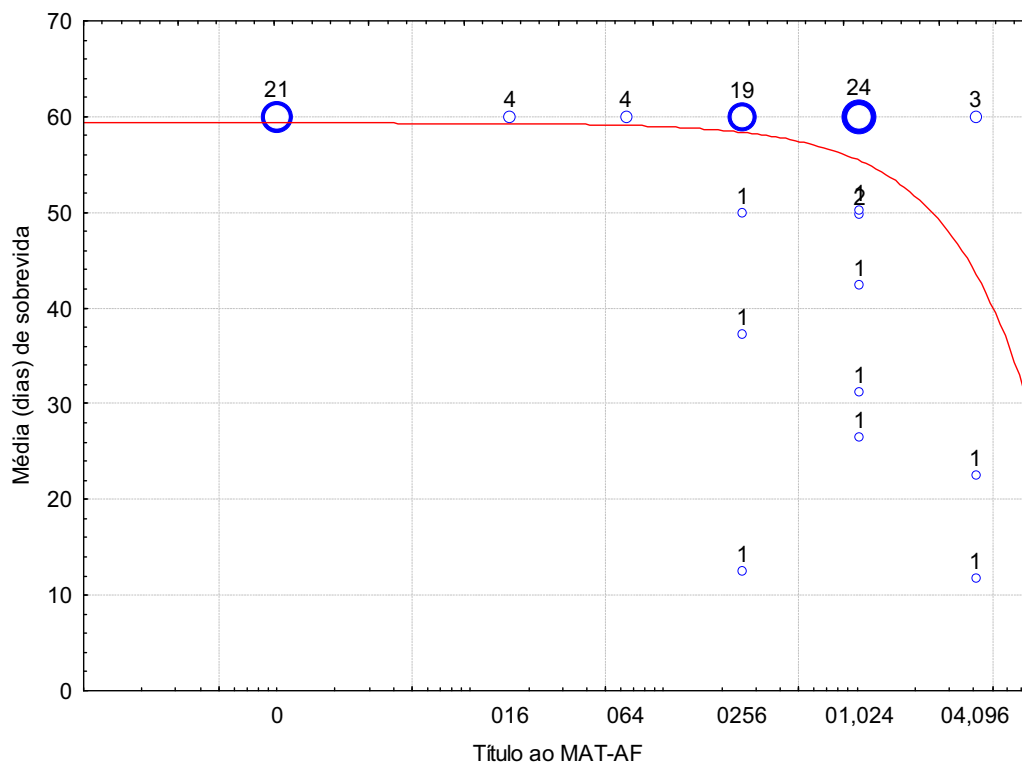
**Figura 26.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos com cistos teciduais por grupo. Botucatu, 2009.



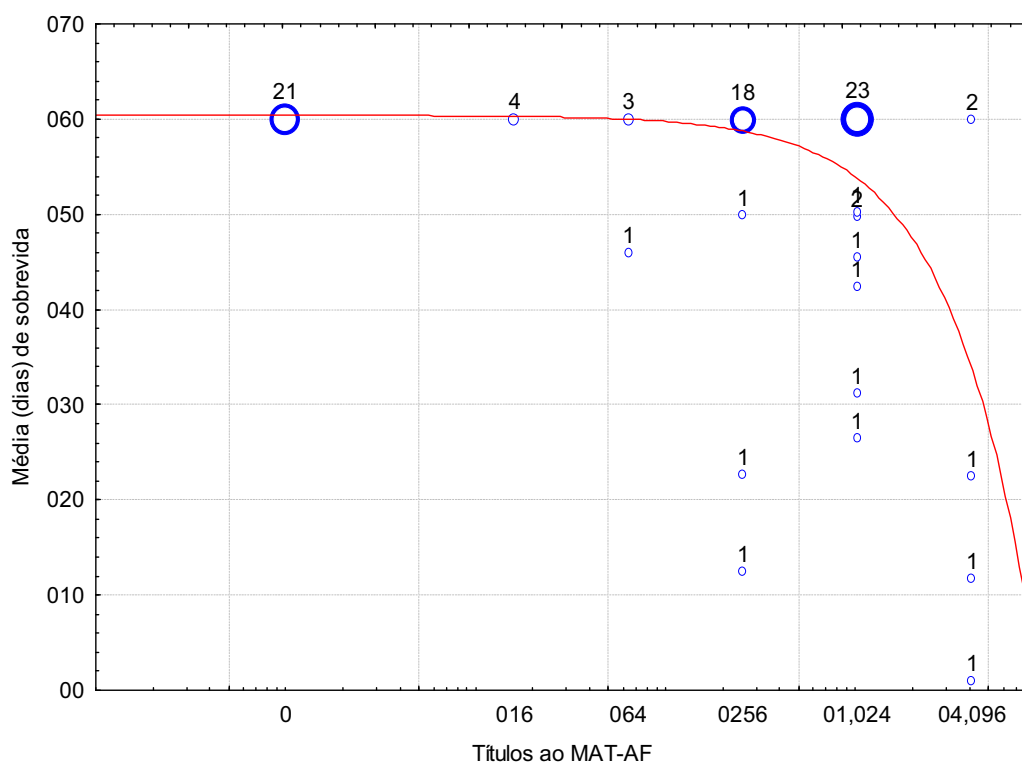
**Figura 27.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos com taquizoítos por grupo. Botucatu, 2009.



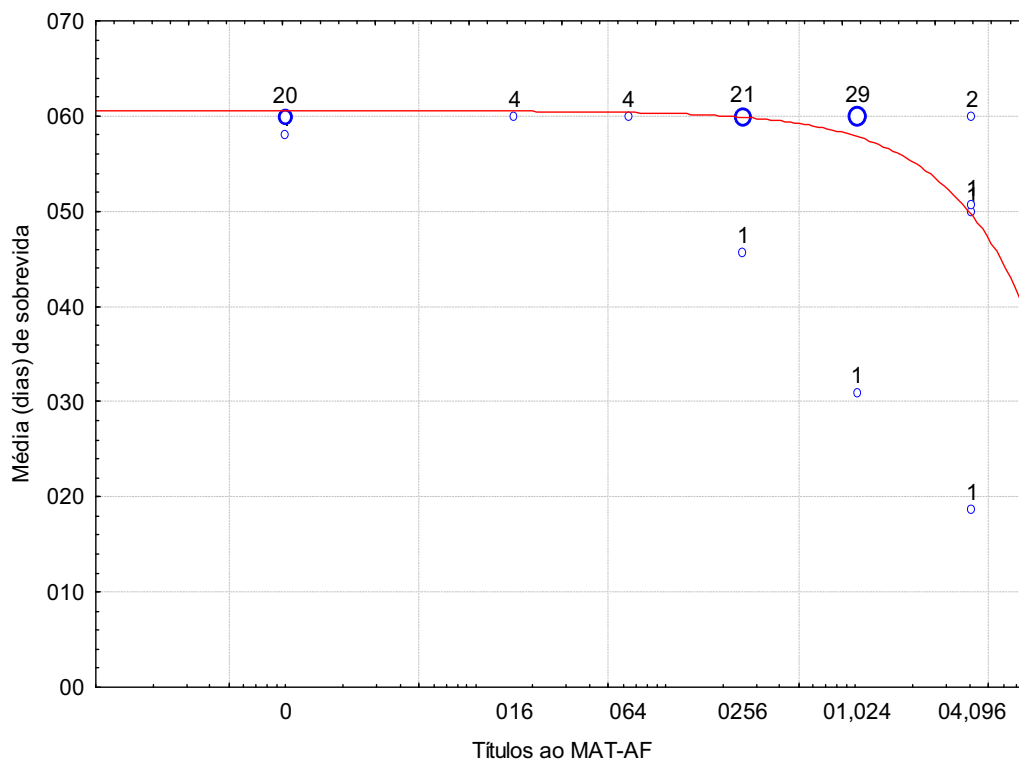
**Figura 28.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos soropositivos por grupo. Botucatu, 2009.



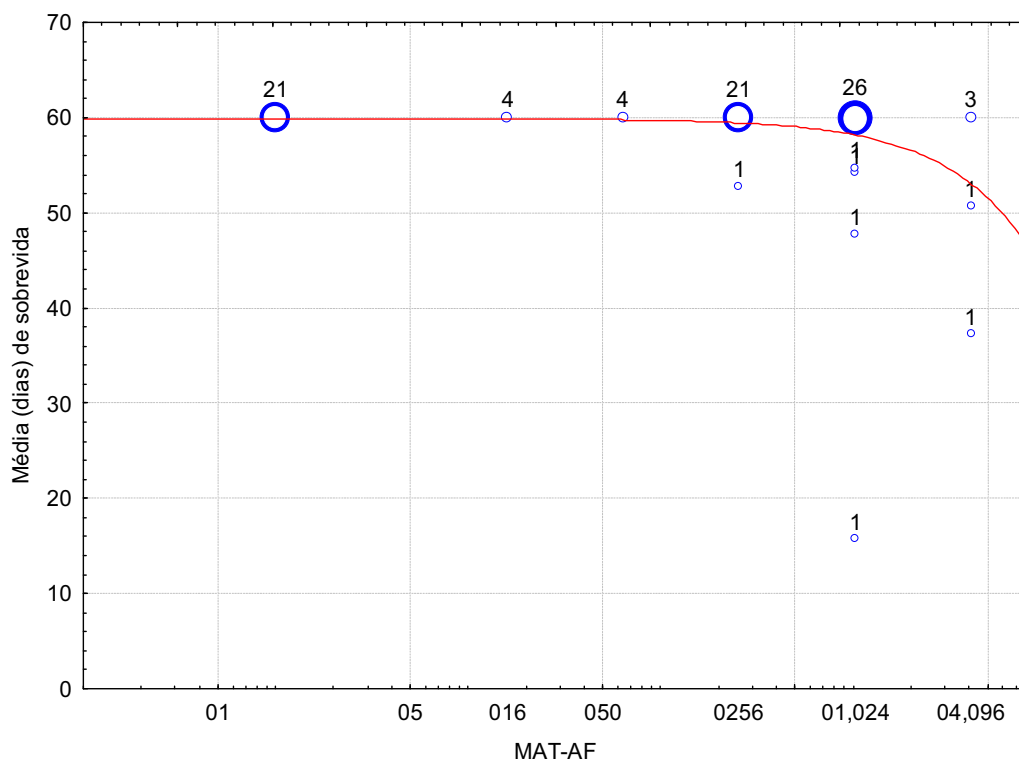
**Figura 29.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos. Botucatu, 2009.



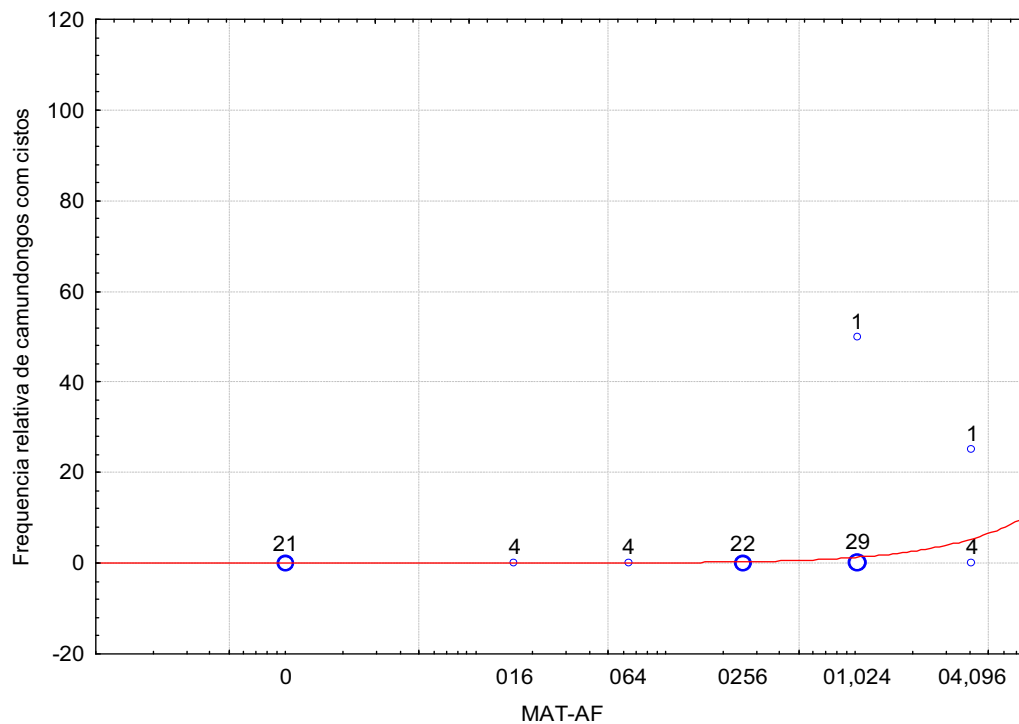
**Figura 30.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de cérebro. Botucatu, 2009.



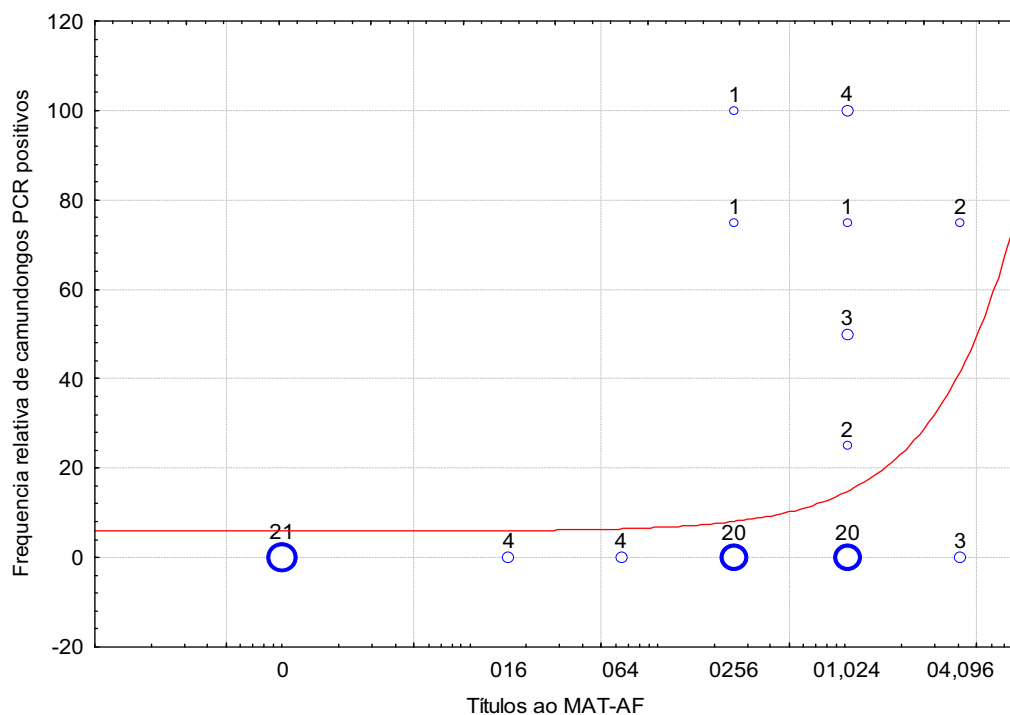
**Figura 31.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de pulmão. Botucatu, 2009.



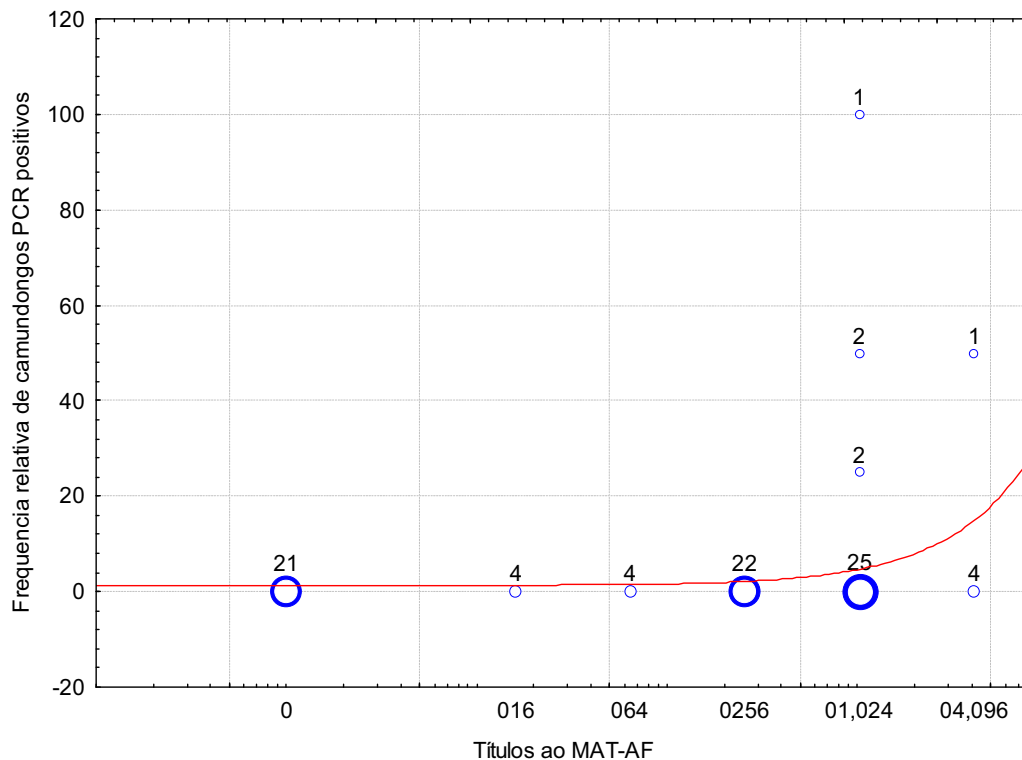
**Figura 32.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a média de sobrevivência dos camundongos inoculados com amostras de músculo. Botucatu, 2009.



**Figura 33.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos com cistos inoculados com músculo. Botucatu, 2009.



**Figura 34.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos positivos à PCR, inoculados com amostras de cérebro. Botucatu, 2009.



**Figura 35.** Correlação entre os títulos da MAT-AF e a frequência relativa de camundongos positivos à PCR, inoculados com amostras de músculo. Botucatu, 2009.

#### 5.3.4. Genotipagem

Alta variabilidade genotípica foi observada, detectando-se dez genótipos diferentes, sendo seis deles atípicos, e outros três comuns no Brasil (Figuras 36 e 37). O primeiro genótipo atípico foi o isolamento TgOvBr 3, o segundo, TgOvBr7 e 8, o terceiro, TgOvBr9, o quarto, TgOvBr10, o quinto, TgOvBr11, e o sexto, TgOvBr13 (Tabelas 47 e 48).

**Tabela 47. Resultados da genotipagem de *T. gondii* isolado de tecidos de ovinos destinados ao abate. Botucatu, 2009.**

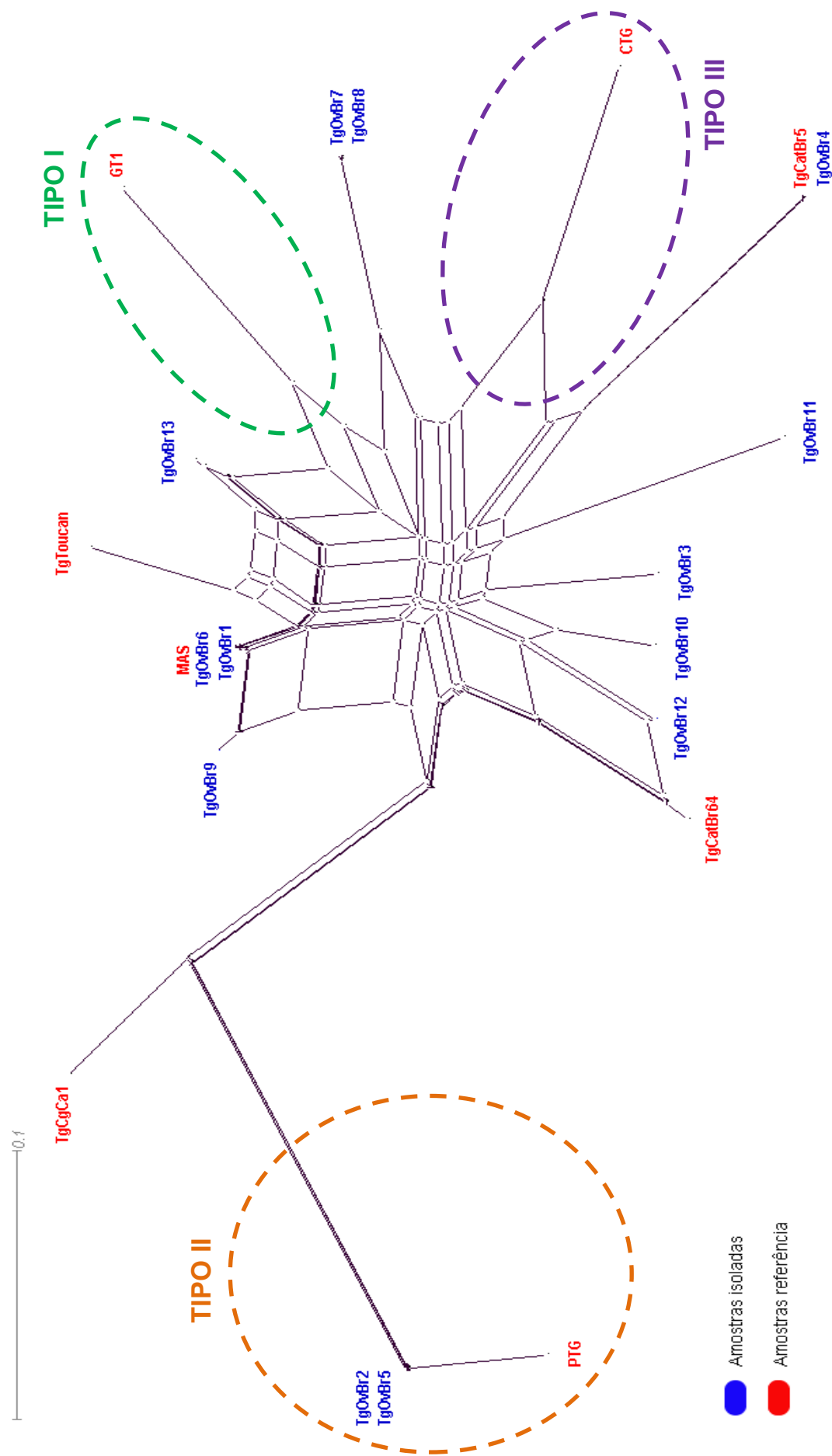
Amostras	Registro	SAG1	5-3'SAG2	alt-SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK7	Apico	CS3	ROP18Del	ROP18UPS	18S rRNA	Sequenciamento
C52po	TgOvBr1	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	-	III	<i>T. gondii</i>	
C76po	TgOvBr2	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	II	II	-	<i>T. gondii</i>	
C185po	TgOvBr3	I	I	II	III	III	III	I	III	I	III	III	I	u-1	-	<i>T. gondii</i>	
C271po	TgOvBr4	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II	u-1	-	<i>T. gondii</i>	
C298po	TgOvBr5	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	II	II	-	<i>T. gondii</i>	
C377po	TgOvBr6	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	-	III	<i>T. gondii</i>	
C496po	TgOvBr7	u-1	I	I	III	III	I	u-1	III	III	I	III	II	-	III	<i>T. gondii</i>	
C510po	TgOvBr8	u-1	I	I	III	III	I	u-1	III	III	I	III	II	-	III	<i>T. gondii</i>	
C82pi	TgOvBr9	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	II	I	II	-	-	<i>T. gondii</i>	
C183pi	TgOvBr10	I	I	u-1	III	III	III	II	I	I	III	I	III	-	-	<i>T. gondii</i>	
M252pi	TgOvBr11	I	I	I	III	-	III	III	I	I	III	u-1	III	-	-	???	
C465po	TgOvBr12	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	I	III	I	III	-	-	<i>T. gondii</i>	
C81pi	TgOvBr13	u-1	I	I	III	I	III	I	I	I	III	I	III	-	-	-	
C79pi	TgOvBr14	-	I/III	-	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C23pi	TgOvBr15	II/III	I/III	-	III	-	-	I	-	-	-	I	-	-	-	<i>T. gondii</i>	
M139pi	TgOvBr16	-	-	-	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P156pi	TgOvBr17	-	-	-	III	-	III	-	-	-	II	I	-	-	-	-	
M251pi	TgOvBr18	-	-	-	II	-	-	-	-	-	u-1	I	-	u-1	-	<i>T. gondii</i>	
C375pi	TgOvBr19	u-1	-	-	II	-	-	I	-	-	-	I	-	-	-	<i>T. gondii</i>	
C376pi	TgOvBr20	II/III	I/II	II	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	???	<i>S. tenella</i>
M471pi	TgOvBr21	-	-	-	III	-	-	-	-	-	-	u-1	-	-	-	???	<i>S. tenella</i>
C180pi	TgOvBr22	-	-	I	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GT1		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	-	<i>T. gondii</i>	
PTG		II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	-	<i>T. gondii</i>	
CTG		II/III	III	III	III	III	III	III*	III	III	III	III	III	-	III	<i>T. gondii</i>	
TgCgCa1		I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II	I	-	<i>T. gondii</i>	
MAS		u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	u-1	u-1	-	<i>T. gondii</i>	
TgCatBr5		I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	I	u-1	-	<i>T. gondii</i>	
TgCatBr64		I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	I	-	III	-	
TgToucan		u-1	I	II	III	I	III	u-2	I	I	III	I	III	-	III	-	

Legenda: u-1 e u-2 são novos alelos que são diferentes dos alelos clonais Tipo I, II e III; C = cérebro; P = pulmão; M = músculo; pi = pré-bioensaio; po = pós-bioensaio; - nenhuma banda detectada; *T. gondii*; *Toxoplasma gondii*; *S. tenella*; *Sarcocystis tenella*.

**Tabela 48.** Perfil genotípico e de virulência das amostras de *T. gondii* isoladas dos tecidos ovinos. Botucatu, 2009.

Isolados	Virulência	Sobrevida (dias)*	Marcadores genéticos													Genótipo	Referências		
			SAG1	5'-3'SAG2	alt-SAG2	SAG3	Btub	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3					
TgOvBr1	Virulenta	21,7	u-1	I	II	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	I	II	MAS	Su et al. (2006)
TgOvBr6	Avirulenta	60,0	u-1	I	II	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	I	II		
TgOvBr2	Avirulenta	60,0	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	II	DEG	Su et al. (2006)
TgOvBr5	Avirulenta	60,0	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	II		
TgOvBr4	Virulenta	11,8	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	I	u-1	I	II	TgCatBr5	Su et al. (2006)
TgOvBr12	Avirulenta	60,0	I	I	u-1	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	I	III	TgCatBr64	Pena et al. (2008)
TgOvBr3	Virulenta	24,0	I	I	II	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	III	I	único	presente estudo
TgOvBr7	Avirulenta	60,0	u-1	I	I	III	III	III	III	III	I	III	III	III	I	III	II	único	presente estudo
TgOvBr8	Avirulenta	60,0	u-1	I	I	III	III	III	III	III	I	III	III	III	I	III	II		
TgOvBr9	Virulenta	25,0	u-1	I	II	III	III	III	III	III	III	III	I	I	II	I	II	único	presente estudo
TgOvBr10	Avirulenta	60,0	I	I	u-1	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	I	III	único	presente estudo
TgOvBr11	Virulenta	12,5	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	u-1	III	único	presente estudo
TgOvBr13	Virulenta	22,5	u-1	I	I	III	III	III	III	III	III	III	I	I	III	I	III	único	presente estudo

Legenda: u-1 é novo alelo que é diferente dos alelos clonais Tipo I, II e III.

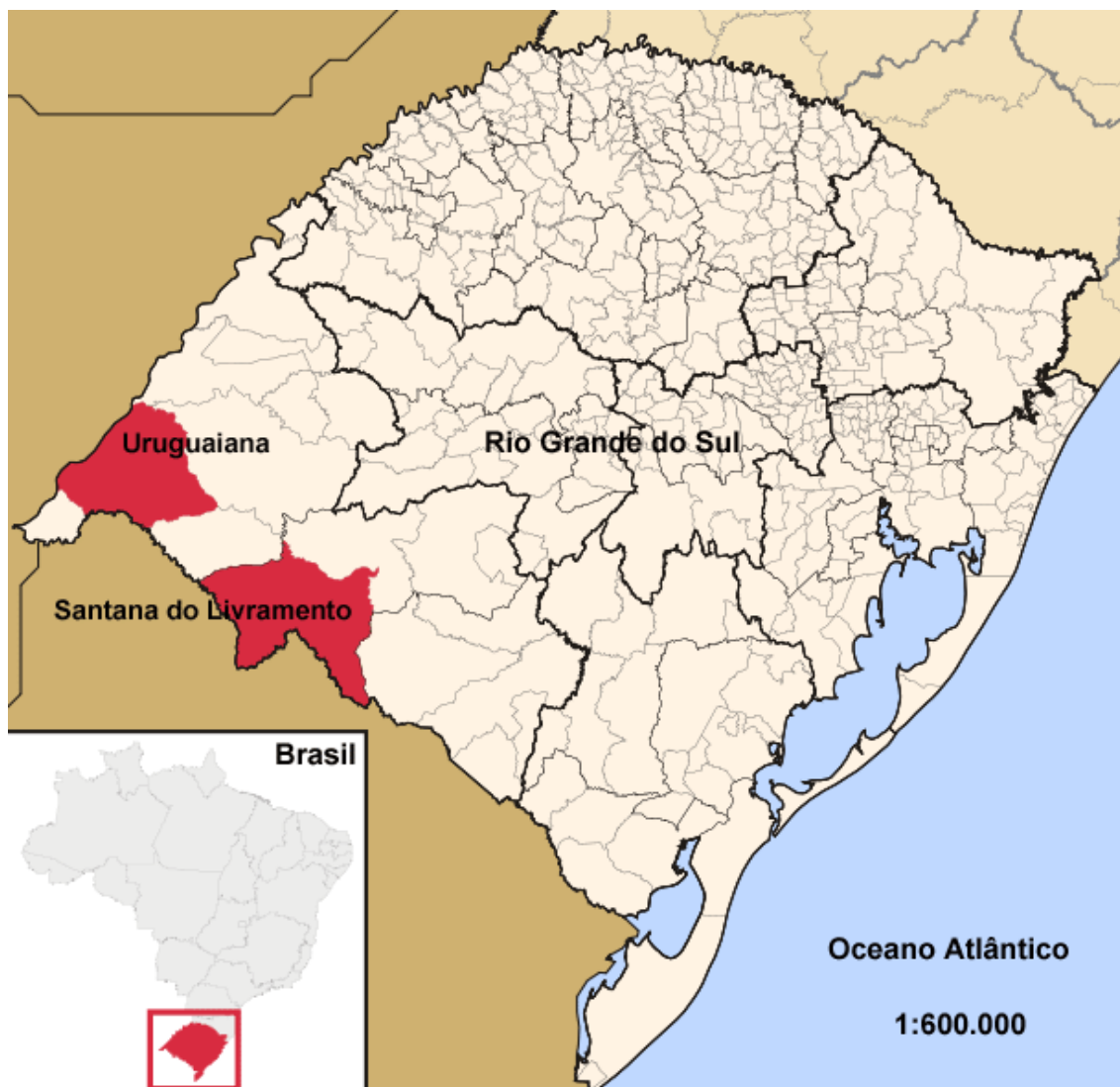


**Figura 36.** Análise filogenética dos isolamentos de *T. gondii* das amostras de tecidos ovinos, com base em 12 marcadores genéticos. Botucatu, 2009.



Das 22 amostras detectadas na PCR convencional, em nove não foi possível a genotipagem completa em função da limitação pela baixa carga parasitária, associada ao menor número de repetições de cada *locus* no genoma, visto que os genes abordados para a genotipagem possuem repetições em número muito menor em relação à região utilizada por Homan et al. (2000), repetido de 200 a 300 vezes no genoma, sendo que alguns deles apresentam apenas uma única repetição. Desta forma, se na PCR convencional o produto amplificado foi fracamente detectado, a genotipagem em *loci* que apresentava menor número de repetições ficou limitada. A adaptação do protocolo original (A) para o protocolo adaptado (B) melhorou a detecção de apenas 10% das amostras (TgOvBr13), não sendo 100% eficiente, como expresso na Tabelas 47 e 48.

Dos isolamentos genotipados (genotipagem completa ou incompleta), oito foram virulentos em camundongos [TgOvBr1 (19 dias p.i.), TgOvBr3 (14 dias p.i.), TgOvBr4 (11,75 dias p.i.), TgOvBr9 (22,5 dias p.i.); TgOvBr11 (12 dias p.i.), TgOvBr13 (22 dias p.i.), TgOvBr18 (14 dias p.i.), TgOvBr19 (18 dias p.i.) e TgOvBr22 (21 dias p.i.)] (Tabela 48). Somente 6/13 (46,15%) amostras apresentaram genotipagem completa, duas delas (TgOvBr4 e TgOvBr11), com período de sobrevida mais curtos que as médias dos demais. Duas amostras avirulentas apresentaram alelos tipo II em 11 *loci*, e tipo I em um único *locus*, Apico, indicando a existência e primeiro registro da linhagem clonal tipo II na América do Sul. Ambos isolamentos de *T. gondii* foram de ovelhas, 2 anos de idade, raça Ideal (Polwarth), criação extensiva em duas diferentes cidades da região Sul brasileira, Santana do Livramento (TgOvBr5) e Uruguaiana (TgOvBr2), RS (Figura 38). Ambas amostras de *T. gondii* foram isoladas de tecidos cerebral e muscular, apresentando uma média de 480 cistos/cérebro de camundongo ao bioensaio.

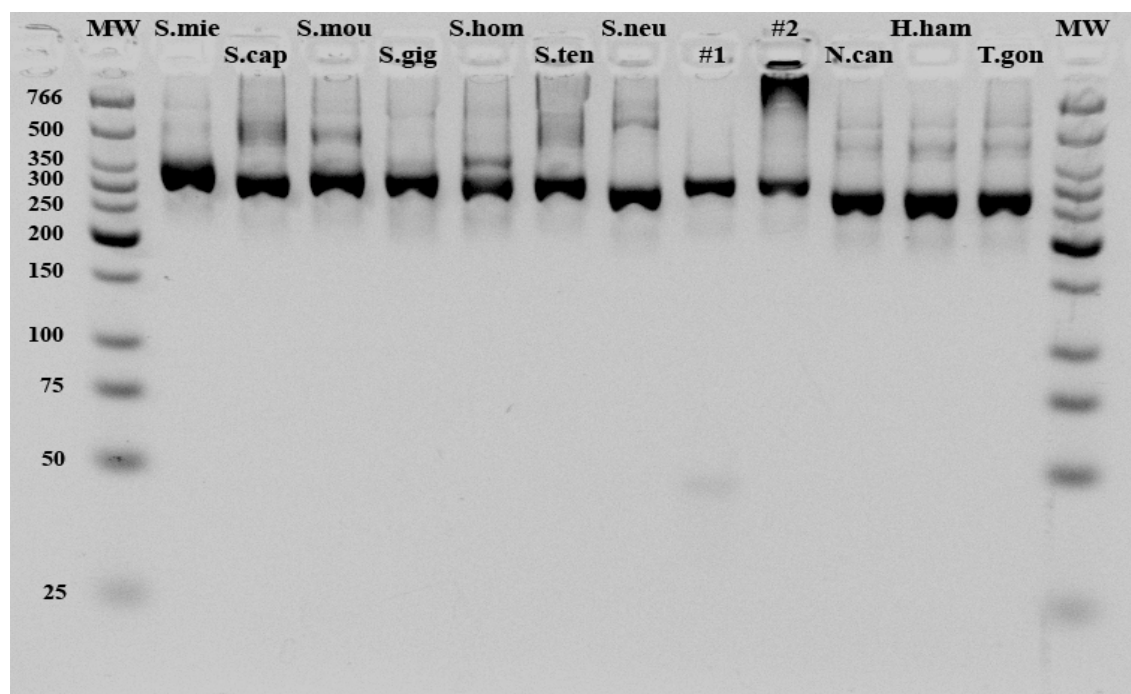


**Figura 38.** Mapa referente a localização dos municípios de Santana do Livramento e Uruguaiana, RS, onde os animais positivos com genótipo tipo II eram criados. Botucatu, 2009.

Fonte: Fonte: Adaptado de Wikimedia Commons (<http://commons.wikimedia.org>)

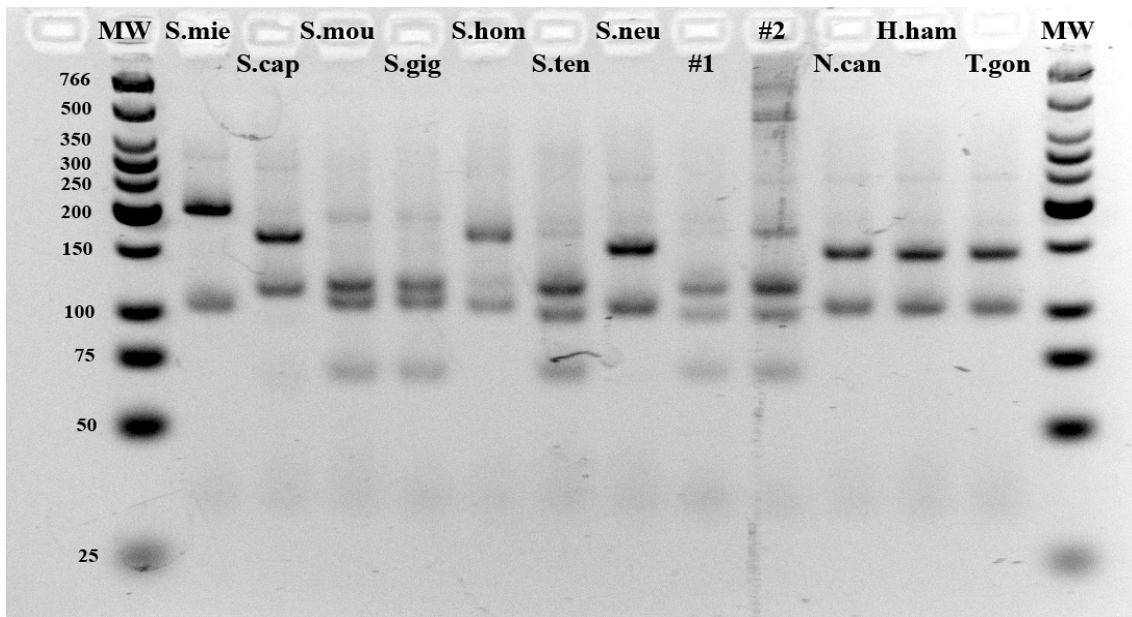
### 5.3.5. Co-infecção *Toxoplasma gondii* X *Sarcocystis tenella*

Dois ovinos, TgOvBr21 (#1), fêmea, dois anos de idade, raça Polwarth (Ideal), criação extensiva em Santana do Livramento, RS, e TgOvBr20 (#2), macho, um ano, raça Corriedale, criação extensiva em Pirajuí, SP, além de apresentarem títulos de anticorpos para *T. gondii* e resultado positivo na PCR 529pb repetitiva 300 vezes, foram negativos ao bioensaio em camundongo (Tabela 47). Na genotipagem nos 12 *loci*, ambos apresentaram resultados positivos somente para alguns marcadores. As duas amostras apresentaram na nested-PCR (aproximadamente 310bp; Figura 39) e RFLP-PCR do gene 18S rRNA um perfil único diferente das amostras referências de *T. gondii*, idêntico a *S. tenella* (Figuras 40 e 41), confirmando a co-infecção a partir do sequenciamento do produto amplificado da nested-PCR do gene 18S rRNA PCR e desafiado à base de dados do GenBank no NCBI, o que resultou em sequência idêntica ao gene 18S rRNA de *S. tenella* (número de acesso do GenBank L24383-1) para ambas as amostras. Este foi também o primeiro registro de *S. tenella* e co-infecção com *T. gondii* no Brasil em ovinos naturalmente infectados.



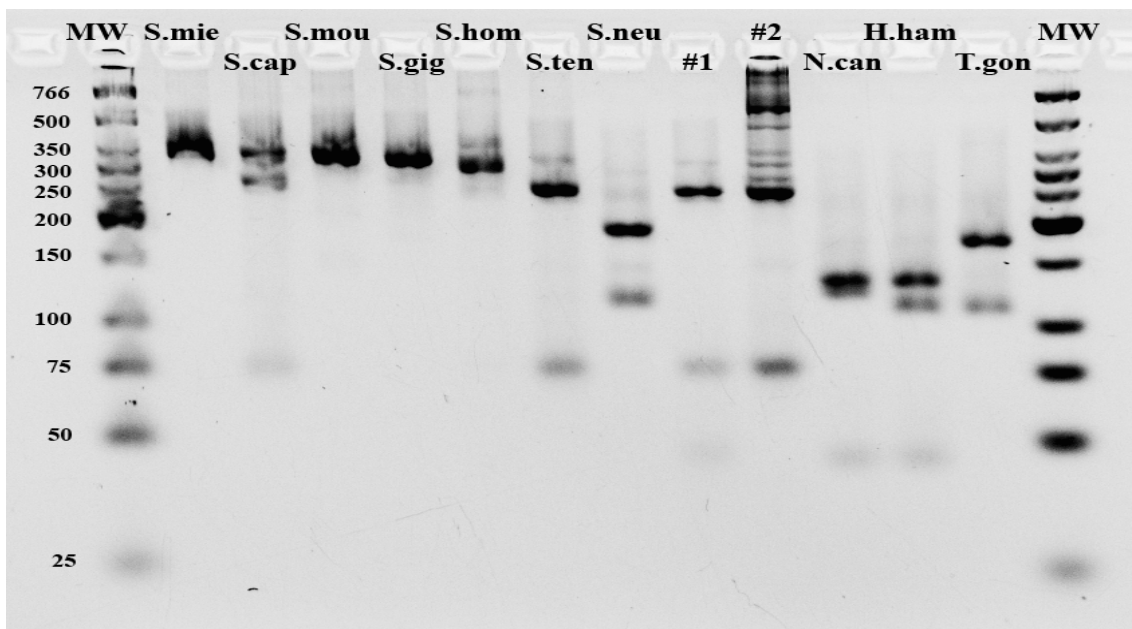
**Figura 39.** Nested-PCR do gene 18S rRNA. Botucatu, 2009.

Legenda: MW: baixo peso molecular (New England Biolabs, USA); S.mie: *Sarcocystis miescheriana*; S.cap: *S. capracanis*; S.mou: *S. moulei*; S.gig: *S. gigantea*; S.hom: *S. hominis*; S.ten: *S. tenella*; S.neu: *S. neurona*; #1: Polwarth sheep; #2: Corriedale sheep; N.can: *Neospora caninum*; H.ham: *Hammondia hammondi*; T.gon: *Toxoplasma gondii*.



**Figura 40.** RFLP-PCR do gene 18S rRNA para cepas referências digeridas pelas enzimas de restrição *AluI* e *HhaI*. Botucatu, 2009.

Legenda: MW: baixo peso molecular (New England Biolabs, USA); S.mie: *Sarcocystis miescheriana*; S.cap: *S. capracanis*; S.mou: *S. moulei*; S.gig: *S. gigantea*; S.hom: *S. hominis*; S.ten: *S. tenella*; S.neu: *S. neurona*; #1: Polwarth sheep; #2: Corriedale sheep; N.can: *Neospora caninum*; H.ham: *Hammondia hammondi*; T.gon: *Toxoplasma gondii*.



**Figura 41.** RFLP-PCR do gene 18S rRNA para cepas referências digeridas pelas enzimas de restrição *DdeI*, *MspI* e *Hpy188III*. Botucatu, 2009.

Legenda: MW: baixo peso molecular (New England Biolabs, USA); S.mie: *Sarcocystis miescheriana*; S.cap: *S. capracanis*; S.mou: *S. moulei*; S.gig: *S. gigantea*; S.hom: *S. hominis*; S.ten: *S. tenella*; S.neu: *S. neurona*; #1: Polwarth sheep; #2: Corriedale sheep; N.can: *Neospora caninum*; H.ham: *Hammondia hammondi*; T.gon: *Toxoplasma gondii*.

## VI. DISCUSSÃO

A toxoplasmose ovina apresenta prevalência mundial variável. Neste trabalho verificou-se soroprevalência de 11,0% em ovinos destinados ao abate, oriundos de dois estados brasileiros, São Paulo e Rio Grande do Sul, considerada baixa quando comparada aos estudos de Dubey et al. (2008a) (104/383; 27,1%) nos Estados Unidos, Masala et al. (2003) (2048/9639; 28,4%) na Itália, Ragozo et al. (2008) (120/495; 24,2%) e Romanelli et al. (2007) (157/305; 51,5%) no estado de São Paulo, Pita Gondim et al. (1999), (18,8%) no estado da Bahia, e Clementino et al. (2007) (30/102; 29,4%) no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, porém maior que a obtida por Da Silva e Langoni (2001) (40/522; 7,7%) em SP, Brasil.

As fêmeas apresentaram 6,8 vezes mais chances de se infectarem ( $P < 0,0001$ ), porém informações sobre o manejo são necessárias para inferir possíveis riscos e consequências aos quais estes animais estão expostos. Além disso, 63/66 (12,7%) ovinos soropositivos eram criados extensivamente.

As criações de rebanhos ovinos comerciais no Brasil são controladas em algumas áreas, porém em outros casos, os animais possuem estreito relacionamento com outros animais, de criação ou errantes, principalmente gatos, permitindo a infecção de ovelhas gestantes e a transmissão vertical para cordeiros (DUCANSON et al., 2001).

Problema sério de saúde pública é referenciado por Aspinall et al. (2002), pois tecidos de animais infectados e não infectados são misturados nos processos de confecção de salsichas, patês, entre outros, aumentando a concentração do parasita e risco de infecção para a população, fato que não ocorreria se houvesse adequado controle sanitário de todo o rebanho, uma vez que na linha de abate, não podem ser identificadas lesões ou o próprio parasito, e com isso, não há a condenação ou tratamento da carcaça.

No estudo realizado por Da Silva e Langoni (2001), os animais foram destinados ao consumo humano, e dependendo do grau de informação da população no tocante a educação sanitária, a população está suscetível à infecção, principalmente gestantes, crianças e pacientes imunocomprometidos.

A MAT é um teste sorológico bastante sensível e específico, baseado em reação direta antígeno-anticorpo, adicionado de 2-mercaptoetanol, que destrói as pontes de dissulfeto presentes na cadeia J de IgM e IgA secretora, limitando assim a ocorrência de reações inespecíficas (WILSON et al., 1990). A MAT utilizada por Thulliez et al. (1986), adaptada por Desmonts e Remington (1980) e, mais tarde, por Montoya et al. (2007), permite a diferenciação entre os estágios da infecção, aconselhando-se a utilização de amostras pareadas. Tal avaliação é baseada na comparação entre os testes MAT-AF e MAT-AM. Segundo Thulliez et al. (1986) a formalina atua sobre os marcadores de superfície (epítomos) da membrana citoplasmática do parasito, permitindo que os epítomos de fase aguda e fase crônica sejam expressos. Por outro lado, a acetona ou o metanol utilizado na MAT-AM atuam da mesma forma que a formalina, porém permitindo a expressão somente dos epítomos de fase aguda. Deste modo, a diferença entre os títulos de anticorpos entre os testes permite caracterizar o estágio da infecção.

Segundo Montoya et al. (2007), tanto os testes como o protocolo referente à determinação do estágio, permitem o acompanhamento sorológico, muitas vezes com a evolução clínica, o que permite ao clínico intervir no início da doença, e até mesmo na transmissão vertical. Mesmo se tratando de um protocolo utilizado em humanos, Montoya et al. (2007) relataram a utilização para outras espécies, adequando às prevalências para estas e região.

Observou-se concordância quase perfeita entre MAT-AF e RIFI-IgG ( $\kappa = 0,9468$ ), com sensibilidade da MAT-AF de 98,4% e especificidade de 99,1%, quando se considerou a RIFI-IgG como padrão-ouro. O título de corte (cut-off) utilizado foi de 16, porém poderiam ser utilizados títulos menores como 5 ou até mesmo 10, a exemplo dos trabalhos utilizando animais com hábitos telúricos, como galinhas e até mesmo gatos (DUBEY et al., 2002; 2003; 2005b; 2006a;b;c; 2007d;e), o que poderia aumentar o número de bioensaios realizados e chances de isolamentos.

A MAT-AM não se mostrou uma técnica boa para ser utilizada como triagem, apresentando uma correlação positiva regular tanto com MAT-AF ( $r = 0,3714$ ) como com RIFI-IgG ( $r = 0,3686$ ). Assim, a MAT-AM é um teste que deve ser utilizado quando a MAT-AF for positiva para comparação e obtenção

do título sorológico. Além disso, os títulos foram sempre inferiores aos demais testes, variando entre 16 e 64.

Outra opção é a determinação do estágio de infecção pela RIFI, pesquisando-se IgG e IgM. A RIFI-IgG detecta ambos os anticorpos IgG de fase aguda e crônica, assemelhando-se à MAT-AF, porém sem diferenciá-las. Pela comparação da MAT-AM e MAT-AF, as reações sorológicas dependem única e exclusivamente de IgG, com uma resposta mais específica.

No presente estudo, somente 5/66 animais soropositivos (7,6%) foram identificados como estágio indeterminado da infecção. Todos os demais se encontravam no estágio crônico da infecção. Este fato foi confirmado pelo isolamento de cistos teciduais grandes em 12 animais. MAT e ELISA são testes acurados e que se associados ao bioensaio, permitem resultados mais específicos (GARDNER et al., 2009).

A frequência de isolamentos (30,3%) em pelo menos um tecido analisado foi maior que a detectada por Dumètre et al. (2006) (26,6%) na França e Ragozo et al. (2008) (19,5%) no Brasil, porém menor que Da Silva e Langoni (2001) (34/39; 87,2%). As amostras dos tecidos de animais soronegativos analisadas resultaram negativas, confirmando a especificidade e confiabilidade do bioensaio e sorologia. Com 20 isolamentos positivos, obteve-se concordância de 0,17 ( $P < 0,0001$ ) entre o bioensaio e a sorologia, onde somente 30,3% foram positivos para ambas as provas, e 46 (69,7%) foram negativas ao bioensaio. Normalmente quando se trabalha com animais de médio e grande porte, o parasito se encontra disseminado em vários tecidos, mas a amostragem de tecido de um animal de grande porte é diferente de outro de pequeno porte. Conseqüentemente, a amostra de 20g utilizada neste estudo foi obtida de regiões que apresentavam carga parasitária alta. Por outro lado, é possível que os 46 animais negativos no bioensaio e 44 negativos na PCR apresentavam carga parasitária baixa nas amostras teciduais utilizadas ou que o parasito estivesse presente em regiões diferentes dos órgãos utilizados.

O cisto foi a forma parasitária mais isolada, apresentando correlação positiva regular com a MAT-AF ( $r = 0,3357$ ), o que em se tratando de toxoplasmose é esperado, principalmente pela infecção crônica. Em relação aos taquizoítos, correlação positiva regular ( $r = 0,3852$ ) também foi observada

com a MAT-AF. A presença de cistos teciduais está mais relacionada com presença de altos títulos de anticorpos (Figura 10). A detecção do parasito, em qualquer uma de suas formas ocorreu a partir de títulos 256 na MAT-AF, ou seja, títulos elevados, com título máximo de 1024, mesmo dado observado com as provas biomoleculares. Os animais com títulos baixos podem apresentar infecção leve, com baixa carga parasitária, ou até mesmo infecção em seu estágio inicial. A toxoplasmose apresenta resposta intensa por longos períodos, porém como a partir do momento em que a resposta imune específica se estabelece, a formação de cistos inicia-se e, com isso, a sua multiplicação é mais lenta, porém constante (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2009). Deste modo, não se verificou diferença significativa entre os resultados dos bioensaios e os estágios da infecção, pois todos os animais com bioensaio positivo se encontraram no estágio crônico da infecção.

*T. gondii* tem a habilidade de atravessar ativamente barreiras biológicas como epitélios intestinais e placentários sob a forma taquizoítica pela transmigração paracelular. Pode ainda invadir células sanguíneas nucleadas circulantes, como macrófagos e células dendríticas, e nestas conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, atingindo o cérebro e formando cistos teciduais (SUZUKI, 2002; CARRUTHERS e SUZUKI, 2007).

O cérebro e o músculo são os tecidos mais importantes no parasitismo por *T. gondii*. A localização predominante dos cistos no cérebro e músculos poderia refletir a longevidade dos neurônios e células musculares ou a eficiência da resposta imunológica nestes tecidos que asseguraria a persistência da infecção latente. Estas células proporcionariam um ambiente apropriado que permite o desenvolvimento do cisto tecidual (FERREIRA-DA-SILVA et al., 2008).

Os bioensaios de cérebro e músculo não diferiram significativamente, apesar de 13 casos serem positivos somente para o cérebro e em três somente para músculo. No bioensaio de dois ovinos, identificou-se taquizoítos no líquido peritoneal e cistos cerebrais, com aproximadamente 100 cistos cerebrais em cada situação. Em um bioensaio (TgOvBr3), de animal criado semi-intensivamente em Ourinhos, SP, o período de sobrevivência foi de 24 dias p.i. (100 cistos) e 14 dias p.i. (taquizoítos) com utilização de material cerebral, indicando que mesmo na fase aguda da doença, onde os taquizoítos

são as formas parasitárias importantes, os cistos já estavam em formação. A formação cística precoce pode ser induzida por fatores imunológicos. A presença das duas formas infectantes é indicativa de transição da fase aguda para a fase crônica, pois foram observados poucos e pequenos cistos no cérebro, e raríssimos taquizoítos no líquido peritoneal. No bioensaio do outro ovino (TgOvBr11), criado extensivamente em Santana do Livramento, RS, apresentou média de 12,5 dias p.i. (100, 60 e 100 cistos) e 11 dias p.i. (taquizoítos) pela inoculação com material cerebral; 16 dias p.i. (80 cistos) com músculo; e 24 dias p.i. (120 cistos) com pulmão. O tempo de conversão de estágio do agente de TgOvBr11 foi curto quando comparado ao obtido por Dubey (1997) que detectaram o parasita em vários tecidos de camundongos entre 15 e 49 dias p.i. Naturalmente, os oocistos de *T. gondii* são considerados mais virulentos que os taquizoítos e bradizoítos em hospedeiros não felídeos, porém o estado imunitário e a carga parasitária infectante devem ser sempre considerados (DUBEY e BEATTIE, 1988; DUBEY et al., 1998).

Somente dois dos 20 isolamentos obtidos (10,00%) foram obtidos de animais machos (B303 e B465), sendo que no primeiro caso não foram identificados taquizoítos e/ou cistos teciduais, somente a sorologia foi positiva ao final do experimento, enquanto no segundo foram identificados cistos teciduais no cérebro.

A sobrevida dos camundongos inoculados com cérebro e com músculo se relacionou com a elevação dos títulos na MAT-AF. Assim, tanto o cérebro como o músculo tinham parasitos que interferiram na sobrevida devido à presença de anticorpos. Desta forma, cuidados no manejo zoonosológico na criação e comercialização dos ovinos devem ser observados, principalmente em animais destinados ao abate e também aqueles comercializados clandestinamente em determinadas regiões do país, pois há o hábito de ingestão de cérebro e carne crua ou mal cozida de ovino, e a detecção de animais soronegativos não exclui a presença do agente no organismo animal.

Dubey (1997) verificou a invasão em pulmão, cérebro e outros tecidos 4 dias p.i., e a formação de cistos a partir do dia 6 p.i. Ferreira-da-Silva et al. (2009) observaram taquizoítos invadindo células de músculo esquelético 4 horas p.i., iniciando a multiplicação 24 horas p.i., e diferenciação em

bradizoítos em até 6 dias p.i. sem a necessidade de fatores estressantes exógenos, que forçariam a conversão para a sobrevivência do parasito.

Dado interessante observou-se com TgOvBr11, cujo bioensaio revelou 75% dos camundongos com cistos teciduais, e 75% com taquizoítos. Assim, 50% dos camundongos apresentaram ambas as formas parasitárias, bradizoítos e taquizoítos, com 12 dias p.i. Estes achados reforçam a importância do parasito para a saúde pública, pois o agente foi detectado sob ambas as formas parasitárias após o desenvolvimento de sinais clínicos e morte dos animais. Assim sendo, a formação de cistos deve ser iniciada poucos dias antes, sugerindo-se 3 a 6 dias p.i., corroborando com os dados obtidos por Dubey e Frenkel (1976), Dubey (1997) e Ferreira-da-Silva et al. (2009).

Assim, a cronificação da infecção pode ocorrer até 12 dias p.i., dependendo da via de infecção, carga parasitária e cepa, além da resposta imunológica do hospedeiro (FRENKEL, 1999). Amostras de *T. gondii* do Brasil e de alguns países da América do Sul apresentam perfis de virulência diferentes dos obtidos nos demais países do mundo, resultando em diferentes manifestações clínicas nas várias espécies animais com a formação ou não de cistos teciduais.

O exame sorológico de camundongos do bioensaio é forte indicativo para a presença ou ausência de cistos cerebrais no isolamento em animais hígidos ao final do período de observação. Entretanto nem todos os animais soropositivos apresentaram formas parasitárias, mostrando correlação não significativa ( $P > 0,05$ ).

As técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para detectar infecção toxoplásmica por serem sensíveis, altamente específicas e rápidas (YAI et al., 2003). A sensibilidade da PCR 529pb repetitiva 300 vezes e do bioensaio, independente do tecido utilizado, foi diretamente proporcional a carga parasitária tecidual, permitindo a detecção de até um parasito (Figuras 17 e 18) e, com isso, permitiu detectar 2/5 animais positivos no estágio indeterminado, fato não possível no bioensaio, somente na PCR de cérebro. A positividade da PCR em 33,3% das amostras foi menor que a observada por Aspinall et al. (2002) (38,0%) em amostras de carne nos Estados Unidos, por Dubey et al. (2008a) (77,9%), e por Da Silva e Langoni (2001) (38,5%) em

amostras de cérebro e diafragma, porém maior que a obtida por Masala et al. (2003) (11,1%) e Masala et al. (2007) (14,4%) a partir de material de abortamentos.

Diferença significativa foi observada na PCR de músculo e cérebro, com 8,36 vezes mais chances de detecção de DNA no cérebro do que no músculo. Enquanto isso, PCR de pulmão foi positiva somente em duas amostras que foram negativas para o cérebro. Assim, tanto o bioensaio como a PCR de cérebro foram mais sensíveis, em relação ao músculo (coração e diafragma) e pulmão. O mesmo foi verificado por Freyre et al. (2001) em ratos, e Hughes et al. (2006) em ovinos, que detectaram *T. gondii* em todos os cérebros e maioria dos corações de cordeiros. Da Silva e Langoni (2001) detectaram maior positividade no diafragma, enquanto Masala et al. (2003) obtiveram em placenta (31,5%), seguido por músculo (15,3%) e cérebro (12,5%), e Masala et al. (2007) detectaram o DNA em 18,1% amostras de feto, comparado ao músculo (12,4%) e cérebro (12,0%).

Ao se analisar todas as PCRs de cada tecido, a PCR diretamente do material ovino se mostrou mais sensível em relação a PCR do material proveniente dos animais inoculados, ou seja, do bioensaio. Este fato é interessante, pois se as amostras obtidas para o bioensaio apresentarem baixa carga parasitária e não forem suficientes para sensibilizar os camundongos, e se estes produzirem resposta imune humoral, a resposta celular poderá inativar os poucos parasitos que ingressem no organismo, evitando com que a infecção crônica se instale. Entretanto, o DNA estará presente e, dependendo da sensibilidade da PCR utilizada (oligonucleotídeos e região direcionada), este poderá ser detectado.

A concordância entre a PCR dos tecidos ovinos (0,18), independente do tecido analisado, e o resultado sorológico foi maior que o bioensaio e a PCR do bioensaio, com sensibilidade de 31,8%. Este dado corrobora com diversos autores na preferência da PCR em relação ao bioensaio, porém falha em discriminar a viabilidade dos parasitos presentes nos tecidos (ASPINALL et al., 2002; 2003). Deste modo, a associação entre os testes é fundamental também para se estudar a manutenção do parasito.

As PCRs positivas das amostras ovinas e dos bioensaios se concentraram entre os títulos sorológicos de 256 e 4096, com exceção para

pulmão (1024 e 4096) e músculo (1024 e 4096), mostrando que quanto maior o título, maiores as chances de resultado positivo. Tal fato pode ser melhor compreendido ao se analisar a correlação entre MAT-AF e PCR do bioensaio de cérebro ( $r = 0,3966$ ), comparada à correlação entre PCR do bioensaio com material pulmonar ( $r = 0,2973$ ), confirmando que o cérebro é o órgão de eleição para o estudo de *T. gondii*, pois à medida que os títulos sorológicos se elevam, aumentam as chances de se encontrar o agente neste tecido pela PCR.

Dos animais positivos à PCR, dois (TgOvBr20 e TgOvBr21) apresentaram co-infecção por *S. tenella* e *T. gondii*, identificada pelo sequenciamento do produto da nested-PCR do gene 18S rRNA (Tabela 47; Figuras 40 e 41). No Brasil não há registro de infecção natural em ovinos até o momento, somente de infecções experimentais (PACHECO et al., 1995; BOTELHO e PACHECO, 1996), ou infecções naturais causadas por outras espécies de *Sarcocystis*. O animal B252 (TgOvBr11) também apresentou banda diferente na nested-PCR do gene 18S rRNA, porém foi negativo à RFLP-PCR e no sequenciamento não se concluiu o diagnóstico do patógeno.

Quatro espécies são consideradas importantes para os ovinos, *S. gigantea*, *S. arieticanis*, *S. medusiformis* e *S. tenella*, sendo a última a mais patogênica para os ovinos, que podem se infectar pela ingestão de água ou alimentos contaminados por esporocistos. Geralmente os sinais clínicos são discretos incluindo anorexia, febre, diminuição de ganho de peso, anemia, sinais neurológicos e abortamentos (PESCADOR et al. 2007). Morte aguda pode ocorrer sem a presença de outros sinais clínicos (BUXTON, 1998). Acomete principalmente coração, diafragma e músculos esqueléticos (BUXTON, 1998; DARYANI et al., 2006). A prevalência é variável mundialmente. A sua alta prevalência está associada ao livre acesso de cães, hospedeiro definitivo, aos rebanhos nas fazendas (ADRIANA et al., 2008) ou artrópodes atuando como vetores mecânicos. A infecção por *S. tenella* não é uma zoonose.

A especificidade analítica e diagnóstica do gene 18S rRNA foi previamente confirmada por Jeffries et al. (1997) e Yang et al. (2001), que a consideraram método poderoso para a diferenciação espécie-específica de quatro espécies de *Sarcocystis* de ovinos (*S. tenella*, *S. capracanis*, *S. arieticanis* e *S. gigantea*), *N. caninum* e *T. gondii*.

O sequenciamento do gene 18S rRNA não mostrou perfil de *T. gondii*, provavelmente pela baixa carga parasitária nas amostras analisadas. O novo protocolo de enzimas utilizado em duas RFLP-PCR permitiu um novo método de triagem para infecções em animais de produção e em rebanhos com problemas por *N. caninum*, *T. gondii* e *Sarcocystis* spp. O gene 18S rRNA apresenta aproximadamente 200 cópias repetitivas no genoma, inseridas em regiões próximas, porém diferentes entre alguns parasitos, como observado na nested-PCR (Figura 39).

Uma preocupação inicial foi a possibilidade de reação cruzada nas sorologias e PCR de 529pb repetitiva 300 vezes, mas Moon et al. (1987) descartaram a possibilidade de reação cruzada entre *Sarcocystis* spp. e *T. gondii* pela RIFI-IgG. Analisando-se a PCR descrita por Homan et al. (2000), confirmou-se também a ausência de reação cruzada entre *T. gondii*, *Echinococcus granulosus*, *Giardia duodenalis*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis* spp., *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis* e *N. caninum*.

Atualmente, muitos trabalhos estão sendo realizados com 11 a 12 marcadores, porém, ainda há estudos com protocolos diferentes de genotipagem. Deste modo, a padronização de um único protocolo de genotipagem seria fundamental para a padronização dos métodos de análises de genótipos de *T. gondii* em todo o mundo. Desta forma, haveria dificuldade nas comparações entre estudos mais atuais e estudos anteriores que utilizavam somente o marcador SAG2 ou até mesmo quatro a cinco marcadores necessitando-se avaliar o perfil genotípico destes para se determinar o comportamento do genoma do parasito isolado.

Foram obtidos 13/22 (59,1%) genótipos completos de *T. gondii* pela genotipagem, apresentando 10 genótipos diferentes com seis genótipos novos, caracterizando alta variabilidade genotípica (Figuras 36 e 37), comparada às de referência e aos genótipos já isolados no Brasil. Em contraste, Ajzenberg et al. (2004) mencionaram que a variabilidade genotípica é baixa, com chances menores de 1% de se encontrar um genótipo novo (AJIOKA et al., 2001). Estes dados são subestimados devido aos dados compreenderem somente isolados da Europa e América do Norte. Por outro lado, outros grupos observaram alta diversidade genética do parasita na América do Sul, comparando-se aos genótipos I, II e III inicialmente isolados de amostras na Europa e América do

Norte (SU et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2007; DUBEY et al., 2007b; PENA et al., 2008).

A alta diversidade nas populações da América do Sul, mas muito menores em outras regiões do mundo, além de sua disseminação para os países da Europa e Ásia deve-se principalmente à migração, e comercialização atual (DUBEY et al., 2007a). Regiões geográficas e diferentes hospedeiros contribuem para variações genóticas (GRIGG et al., 2001; LEHMANN et al., 2006; DUBEY e SU, 2009). Deste modo, novos estudos são necessários, pois a cada novo estudo que se realiza, novos perfis genóticos são encontrados.

Nos países asiáticos têm-se uma diversidade genética limitada em contraste com a América do Sul (DUBEY et al., 2005a; CAVALCANTE et al., 2007; DUBEY et al., 2007b,c), pois em análise baseada em 11 marcadores genéticos, identificou-se apenas dois genótipos em oito amostras provenientes de 21 cães soropositivos no Vietnã (DUBEY et al., 2007a), sendo os mesmos genótipos encontrados na China (DUBEY et al., 2007c), e ambos tinham sua origem na Colômbia, América do Sul (DUBEY et al., 2007b). Alguns grupos de pesquisadores apresentam duas teorias de evolução para a enfermidade. Uma seria que a toxoplasmose se originou no hemisfério norte, e migrou para o hemisfério sul com a caça, e a outra que o Brasil é o país de origem do parasito, principalmente pela sua alta diversidade genética, pois em cada novo estudo, independentemente da espécie animal, são identificados novos genótipos atípicos, enfatizando-se a diferença nos perfis de infecção intercontinentais (KHAN et al., 2005; LEHMANN et al., 2006).

Neste estudo, duas amostras avirulentas apresentaram alelos tipo II em todos os marcadores, indicando a existência da linhagem clonal tipo II no Brasil. Ambos isolamentos de *T. gondii* foram de ovelhas, 2 anos de idade, raça Ideal (Polwarth), criação extensiva em duas diferentes cidades da região Sul brasileira, Santana do Livramento (TgOvBr5) e Uruguaiana (TgOvBr2), RS. Ambas amostras de *T. gondii* foram isoladas de tecidos cerebral e muscular, apresentando uma média de 480 cistos/cérebro de camundongo ao bioensaio.

Tal fato se torna importante registro científico, pois, até o momento, não havia na América do Sul registro de isolamento de amostra com alelos tipo II (FERREIRA et al., 2008), comum na Europa, Ásia e América do Norte, de ovinos e em 12 *loci* (DUBEY et al., 2006a;b;c; 2007a;b;c;d;e; 2008a,b; SIBLEY

e AJIOKA, 2008; PENA et al., 2008; VERMURUGAN et al., 2008; AL-QASSAB e tal., 2009; RICHOMME et al., 2009).

Como observado na Figura 38, os municípios de Santana do Livramento e Uruguai, RS, são duas regiões que fazem fronteira com Uruguai e Argentina. Além disso, as raças que apresentam o genótipo tipo II tiveram sua origem histórica na Austrália e Nova Zelândia, regiões onde a ocorrência de tipo II é alta (AL-QASSAB et al., 2009). Algumas hipóteses são levantadas, baseadas nos dados apresentados como: 1) importação de animais pelo Brasil e/ou outros países da América do Sul de ovinos provenientes de países da Europa, Ásia e/ou Europa, infectados com tipo II; 2) importação de produtos cárneos, oferecimento de carne crua ou mal cozida a felídeos, e contaminação ambiental pelas fezes de felídeos com o tipo II na região estudada e/ou países limítrofes, onde os ovinos teriam acesso, com consequente importação dos ovinos infectados; 3) importação de hortifrutigranjeiros, rações e volumosos contaminados com oocistos de *T. gondii*.

Nos humanos, *T. gondii* está associado não somente a ocorrência de doença ocular, congênita ou em pacientes imunossuprimidos, assim como em distúrbios neurológicos como esquizofrenia e epilepsia, além de alterações comportamentais (SUZUKI, 2002; CARRUTHERS e SUZUKI, 2007). Como o genótipo II está bastante envolvido com a infecção humana, muito se tem a descobrir sobre a interface infecção:doença, assim como a interação parasito:hospedeiro, envolvendo os humanos, principalmente pelos hábitos alimentares como a ingestão de carne crua ou mal cozida de animais infectados (TENTER, 2009).

A encefalite toxoplásmica é a doença infecciosa oportunista mais comum do sistema nervoso central em pacientes com Aids. Pelo menos 30% dos pacientes com Aids que têm anticorpos prévios contra *T. gondii* desenvolvem encefalite. Sabe-se que o tipo II de *T. gondii* está mais associado a pacientes com Aids no mundo, porém até o presente momento não havia sido detectado na América do Sul. Vários trabalhos realizados no Brasil e em outros países da América do Sul detectaram os genótipos tipo I, III e outros atípicos, muitos deles virulentos (DUBEY et al., 2008b; FERREIRA et al., 2008).

Prestrud et al. (2008) detectaram o tipo II em 83,6% amostras de raposas do ártico, enquanto Al-Qassab et al. (2009) detectaram o mesmo tipo em um cão na Austrália, Richomme et al. (2009) em 21 isolamentos de javalis na França e Montoya et al. (2008) em 74% de gatos na Espanha.

Mesmo sabendo que no mundo o tipo II é fortemente relacionado com Aids, novas pesquisas são necessárias principalmente no Brasil (KHAN et al., 2005; FERREIRA et al., 2008). Estes dados trazem nova perspectiva da evolução do parasito, visto que suas alterações evolutivas podem alterar o seu fenótipo, incluindo a adaptação a novos hospedeiros e manifestações clínicas.

Dubey et al. (2006c) isolaram *T. gondii* de um gato na Colômbia, apresentando tipo II, porém em somente cinco *loci*, assim como Dubey et al. (2006a) em 17 isolados de frangos comerciais no Chile, e Khan et al. (2005) em pacientes com Aids. Porém Khan et al. (2005) e Ferreira et al. (2008) identificaram maior ocorrência de infecção pelo *T. gondii* tipo I em pacientes com Aids. Ferreira et al. (2008), no Estado de São Paulo, observaram 40/87 (46,0%) pacientes infectados pelo tipo I e 4/87 (4,6%) pelo tipo III. 6/87 (6,9%) pacientes apresentaram alelo tipo II, porém não foram confirmados pelo sequenciamento do produto da nested-PCR do marcador SAG3. Como a análise foi realizada em somente cinco marcadores, os próprios autores concluem pela não ocorrência do tipo II. Já Dubey et al. (2008b) registraram um isolamento tipo II a partir de frangos no estado do Rio Grande do Norte, porém em 10 *loci* e alelo tipo III no *locus* Btub.

As amostras TgOvBr2 e TgOvBr5 foram semelhantes à cepa referência PTG, com variação de somente em um marcador, Apico, amplamente variável entre os apicomplexas, que apresentou alelo tipo I. Como característico entre os isolados tipo II (PENA et al., 2008; DUBEY e SU et al., 2009; KHAN et al. 2009) as amostras foram avirulentas, porém contrário ao observado por Pena et al. (2008) quanto a virulência no *locus* CS3, apresentando alelo tipo II (Tabela 48).

Fato semelhante pode ser observado nas amostras TgOvBr7 e TgOvBr8, em relação à amostra de referência GT1, consideradas virulentas para camundongos. Ao se comparar aos 44 genótipos obtidos no Brasil, confirmam-se os dois primeiros isolamentos tipo II no Brasil, em dois municípios sulistas. Observa-se também que as amostras TgOvBr7 e TgOvBr8

apresentam relação filogenética próxima às amostras de galinhas (TgCkBr156, do Rio Grande do Sul), gatos (TgCatBr83, de São Paulo) e cães (TgDgBr2, de São Paulo) identificados anteriormente (PENA et al., 2008), com diferenças em alguns marcadores (Tabela 48). TgOvBr7 e 8 foram avirulentas e apresentam alelo tipo II no *locus* CS3.

TgOvBr12 foi avirulento e apresentou perfil idêntico à referência TgCatBr64. Mesmo com perfis genotípicos idênticos, diferença foi observada no *locus* CS3. TgOvBr12 apresentou alelo tipo III considerado avirulento, enquanto na cepa referência foi identificado o alelo tipo I, virulento.

Baseados na virulência, Pena et al. (2008) agruparam os isolamentos brasileiros, e genotipados, em quatro grupos. Tipo BrI (virulentas), Tipo BrII (virulência intermediária), Tipo BrIII (avirulentas) e Tipo BrIV (virulência intermediária).

TgOvBr3 foi virulento e não apresentou perfil genotípico idêntico a nenhuma das referências ou isolamento no Brasil, porém semelhança com TgCatBr1, isolada de gato no Paraná, com diferença apenas no *locus* PK1, apresentando alelo tipo III. TgCatBr1 foi classificada por Pena et al. (2008) como Tipo BrII, considerada como fenótipo de virulência intermediária pois a virulência varia de 0 a 100%. Enquanto isso, TgOvBr11 não se apresentou semelhante a nenhum dos isolados brasileiros ou amostras de referência porém foi virulento, apresentando o segundo período de sobrevivência dos camundongos mais curto com 12,5 dias p.i. TgOvBr4 foi o mais curto com 11,8 dias p.i., idênticos a TgCatBr5, TgCatBr11 e TgCatBr16, isolados de gatos do Paraná, e TgCatBr84, de São Paulo.

TgOvBr4 possui o mesmo perfil genotípico de TgCatBr5, descrito por Pena et al. (2008), semelhante ao tipo III, de virulência variável. TgOvBr1 e TgOvBr6 apresentaram genótipo idêntico a referência MAS e outros isolados de frangos do Rio Grande do Sul, e foram classificados como Tipo BrIV. Ambos isolados apresentaram produção de cistos cerebrais no bioensaio. Enquanto TgOvBr1 foi virulenta, matando os animais com 21,7 dias p.i., TgOvBr6 foi avirulenta. Estes resultados corroboram com os obtidos por Pena et al. (2008) que observaram que a virulência em isolados do Tipo BrIV é variável, com fenótipo intermediário. Dado interessante é observado em relação ao genótipo do isolado TgOvBr9. Este isolado apresentou genótipo semelhante aos do Tipo

BrIV em 91,7% *loci*, diferente apenas no marcador PK1 com o alelo tipo II. A virulência apresentada por TgOvBr1 e TgOvBr9 foi semelhante com período de sobrevivência de 21,7 e 25 dias p.i., respectivamente. A presença de alelo tipo II neste marcador, pode ter garantido ao TgOvBr9 uma sobrevivência maior, porém este dado merece maiores estudos para poder se obter uma conclusão mais acurada.

TgOvBr10 foi avirulento e semelhante a dois isolados genotipados por Pena et al. (2008), TgCatBr57 e TgCatBr38, próximos aos Tipos BrII e BrIV, respectivamente. Ambos os isolamentos diferiram dos isolados de gatos em apenas um *locus* cada, alt-SAG2 e SAG1, respectivamente.

TgOvBr13 foi o único genótipo obtido que não produziu cistos, mas foi detectado taquizoítos no líquido peritoneal dos camundongos, que apresentaram período de sobrevivência de 22,5 dias p.i. Devido a baixa carga parasitária foi necessária a realização do protocolo B de genotipagem para a genotipagem completa da amostra a partir do cérebro e líquido peritoneal dos camundongos.

O *locus* CS3 foi introduzido no estudo de Pena et al. (2008) para verificar o genótipo e a virulência dos isolados em camundongos. Segundo os autores, camundongos infectados com *T. gondii* cujos isolados apresentem alelos I ou II no *locus* CS3 são virulentos para camundongos, o que revelou no referido estudo 84 e 82% de mortalidade dos camundongos, respectivamente. Por outro lado, no presente estudo 100 e 37,5% dos isolamentos com alelo I ou II foram virulentos, sendo que quatro isolamentos que apresentaram alelo I ou II foram virulentos (TgOvBr1, TgOvBr3, TgOvBr4 e TgOvBr9), enquanto cinco foram avirulentos (TgOvBr2, TgOvBr5, TgOvBr6, TgOvBr7 e TgOvBr8). Enquanto isso, dois isolamentos com alelo III foram virulentos (TgOvBr11 e TgOvBr13). Yai et al. (2009) obtiveram 91,1 e 85,5% isolamentos com alelos I ou II, respectivamente.

Do mesmo modo, o marcador ROP18 não demonstrou ser um bom indicador de virulência, pois nenhuma das amostras virulentas apresentou alelo tipo I (KHAN et al., 2009).

Novos estudos devem ser realizados quanto a carga parasitária, pois a análise da virulência está intimamente associada a carga parasitária e forma infectante do parasito no processo de isolamento. Como neste estudo poucos

isolamentos foram obtidos, e no caso do alelo I, somente um isolamento apresentou este alelo no *locus* estudado, novos estudos devem ser realizados com mais isolamentos com o mesmo genótipo (PENA et al., 2008).

Os genótipos recombinantes ou genótipos com alelos atípicos representam somente 5 a 10% na maioria dos isolamentos (HOWE e SIBLEY, 1995), e são mais frequentes nas amostras provenientes de espécies hospedeiras exóticas, de áreas remotas geograficamente ou de pacientes com apresentação clínica diferenciada. Além disso, as cepas recombinantes e atípicas são resultados de pressões seletivas sobre a cepa ancestral (tipo III) mais antiga, com forte influência sobre a virulência (KHAN et al., 2009). As recombinações podem ocorrer mesmo sem a presença de hospedeiros definitivos quando o hospedeiro intermediário (humanos) ingere formas parasitárias de outro hospedeiro intermediário (carne ovina ou suína) (FERREIRA et al., 2008). A tipificação genética baseada em um ou dois *loci* é limitada para a detecção de cepas recombinantes e atípicas, caracterizadas por alelos incomuns em outros *loci*. Assim sendo, estudos baseados na genotipagem somente do *locus* SAG2 devem ser reconsiderados (DARDÉ, 2004; SU et al., 2006).

É possível que a frequência de mais de um tipo do parasito se deva à origem dos produtos cárneos, já que todas as amostras derivaram da carne de diferentes espécies animais (ASPINALL et al., 2002; 2003). Aspinall et al. (2002), averiguando a contaminação por *T. gondii* em produtos cárneos pela RFLP-PCR e sequenciamento de DNA em 57 amostras de carne suína, nove ovina e quatro bovina provenientes do Reino Unido, encontraram 21 contaminadas com o genótipo I (16 de carne suína, quatro ovina e uma bovina) e seis contendo concomitantemente os genótipos I e II (três de carne suína, duas ovina e uma bovina), enquanto Ajzenberg et al. (2002) e Pena et al. (2008) relataram um único caso de infecção mista em ovinos. Já Aspinall et al. (2003) encontraram, pela primeira vez em humanos, 31,2% de infecção mista (SAG2 tipo I + tipo II) em amostras de pacientes com infecções congênitas, Aids e imunossuprimidos pela RFLP-PCR e sequenciamento. Reinfecções com diferentes tipos de parasitos, ou infecções concomitantemente com mais de um tipo do parasito, a partir da ingestão de oocistos presentes no ambiente ou pela ingestão de cistos teciduais podem ser as causas.

Na África, Europa e Oceania o mesmo ocorre, com alta frequência (PRESTRUD et al., 2008; VELMURUGAN et al., 2008; AL-QASSAB et al., 2009; RICHOMME et al., 2009), porém o tipo II ainda é o mais comum, principalmente nos países europeus (MONTTOYA et al., 2008).

A propagação do parasita parece ocorrer primariamente pela reprodução clonal, com recombinação sexual entre as diferentes cepas do parasita somente nas populações naturais por replicação assexuada ou cruzamentos uniparentais (MONDRAGON et al., 1998; SWITAJ et al., 2005). A clonalidade é evidenciada pelos isolamentos de cepas com genótipos idênticos de diferentes hospedeiros de áreas geográficas distintas. Com relação ao fenótipo de virulência para o camundongo e estudos de evolução da virulência das cepas, Khan et al. (2009) pesquisaram os alelos na proteína ROP18 serina/treonina kinase, apresentando três tipos de alelos, e classificaram as diferentes cepas de acordo com o alelo: altamente virulentas (alelo I), quando o parasita é suficiente para matar o camundongo; e de virulência intermediária (alelo II), quando o parasita não é suficiente para matar o camundongo, mas a medicação do animal, com altas doses de sulfonamidas, é necessária para prevenir a morte, e avirulentas (alelo III, mais antiga, com cerca de 10 milhões de anos).

Grigg et al. (2001) avaliaram a geração  $F_1$  de um cruzamento entre tipo II e III, avirulentas em camundongos, para verificar se tal mistura poderia originar uma cepa altamente virulenta, como observado em alguns isolamentos no mundo, e verificaram que as cepas recombinantes foram mais virulentas 3 logs mais que seus ancestrais. Assim, verifica-se que a recombinação sexual, combinação de polimorfismos em duas linhagens clonais competitivas e diferentes, é um mecanismo de evolução natural da virulência deste patógeno. Estas recombinações, na natureza, ocorrem entre e intra amostras domésticas e silvestres (AJZENBERG et al., 2004).

Assim, estudos evolutivos podem mostrar registros de adaptações do parasito à novos hospedeiros com aumento ou diminuição da virulência (GRIGG et al., 2001; SU et al., 2006; VELMURUGAN et al., 2008; PENA et al., 2008; ZHOU et al., 2009). Isto pode ser comprovado pelos registros de Grigg et al. (2001) que sugerem que os genótipos predominantes nos dias de hoje existem como resultado de um surto pandêmico de misturas genéticas de duas

linhagens ancestrais discretas. Os limites até onde a reprodução sexual e a expansão clonal do parasito alteram o perfil do *T. gondii* atual é questão central para se entender a estrutura genética populacional global do parasito (GRIGG et al., 2009). Com esses dados, poder-se-á entender a ocorrência de novos surtos e ainda prever a evolução do parasito.

## VII. CONCLUSÕES

1. MAT-AF e RIFI-IgG apresentaram concordância quase perfeita ( $\kappa = 0,9468$ ), podendo ambas serem utilizadas como triagem para inquéritos sorológicos nesta espécie;
2. Entre os tecidos analisados, o cérebro mostrou-se como tecido de eleição para o estudo da toxoplasmose em ovinos naturalmente infectados;
3. A PCR 529bp repetitiva 300 vezes apresentou boa sensibilidade e excelente especificidade, porém diretamente relacionada a carga parasitária da amostra;
4. A genotipagem revelou alta diversidade genotípica dos isolados;
5. Os marcadores CS3 e ROP18 não foram bons indicadores de virulência;
6. PCR e RFLP-PCR do gene 18S rRNA mostrou ser excelente alternativa para a diferenciação entre *T. gondii* e outros parasitos;
7. Primeiro isolamento do genótipo tipo II clonal de *T. gondii* na América do Sul, caracterizando-se por ser avirulento, bem como a co-infecção de *T. gondii* com *S. tenella*, este último também identificado pela primeira vez em animais naturalmente infectados no Brasil.

## VIII. REFERÊNCIAS<sup>21</sup>

ADRIANA, T.; MIRCEAN, V.; BLAGA, R.; BRATU, C.N.; COZMA, V. Epidemiology and etiology in sheep sarcocystosis. *Bull. UASVM Vet. Med.*, v.65, p.49-54, 2008.

AJIOKA, J.W.; FITZPATRICK, J.M.; REITTER, C.P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Exp. Rev. Mol. Med.*, 2001. Disponível em <<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002204a.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2006.

AJZENBERG, D.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.-L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.1940-1943, 2005.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.L.; SU, C.; DUMÈTRE, A.; DEMAR, M.; CARME, B.; DARDÉ, M.L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, v.34, p.1185-1196, 2004.

AJZENBERG, D.; BAÑULS, A.-L.; TIBAYRENE, M.; DARDÉ, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.27-38, 2002.

AL-QASSAB, S.; REICHEL, M.P.; SU, C.; JENKINS, D.; HALL, C.; WINDSOR, P.A.; DUBEY, J.P.; ELLIS, J. Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Vet. Parasitol.*, v.164, p.335-339, 2009.

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

---

<sup>21</sup>ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.  
BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

ASPINALL, T.V.; MARLEE, D.; HYDE, J.E.; SIMS, P.F.G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought? *Int. J. Parasitol.*, v.32, p.1193-1199, 2002.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.

BONAMETTI, A.M.; PASSOS, J.N.; SILVA, E.M.K.; BORTOLIERO, A.L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, p.21-25, 1997.

BOTELHO, G.G.; PACHECO, R.G. Aspectos bioquímico-séricos na infecção experimental de ovinos com *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1986 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.18, p.26-31, 1996.

BUXTON, D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.*, v.29, p.289-310, 1998.

BUXTON, D. Ovine toxoplasmosis: a review. *J. R. Soc. Med.*, v.83, p.509-511, 1990.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.10, p.143-169, 1974.

CARRUTHERS, V.B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophr. Bull.*, v.33, p.745-751, 2007.

CAVALCANTE, A.C.R.; FERREIRA, A.M.; MELO, M.N.; FUX, B., BRANDÃO, G.P.; VITOR, R.W.A. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Rum. Res.*, v.69, p.79-82, 2007.

CDC. Center for Disease Control. Epi Info. 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>>. Acesso em: 14 ago. 2009.

CLEMENTINO, M.M.; SOUZA, M.F.; ANDRADE NETO, V.F. Seroprevalence and *Toxoplasma gondii*-IgG avidity in sheep from Lajes, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.146, p.199-203, 2007.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Toxoplasmose: In: \_\_\_\_\_ *Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos*. São Paulo: MEDSI, 1992, p.757-766.

DARDÉ, M.-L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. *Parasite*, v.15, p.366-371, 2008.

DARDÉ, M.-L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanità*, v.40, p.57-63, 2004.

DARYANI, A.; ALAEI, R.; DEHGHAN, M.H.; ARAB, R.; SHARIF, M.; ZIAEI, H. Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered sheep and buffaloes in Ardabil, Iran. *J. Anim. Vet. Adv.*, v.5, p.60-62, 2006.

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

DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.*, v.97, p.191-198, 2001.

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

DUBEY, J.P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.104, p.190-195, 2009.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; HILL, D.; VELMURUGAN, G.V.; BANDINI, L.A.; KWOK, O.C.H.; MAJUMDAR, D., SU, C. High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int. J. Parasitol.*, v.38, p.999-1006, 2008a.

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

DUBEY, J.P.; HUONG, L.T.T.; SUNDAR, N.; SU, C. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in dogs from Vietnam suggests their South American origin. *Vet. Parasitol.*, v.146, p.347-351, 2007a.

DUBEY, J.P.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; WIJESUNDERA, R.R.M.K.K.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Sri Lanka and genetic characterization of the parasite isolates. *Vet. Parasitol.*, v.146, p.341-346, 2007b.

DUBEY, J.P.; CORTÉS-VECINO, J.A.; VARGAS-DUARTE, J.J.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G.V.; BANDINI, L.M.; POLO, L.J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L.E.; KWOK, O.C.H.; SMITH, T.; SU, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet. Parasitol.*, v.145, p.45-50, 2007c.

DUBEY, J.P.; ZHU, X.Q.; SUNDAR, N.; ZHANG, H.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Genetic and biologic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates of cats from China. *Vet. Parasitol.*, v.145, p.352-356, 2007d.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.H.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L.; DOS SANTOS, T.R.B.; CAVALCANTE, G.T.; KWOK,

O.C.H.; SU, C. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Vet. Parasitol.*, v.143, p.182-188, 2007e.

DUBEY, J.P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cat) hosts. *Vet. Parasitol.*, v.140, p.69-75, 2006.

DUBEY, J.P.; PATITUCCI, A.N.; SU, C.; SUNDAR, N.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. *Vet. Parasitol.*, v.140, p.76-82, 2006a.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; PINEDA, N.; KYVSGAARD, N.C.; LUNA, L.A.; RIMBAUD, E.; OLIVEIRA, J.B.; KWOK, O.C.H.; QI, Y.; SU, C. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. *Vet. Parasitol.*, v.142, p.47-53, 2006b.

DUBEY, J.P.; SU, C.; CORTÉS, J.A.; SUNDAR, N.; GOMEZ-MARIN, J.E.; POLO, L.J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L.E.; LORA, F.; JUMENEZ, J.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; ZHANG, X.; NIETO, A.; THULLIEZ, P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in cats from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet. Parasitol.*, v.141, p.42-47, 2006c.

DUBEY, J.P.; GOMEZ-MARIN, J.E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M.C.B.; HILL, D.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; MARCET, P.L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Vet. Parasitol.*, v.134, p.67-72, 2005a.

DUBEY, J.P.; HILL, D.E.; JONES, J.L.; HIGHTOWER, A.W.; KIRKLAND, E.; ROBERTS, J.M.; MARCET, P.L.; LEHMANN, T.; VIANNA, M.C.; MISKA, K.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.; SHEN, S.K.; GAMBLE, H.R. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in

the United States: risk assessment to consumers. *J. Parasitol.*, v.91, p.1082-1093, 2005b.

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. *Vet. Parasitol.*, v.117, p.229-234, 2003.

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

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

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

DUBEY, J.P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Euk. Microbiol.*, v.44, p.592-602, 1997.

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Veterinary Parasitology*, v.64, p.65-70, 1996.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. *Toxoplasmosis of animals and man*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 1988.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.*, v.23, p.537-546, 1976.

DUCANSON, P.; TERRY, R.S.; SMITH, J.E.; HIDE, G. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in a commercial sheep flock. *Int. J. Parasitol.*, v.31, p.1699-1703, 2001.

DUMÈTRE, A.; AJZENBERG, D.; ROZETTE, L.; MERCIER, A.; DARDÉ, M.-L. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: Seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. *Vet. Parasitol.*, v.142, p.376-379, 2006.

FAZAELI, A.; EBRAHIMZADEH, A. A new perspective on and re-assessment of SAG2 locus as the tool for genetic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates, *Parasitol. Res.*, v.101, p.99-104, 2007.

FERREIRA-DA-SILVA, M.F.; TAKÁCS, A.C.; BARBOSA, H.S.; GROSSA, U.; LÜDER, C.G.K. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.299, p.381-388, 2009.

FERREIRA-DA-SILVA, M.F.; BARBOSA, H.S.; GROSSA, U.; LÜDER, C.G.K. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biosystem*, v.4, p.824-834, 2008.

FERREIRA, I.M.R.; VIDAL, J.E.; COSTA-SILVA, T.A.; MEIRA, C.S.; HIRAMOTO, R.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp. Parasitol.*, v.118, p.221-227, 2008.

FERREIRA, A.M.; VITOR, R.W.A.; GAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect. Genet. Evol.*, v.6, p.22-31, 2006.

FRENKEL, J.K. The stage-conversion time of *Toxoplasma gondii* : interpretation of chemical-biologic data out of parasitologic or host context. *Parasitol. Res.*, v.82, p.656-658, 1999.

FREYRE, A.; CORREA, O.; FALCON, J.; MENDEZ, J.; GONZALEZ, M.; VENZAI, J.M. Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitol. Res.*, v.87, p.941-944, 2001.

FREYRE, A.; BONINO, J.; FALCÓN, J.; CASTELLS, D.; CORREA, O.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, v.73, p.13-15, 1997.

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

GALISTEU, K.J.; MATTOS, C.B.; LELIS, A.G.L.; OLIVEIRA, M.P.; SPEJORIM, L.F.; JORDÃO, P.; ZAGO, A.P.; CURY, P.M.; MATTOS, L.C.; ROSSIT, A.R.B.; CAVASINI, C.E.; MACHADO, R.L.D. Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. *Rev. Panam. Infectol.*, v.9, p.24-29, 2007.

GARDNER, I.A.; GREINER, M.; DUBEY, J.P. Statistical evaluation of test accuracy studies for *Toxoplasma gondii* in food animal intermediate hosts. *Zoonoses Public Health*, 2009. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01281.x.

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

GRIGG, M.E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A.B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J.C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, v.204, p.161-165, 2001.

HAMZAVI, Y.; MOSTAFAIE, A.; NOMANPOUR, B. Serological prevalence of toxoplasmosis in meat producing animals. *Iran. J. Parasitol.*, v.2, p.7-11, 2007.

HELMICK, B.; OTTER, A.; McGARRY, J.; BUXTON, D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Res. Vet. Sci.*, v.73, p.187-189, 2002.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300- fold repetitive 529bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.*, v.30, p.69-75, 2000.

HONORÉ, S.; COUVELARD, A.; GARIN, Y.J.F.; BEDEL, C.; HÉNIN, D.; DARDÉ, M.L.; DEROUIN, F.; Génotypage de souches de *Toxoplasma gondii* chez des patients immunodéprimés. *Pathol. Biol.*, v.48, p.541-547, 2000.

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

HUGHES, J.M.; WILLIAMS, R.H.; MORLEY, E.K.; COOK, D.A.N.; TERRY, R.S.; MURPHY, R.G.; SMITH, J.E.; HIDE, J.E. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitology*, v.132, p.29-36, 2006.

HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, v.23, p.254-267, 2006.

HUSON, D.H. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, v.14, p.68-73, 1998.

JEFFRIES, A.C.; SCHNITZLER, B.; HEYDORN, A.O.; JOHNSON, A.M.; TENTER, A.M. Identification of synapomorphic characters in the genus

*Sarcocystis* based on 18S rDNA sequence comparison. *J. Euk. Microbiol.*, v.44, p.388-392, 1997.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M.; SIBLEY, L.D. Selection at a single *locus* leads to widespread expansion of *Toxoplasma gondii* lineages that are virulent in mice. *PLOS Genetics*, v.5, 2009. doi:10.1371/journal.pgen.1000404.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G.A.; CLIFFORD, D.B.; SIBLEY, L.D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.5881-5887, 2005.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. *Toxoplasma*-safe meat: close to reality? *Trends Parasitol.*, v.25, p.18-22, 2009.

KLUN, I.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; KATIC-RADIVOJEVIC, S.; NIKOLIC, A. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors. *Vet. Parasitol.*, v.135, p.121-131, 2006.

KOMPALIC-CRISTO, A.; NOGUEIRA, S.A.; GUEDES, A.L.; FROTA, C.; GONZÁLEZ, L.F.; BRANDÃO, A.; AMENDOEIRA, M.R.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Lack of technical specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.98, p.92-95, 2004.

KWOK, S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990, p.142-145.

LEHMANN, T.; MARCET, P.L.; GRAHAM, D.H.; DAHL, E.R.; DUBEY, J.P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v.103, p.11423-11428, 2006.

LEHMANN, T.; BLACKSTON, C.R.; PARMLEY, S.F.; REMINGTON, J.S.; DUBEY, J.P. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *J. Parasitol.*, v.86, p.960-971, 2000.

LITERAK, I.; RYCHLIK, I.; SBOVODOVA, V.; POSPISIL, Z. Restriction fragment length polymorphism and virulence of czech *Toxoplasma gondii* strains. *Int. J. Parasitol.*, v.28, p.1367-1374, 1998.

MACKINNON, A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med.*, v.30, p.127-134, 2000.

MASALA, G.; PORCU, R.; DAGA, C.; DENTI, S.; CANU, G.; PATTA, C., TOLA S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.19, p.96-98, 2007.

MASALA, G.; PORCU, R.; MADAU, L.; TANDA, A.; IBBA, B.; SATTA, G. TOLA, S. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.*, v.117, p.15-21, 2003.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, v.5, p.607-625, 1999.

MONDRAGON, R.; HOWE, D.K.; SUBEY, J.P.; SIBLEY, L.D. Genotypic analysis of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs. *J. Parasitol.*, v.84, p.639-641, 1998.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMÍREZ, C.; FUENTES, I. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in Spain. *J. Parasitol.*, v.92, p.1044-1046, 2008.

MONTOYA, J.G.; BERRY, A.; ROSSO, F.; REMINGTON, J.S. The differential agglutination test as a diagnostic aid in cases of toxoplasmic lymphadenitis. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, p.1463-1468, 2007.

MOON, M.H. Serological cross-reactivity between *Sarcocystis* and *Toxoplasma* in pigs. *Korean J. Parasitol.*, v.25, p.188-194, 1987.

MORRISON, D.A. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *Int. J. Parasitol.*, v.35, p.567-582, 2005.

ONCEL, T.; VURAL, G. Occurrence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sheep in Istanbul, Turkey. *Vet. Arhiv*, v.76, p.547-553, 2006.

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

PACHECO, R.G.; BOTELHO, G.G.; TEIXEIRA, M.N. Coagulograma de ovinos experimentalmente infectados com *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Apicomplexa:Sarcocystidae). *Semina*, v.16, p.26-28, 1995.

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

PEREIRA-BUENO, J.; QUINTANILLA-GOZALO, A.; PÉREZ-PÉREZ, V.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.*, v.121, p.33-43, 2004.

PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; DE OLIVEIRA, E.C.; BANDARRA, P.M.; LEAL, J.S.; PEDROSO, P.M.O.; DRIEMEIER, D. Aborto ovino associado com infecção por *Sarcocystis* sp. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.393-397, 2007.

PITA GONDIM, L.F.; BARBOSA Jr., H.V.; RIBEIRO FILHO, C.H.A.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.82, p.273-276, 1999.

PRESTRUD, K.W.; ASBAKK, K.; MØRK, T.; FUGLEI, E.; TRYLAND, M.; SU, C. Direct high-resolution genotyping of *Toxoplasma gondii* in arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in the remote arctic Svalbard archipelago reveals widespread clonal Type II lineage. *Vet. Parasitol.*, v.158, p.121-128, 2008.

RAGOZO, A.M.; YAI, R.L.; OLIVEIRA, L.N.; DIAS, R.A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo state, Brazil. *J. Parasitol.*, v.94, p.1259-1263, 2008.

RICHOMME, C.; AUBERT, D.; GILOT-FROMONT, E.; AJZENBERG, D.; MERCIER, A.; DUCROT, C.; FERTÉ, H.; DELORME, D.; VILLENA, I. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet. Parasitol.*, v.164, p.296-300, 2009.

ROBERTS, T.; FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, p.249-256, 1990.

ROMANELLI, P.R.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M.; OGAWA, L.; DE PAULA, V.S.O.; GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res. Vet. Sci.*, v.82, p.202-207, 2007.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.*, v.116, p.801-807, 1941.

SAWADOGO, P.; HAFID, J.; BELLETE, B.; TRAN MANH SUNG, R.; CHAKDI, M.; FLORI, P., RABERIN, H.; BENT HAMOUNI, I.; CHAIT, A.; DALAL, A.

Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. *Vet. Parasitol.*, v.130, p.89-92, 2005.

SEVGILI, M.; BABÜR, C.; NALBANTOGLU, S.; KARAS, G.; VATANSEVER, Z. Determination of seropositivity for *Toxoplasma gondii* in sheep in Sanliurfa Province. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v.29, p.107-111, 2005.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.62, p.329-351, 2008.

SIBLEY, L.D.; MORDUE, D.G.; SU, C.; ROBBEN, P.M.; HOWE, D.K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, v.357, p.81-88, 2002.

SILVA, R.C. *Diferenciação entre os estágios agudo e crônico na infecção toxoplásmica pela técnica de aglutinação direta modificada*. 2006. 180f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

SUZUKI, Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.*, v.186, p.S58-S65, 2002.

SUZUKI, Y.; CONLEY, F.K.; REMINGTON, J.S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.*, v.159, p.790-794, 1989.

SWITAJ, K.; MASTER, A.; SKRZYPCZAK, M.; ZABOROWSKI, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.11, p.170-176, 2005.

TENTER, A.M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.104, p.364-369, 2009.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, v.30, p.1217-1258, 2000.

THULLIEZ, P.; REMINGTON, J.S.; SANTORO, F.; OVLAQUE, G.; SHARMA, S.; DESMONTS, G. Une Nouvelle Réaction d'Agglutination pour le Diagnostic du Stade Évolutif de la Toxoplasmose Acquisée. *Pathol. Biol.*, v.34, p.173-177, 1986.

VELMURUGAN, G.V.; DUBEY, J.P.; SU, C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet. Parasitol.*, v.155, p.314-318, 2008.

VESCO, G.; BUFFOLANO, W.; LA CHIUSA, S.; MACUSO, G.; CARACAPPA, S.; CHIANCA, A.; VILLARI, S.; CURRÒ, V.; LIGA, F.; PETERSEN, E. *Toxoplasma gondii* infections in sheep in Sicily, southern Italy. *Vet. Parasitol.*, v.146, p.3-8, 2007.

WILSON, M.; WARE, D.; JURANEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, p.277-281, 1990.

YAI, L.E.O.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; PENA, H.F.J.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.162, p.332-337, 2009.

YAI, L.E.O.; VIANNA, M.C.B.; SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R.L.; RICHTZENHAIN, L.J.; GENNARI, S.M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.40, p.227-234, 2003.

YANG, Z.-Q.; ZUO, Y.-X.; YAO, Y.-G.; CHEN, X.-W.; YANG, G.-C.; ZHANG, Y.-P. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.115, p.283-288, 2001.

ZIA-ALI, N.; FAZAELI, A.; KHORAMIZADETH, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.; KESHAVARZ-VALIAN, H. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains from different hosts in Iran. *Parasitol. Res.*, v.101, p.111-115, 2007.

ZHOU, P.; ZHANG, H.; LIN, R.-Q.; ZHANG, D.-L.; SONG, H.-Q.; SU, C.; ZHU, X.-Q. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitol. Int.*, v.58, p.193-195, 2009.

**ARTIGO PUBLICADO****Artigo #1 (Short communication):**

Da Silva, R.C., Su, C., Langoni, H. First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.165, p.332-336, 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

Short communication

## First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil

Rodrigo Costa da Silva<sup>a,\*</sup>, Chunlei Su<sup>b</sup>, Helio Langoni<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil<sup>b</sup> Department of Microbiology, The University of Tennessee, Knoxville, TN 37996, USA

## ARTICLE INFO

Article history:  
Received 30 April 2009  
Received in revised form 7 July 2009  
Accepted 7 July 2009

Keywords:  
*Sarcocystis tenella*  
*Toxoplasma gondii*  
Natural infection  
Co-infection  
Molecular techniques  
Slaughterhouse  
Human consumption

## ABSTRACT

*Sarcocystis tenella* is a dog–sheep protozoan parasite, causing a widespread enzootic muscle parasitosis and neurological disease mainly in lambs. This parasite is pathogenic to sheep and important to the economical production of sheep. The present study was initially aimed to determine *Toxoplasma gondii* infection and the occurrence of co-infection with other Apicomplexa parasites in 602 Brazilian sheep. Twenty of these sheep were positive with antibodies to *T. gondii* by MAT and IFAT-IgG tests, positive with PCR-RFLP genotyping at multiple loci, and parasites were isolated from mice infected with sheep tissue samples. Two additional sheep born in Brazil, a 2-year-old female Polwarth (Ideal) sheep, a breed originated from Australia (#1), and a 1-year-old male Corriedale sheep, a breed originated from New Zealand and Australia (#2) were positive to *T. gondii* antibodies by serum tests, and PCR, but negative for bioassay in mice. In genotyping at 12 loci, sheep #1 sample and #2 presented positive results only for some markers. PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA (18S rRNA) was performed in all 22 animals to identify the possibility of co-infection of *T. gondii* with other Apicomplexa parasites, such as *S. tenella*, *Neospora caninum* and *Hammondia hammondi*, resulting in a *T. gondii* profile for the first 20 animals and a unique genotyping profile for sheep #1 and #2, identical to *S. tenella*. The 18S rRNA PCR products (~310 bp) were sequenced and blasted to GenBank database at NCBI. Both samples were identical to *S. tenella* 18S rRNA gene (GenBank accession number L24383-1). These results suggest the existence of co-infection of *S. tenella* with *T. gondii* in ewes from Brazil.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Sarcocystis* is one of the most prevalent intracellular protozoan parasites in food livestock such as cattle, sheep and goat. *Sarcocystis tenella* (synonymous = *Sarcocystis ovis*) is a pathogenic species transmitted by canids, the definitive hosts (Dubey et al., 1982, 1989a; Tenter,

1995; Adriana et al., 2008). *S. tenella* causes widespread enzootic muscle parasitosis, causing significant losses in the livestock industry due to death of the animal or abortion of pregnant ewes during acute sarcocystiosis, and reduced weight gain, milk and wool production during chronic sarcocystiosis (Dubey et al., 1989a; Pescador et al., 2007) and neurological disease mainly in lambs (Dubey et al., 1989b; Henderson et al., 1997; Yazicioğlu and Beyazit, 2005). Sheep become infected with *S. tenella* by ingesting sporocysts with contaminated food or water (Tenter, 1995). Encephalitis may occur in infected sheep, which is similar to two other protozoans, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* (Dubey and Beattie, 1988; Dubey, 1990).

\* Corresponding author at: Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-000 Botucatu, SP, Brazil. Tel.: +55 14 38116270; fax: +55 14 38116075.  
E-mail address: [silva\\_rcd@yahoo.com.br](mailto:silva_rcd@yahoo.com.br) (R.C. da Silva).

In this study, we report two cases of natural infections of *S. tenella* in sheep from Brazil for the first time. Serum test and molecular typing of these sheep samples also suggested co-infection of *T. gondii*.

## 2. Case report

Six hundred and two sheep from Southeast and South regions of Brazil were slaughtered in two different slaughterhouses from São Paulo state, Brazil, and assayed for *T. gondii* infection. None of these animals presented any neurological or respiratory signs at that moment. All of them were initially tested for *T. gondii* antibodies by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) (Camargo, 1964) and by Modified Agglutination Test (MAT) (Desmots and Remington, 1980). The brain and muscle tissue (pool of heart and diaphragm) were bioassayed in mice from serum positive animals, aiming to isolate *T. gondii* strains. Twenty animals presented positive results for serology and bioassay in mice. Two additional sheep born in Brazil, one 2-year-old female Polwarth (Ideal) sheep (#1), a breed from Australia and bred extensively in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul State, South region of Brazil; and one 1-year-old male Corriedale sheep (#2), a breed from New Zealand and Australia and bred extensively in Pirajuí, São Paulo State, South-east region of Brazil resulted positive for serology with higher titers (#1: MAT = 4096, IFAT-IgG = 1024; #2: MAT = 256, IFAT-IgG = 64), but negative for bioassay in mice.

These 22 samples were screened for *T. gondii* infection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of the 300-fold repetitive 529 base pair (bp) sequence (Homan et al., 2000). The genotype of *T. gondii* was determined by

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) using 12 markers including SAG1, 5'-3'SAG2, alt.SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, L358, c22-8, c29-6, PK1, Apico and CS3 to genotype *T. gondii* (Su et al., 2006). Six *T. gondii* reference strains (GT1, PTG, CTG, MAS, TgCgCa1 and TgCatBr5) and negative control were included. Twenty sheep were confirmed by genotyping. The typing in 12 markers for sheep #1 and #2 presented products for some markers, as SAG1 (type II or III; #2), 5'-3'SAG2 (type I or II; #2); alt-SAG2 (type II; #2); SAG3 (type III; both animals); Apico (type unique-I; #1), and negative results for other markers. To determine the possibility of co-infection with *S. tenella*, *N. caninum* and *Hammondia hammondi* in all animals, nested PCR of 18S ribosomal RNA (18S rRNA) was performed using 25 µM of external primers Tg18s48F (5'CCATGCATGCTAAGTATAAGC3') and Tg18s359R (5'GTTACCCGTCCTGACCAC3'), and 50 µM of internal primers Tg18s58F (5'CTAAGTATAAGCTTTTATACGGC3') and Tg18s348R (5'TGCCACGGTAGTCCAATAC3') (Integrated DNA Technologies, USA) with a 290 base pair (bp) product for *Sarcocystis neurona*, *N. caninum*, *H. hammondi* and *T. gondii*, and 310 bp for other *Sarcocystis* spp. (Fig. 1). PCR-RFLP was performed to check the sheep samples with references including *Sarcocystis miescheriana*, *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis moulei*, *Sarcocystis gigantea*, *Sarcocystis hominis*, *S. tenella*, *S. neurona*, *N. caninum* (Nc-Liv), *H. hammondi* and *T. gondii* (MAS). All cycling reactions were carried out using a MasterCycler EP gradient (Eppendorf, USA), and run in a 1.5% agarose gel electrophoresis to checking the quantity and quality of the PCR products. The products of nested PCR were digested by two sets of restriction enzymes (set 1: *AluI* and *HhaI*, to differentiate *S. tenella* from *T. gondii*, *N. caninum* and

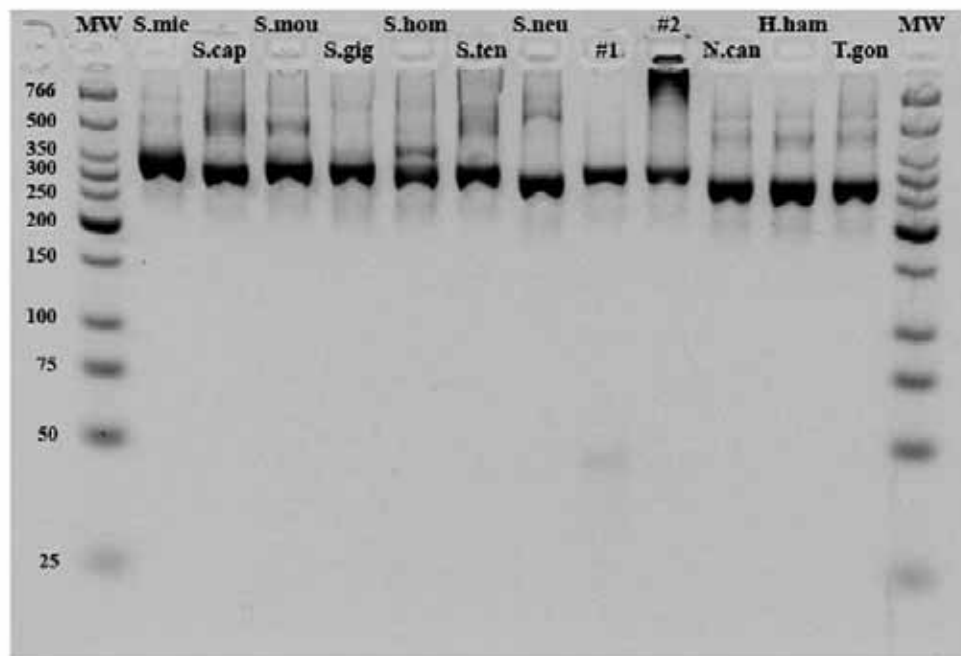


Fig. 1. Nested PCR of 18S rRNA for the reference strains. Legend: MW: low molecular weight ladder (New England Biolabs, USA); S.mie: *Sarcocystis miescheriana*; S.cap: *Sarcocystis capracanis*; S.mou: *Sarcocystis moulei*; S.gig: *Sarcocystis gigantea*; S.hom: *Sarcocystis hominis*; S.ten: *Sarcocystis tenella*; S.neu: *Sarcocystis neurona*; #1: Polwarth sheep; #2: Corriedale sheep; N.can: *Neospora caninum*; H.ham: *Hammondia hammondi*; T.gon: *Toxoplasma gondii*.

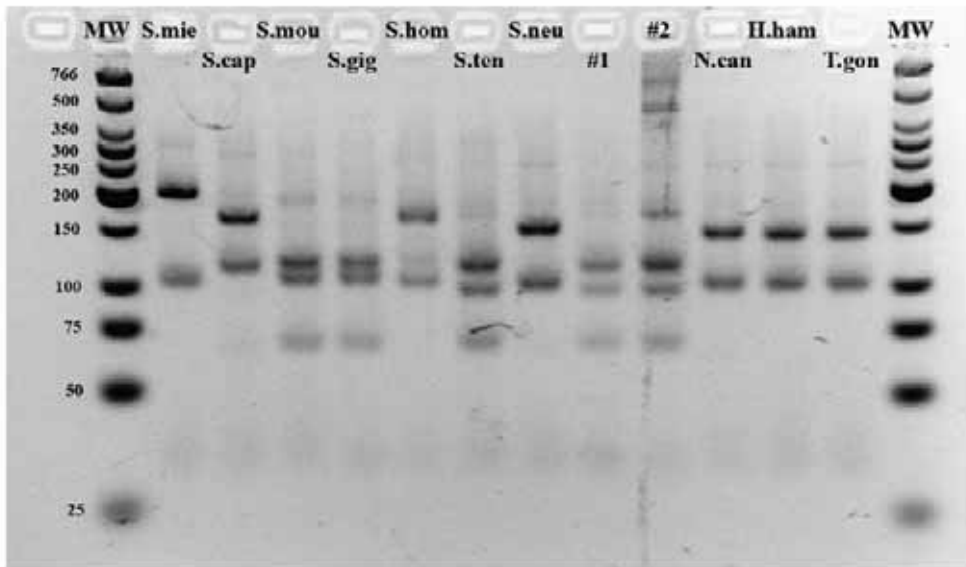


Fig. 2. RFLP-PCR products of 18S rRNA for the reference strains digested by *AluI* and *HhaI* restriction enzymes. Legend: MW: low molecular weight ladder (New England Biolabs, USA); S.mie: *S. miescheriana*; S.cap: *S. capracanis*; S.mou: *S. moulei*; S.gig: *S. gigantea*; S.hom: *S. hominis*; S.ten: *S. tenella*; S.neu: *S. neurona*; #1: Polwarth sheep; #2: Corriedale sheep; N.can: *N. caninum*; H.ham: *H. hammondi*; T.gon: *T. gondii*.

*H. hammondi*; set 2: *DdeI*, *Hpy188III* and *MspI*, to differentiate all *Sarcocystis* species) (New England Biolabs, USA) at 37 °C during 60 min each set. All digestion products were run in 3% agarose gel resulting in a *T. gondii* profile for the first 20 animals. Sheep #1 and #2 presented unique product in nested PCR (~310 bp) and genotyping profile in PCR-RFLP, compared to the refer-

ences, similar to *S. tenella* (Figs. 2 and 3). The nested PCR products for 18S rRNA were purified using a Montage<sup>®</sup> PCR Centrifugal Filter Devices, P36461 (Millipore, USA) and quantified using Hoefer fluorometer DNA Quantitation DQ200 (Hoefer, USA).

Direct sequencing of purified PCR products was performed at the University of Tennessee lab facilities,

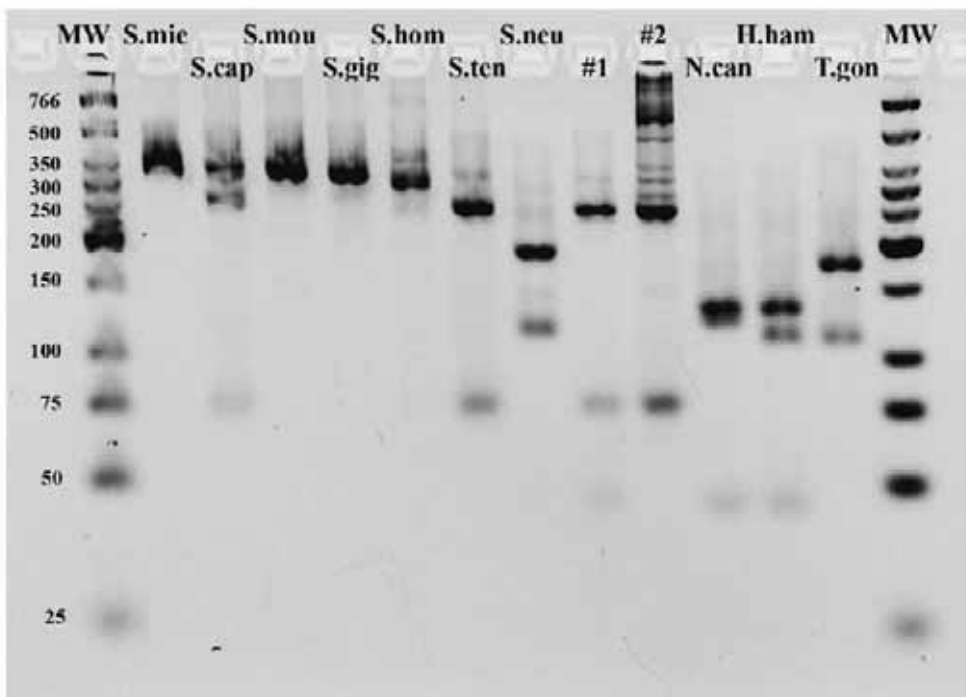


Fig. 3. 18S RFLP-PCR products of 18S rRNA for the reference strains digested by *DdeI*, *MspI* and *Hpy188III* restriction enzymes. Legend: MW: low molecular weight ladder (New England Biolabs, USA); S.mie: *S. miescheriana*; S.cap: *S. capracanis*; S.mou: *S. moulei*; S.gig: *S. gigantea*; S.hom: *S. hominis*; S.ten: *S. tenella*; S.neu: *S. neurona*; #1: Polwarth sheep; #2: Corriedale sheep; N.can: *N. caninum*; H.ham: *H. hammondi*; T.gon: *T. gondii*.

using 5  $\mu\text{M}$  of the internal primers used for nested PCR (Tg18s58F and Tg18s348R) and at least 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA purified product. Sequencing was carried out using a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA). The 18S rRNA sequenced were edited in BioEdit and blasted in GenBank database at NCBI. Both samples were identical to *S. tenella* 18S rRNA gene (GenBank accession number L24383-1).

### 3. Discussion

In this study, 602 animals were slaughtered in two different slaughterhouses with 2 sheep were infected with *S. tenella*. In Brazil, there were only reports of experimental infection by *S. tenella* in sheep (Pacheco et al., 1995; Botelho and Pacheco, 1996), or natural infection caused by other *Sarcocystis* species.

Four *Sarcocystis* species have been reported in sheep: *S. gigantea*, *Sarcocystis arieticanis*, *Sarcocystis medusiformis* and *S. tenella*, being the last one the most pathogenic to sheep (Dubey et al., 1989a,b). Sheep can be infected by *S. tenella* when ingesting food or water contaminated with sporocysts. Usually the clinical signs are discrete, and when present, include anorexia, fever, decreased weight gain, anemia and abortions in ewes (Pescador et al., 2007). Neurological signs including encephalomyelitis, muscle weakness, hindlimb paresis and ataxia have been seen in naturally infected sheep. After recovery from the acute illness, some sheep may lose their wool. Acute deaths can also occur without other symptoms (Dubey et al., 1989b; Henderson et al., 1997; Buxton, 1998). The prevalence of *S. tenella* in sheep is variable worldwide. Asia presents the highest occurrence, with 96.9% in Mongolia (Fukuyo et al., 2002), 93% in Ethiopia (Woldemeskel and Gebreab, 1996), 47.3% (Özkayhan et al., 2007) to 86.5% in Turkey (Beyazit et al., 2007), 33.9% in Iran (Daryani et al., 2006), 91.7% in Romania (Adriana et al., 2008), and 84% in United States (Dubey et al., 1988). The high prevalence is associated with the free-access of dogs, the definitive host, to the flock in farms (Adriana et al., 2008) or arthropods acting as mechanical vectors for *Sarcocystis* sporocysts excreted in dog feces.

Heart, diaphragm, and skeletal muscles are the preferred organs for *Sarcocystis* spp. in the intermediate hosts and can persist through life of the hosts (Buxton, 1998; Daryani et al., 2006). In this study we detected *S. tenella* and *T. gondii* co-infections in muscle (diaphragm/heart) and the animals did not present clinical signs. Only a few markers give positive typing results of *T. gondii* infection for the two sheep samples, suggesting parasite tissue load is low.

Molecular diagnosis is highly sensitive to detect and differentiate the parasites. The specificity of the 18S rRNA was previous confirmed by Tenter et al. (1992, 1994), Ellis et al. (1995), Guo and Johnson (1995), Jeffries et al. (1997) and Yang et al. (2001) that considered as a powerful tool for species-specific differentiation of the three ovine *Sarcocystis* species (*S. tenella*, *S. capracanis*, *S. arieticanis* and *S. gigantea*), *N. caninum* and *T. gondii*. #1 and #2 sheep samples presented a different product size (310 bp) from all other animals and *S. neurona*, *N. caninum*, *H. hammondi* and *T. gondii* (290 bp), in nested PCR, but similar to other *Sarcocystis* species. RFLP-

PCR of all other animals confirmed the infection only by *T. gondii*, while these two animals presented different products compared to different Apicomplexa parasites, including *T. gondii* and *Sarcocystis* species, except *S. tenella* (Figs. 2 and 3).

The sequencing results for 18S rRNA gene did not detect a *T. gondii* profile probably due the low parasite load in the analyzed samples. It can be observed on RFLP-PCR results for both sheep #1 and #2 that presented specific products for *T. gondii* after digestion for only some markers. In these sheep, the presence of *T. gondii* was confirmed by serology, PCR 300-fold element and partial RFLP-PCR results. Andrade and Weiland (1971) and Moon (1987) discharged the possibility of cross reaction between *Sarcocystis* spp. and *T. gondii* in IFAT, and evaluating the PCR described by Homan et al. (2000), they also reported no cross reaction of *T. gondii* with *Echinococcus granulosus*, *Giardia duodenalis*, *Plasmodium falciparum*, *Sarcocystis* spp., *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis* and *N. caninum* using this PCR protocol. Additionally, this PCR detects more copies than 18S rRNA. So, the co-infection occurred in those two animals but *S. tenella* could present higher DNA amount than *T. gondii*. Based on these and sequencing results, we report the first identification of *S. tenella* and the co-infection with *T. gondii* in sheep from Brazil.

Thus, this report demonstrates the presence of *S. tenella* in commercial sheep bred extensively in two different and important economical regions from Brazil for sheep flock breeding, co-infected with *T. gondii*, both as subclinical infection, showing the importance of the molecular techniques as an epidemiological and diagnosis tool to determine the agent(s) involved in the infection or co-infection.

### Acknowledgements

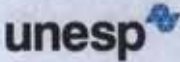
We would like to thank *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* for the PhD grant and financial support, FAPESP Process #2006/02486-4 and #2006/07198-7.


### References

- Adriana, T., Mircean, V., Blaga, R., Bratu, C.N., Cozma, V., 2008. Epidemiology and etiology in sheep sarcocystosis. *Bull. UASVM Vet. Med.* 65, 49–54.
- Andrade, C.M., Weiland, G., 1971. Serologische untersuchungen zur feststellung gemeinsamer antigen von *Toxoplasmen*, *Sarkosporidien* und *Kolizidien*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochschr.* 84, 61–80.
- Beyazit, A., Yazicioğlu, Ö., Karaer, Z., 2007. The prevalence of ovine *Sarcocystis* species in Izmir province. *Ankara. Üniv. Vet. Fak. Derg.* 54, 111–116.
- Botelho, G.G., Pacheco, R.G., 1996. Aspectos bioquímico-séricos na infecção experimental de ovinos com *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1986 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Rev. Bras. Med. Vet.* 18, 26–31.
- Buxton, D., 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.* 29, 289–310.
- Camargo, M.E., 1964. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Patol. Clin.* 10, 143–171.
- Daryani, A., Alaei, R., Dehghan, M.H., Arab, R., Sharif, M., Ziaei, H., 2006. Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered sheep and buffaloes in Ardabil, Iran. *J. Anim. Vet. Adv.* 5, 60–62.

- Desmonts, G., Remington, J.S., 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11, 562–568.
- Dubey, J.P., 1990. *Neospora caninum*: a look at a new *Toxoplasma*-like parasite of dogs and other animals. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 12, 653–663.
- Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 165.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., Fayer, R., Livingston Jr., C.W., 1988. *Sarcocystis arieticanis* and other *Sarcocystis* species in sheep in the United States. *J. Parasitol.* 74, 1033–1038.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Callis, G., Blixt, J.A., 1982. Development of the sheep-canid cycle of *Sarcocystis tenella*. *Can. J. Zool.* 60, 2464–2477.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R., 1989a. *Sarcocystosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 215.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., Munday, B.L., Lipscomb, T.P., 1989b. Ovine sporozoan encephalomyelitis linked to *Sarcocystis* infection. *Vet. Parasitol.* 34, 159–163.
- Ellis, J.T., Luton, K., Baverstock, P.R., Whitworth, G., Tenter, A.M., Johnson, A.M., 1995. Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA sequences. *Parasitology* 110, 521–528.
- Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B., 2002. Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 33, 490–495.
- Guo, Z.G., Johnson, A.M., 1995. Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 81, 365–370.
- Henderson, J.M., Dies, K.H., Haines, D.M., Higgs, G.W., Ayroud, M., 1997. Neurological symptoms associated with sarcocystosis in adult sheep. *Can. Vet. J.* 38, 168–170.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschuere, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 30, 69–75.
- Jeffries, A.C., Schnitzler, B., Heydorn, A.O., Johnson, A.M., Tenter, A.M., 1997. Identification of synapomorphic characters in the genus *Sarcocystis* based on 18S rDNA sequence comparison. *J. Euk. Microbiol.* 44, 388–392.
- Moon, M.H., 1987. Serological cross-reactivity between *Sarcocystis* and *Toxoplasma* in pigs. *Korean J. Parasitol.* 25, 188–194.
- Özkayhan, M.A., Karaer, Z., İlkme, A.N., Atmaca, H.T., 2007. The prevalence of *Sarcocystis* species in sheep slaughtered in municipality slaughterhouse in Kirikkale. *Türkiye Parazit. Derg.* 31, 272–276.
- Pacheco, R.G., Botelho, G.G., Teixeira, M.N., 1995. Coagulograma de ovinos experimentalmente infectados com *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Semina* 16, 26–28.
- Pescador, C.A., Corbellini, L.G., de Oliveira, E.C., Bandarra, P.M., Leal, J.S., Pedrosa, P.M.O., Driemeier, D., 2007. Aborto ovino associado com infecção por *Sarcocystis* sp. *Pesq. Vet. Bras.* 27, 393–397.
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int. J. Parasitol.* 36, 841–848.
- Tenter, A.M., 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int. J. Parasitol.* 25, 1311–1330.
- Tenter, A.M., Baverstock, P.R., Johnson, A.M., 1992. Phylogenetic relationships of *Sarcocystis* species from sheep, goats, cattle and mice based on ribosomal RNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 22, 503–513.
- Tenter, A.M., Luton, K., Johnson, A.M., 1994. Species-specific identification of *Sarcocystis* and *Toxoplasma* by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. *Appl. Parasitol.* 35, 173–188.
- Woldemeskel, M., Gebreab, F., 1996. Prevalence of sarcocysts in livestock of northwest Ethiopia. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 43, 55–58.
- Yang, Z.-Q., Zuo, Y.-X., Yao, Y.-G., Chen, X.-W., Yang, G.-C., Zhang, Y.-P., 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 283–288.
- Yazicioglu, O., Beyazit, A., 2005. Encephalomyelitis associated with a *Sarcocystis*-like protozoan in a ten-month-old ewe lamb. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1209–1212.

**Apêndice A.** Parecer de aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal. Botucatu, 2009.


 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

 **fmvz - unesp**  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Campus de Botucatu

## A T E S T A D O

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa  
**“Caracterização genotípica de amostras de *Toxoplasma gondii* isoladas de ovinos em abatedouro”** Protocolo nº 65/2006-CEEA do(a) Pós-Graduando(a) **Rodrigo Costa da Silva**, nível Doutorado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 21 de setembro de 2006.

  
**PROFº ASS. DRº. MIGHIKO SAKATE**  
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

**FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Seção Técnica Acadêmica**  
Distrito de Rubião Jr. s/n – Botucatu/SP – 18618-000  
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ [sta@fmvz.unesp.br](mailto:sta@fmvz.unesp.br) – 🌐 [www.fmvz.unesp.br](http://www.fmvz.unesp.br)

**Apêndice B.** Sumário de genótipos de *T. gondii* obtidos pela RFLP-PCR por Pena et al. (2008), além de TgToucan. Botucatu, 2009.

Registro	Cepas	Marcadores moleculares												
		SAG1	5'-3'SAG2	alt-SAG2	SAG3	Btub	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3	
(14)	RH88	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
(15)	CAST	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	III	I	I
(16)	TgCkBr141	I	I	I	I	I	I	I	I	u-1	I	III	I	I
(17)	TgCatBr79	I	I	I	I	III	I	I	I	u-1	I	I	I	I
(18)	TgCatBr40	I	I	II	I	III	I	I	I	II	I	I	I	I
(19)	TgCkBr109	I	I	II	I	III	I	III	I	II	I	III	I	I
(20)	TgCatBr26	I	I	I	III	I	I	I	I	I	I	u-1	I	I
(21)	TgCatBr2	I	I	I	III	I	I	I	I	u-1	I	I	I	I
(22)	TgCatBr45	I	I	I	III	I	I	I	I	u-1	I	I	I	I
(23)	TgCkBr114	I	I	II	III	I	I	I	I	II	I	III	I	I
(24)	TgCatBr34	I	I	II	III	I	I	I	I	u-1	I	III	I	I
(25)	TgDgBr2	I	I	I	III	I	I	I	I	u-1	I	III	I	I
(26)	TgCatBr9	I	I	I	III	III	I	I	I	I	I	u-1	I	I
(27)	TgDgBr18	I	I	II	III	III	I	I	I	u-1	I	II	I	I
(28)	TgCatBr72	I	I	I	III	III	I	I	I	u-1	I	II	I	I
(29)	TgCatBr50	I	I	I	III	III	I	I	I	u-1	I	III	I	I
(30)	TgCkBr143	I	I	II	III	III	I	I	III	u-1	I	III	I	I
(31)	TgCatBr82	I	I	II	III	III	I	I	I	u-1	I	III	I	I
(32)	TgCatBr64	I	I	u-1	III	III	I	I	I	u-1	I	III	I	I
(33)	TgCatBr1	I	I	II	III	III	I	I	I	I	I	II	I	I
(34)	TgCkBr156	I	I	I	III	III	I	I	I	I	I	I	I	I
(35)	TgCatBr57	I	I	II	III	III	I	I	I	II	I	III	I	I
(36)	TgCkBr110	I	III	III	I	III	I	III	I	III	I	I	I	I
(37)	TgCkBr113	I	III	III	I	III	I	III	I	III	I	I	III	I
(38)	TgDgBr16	I	III	III	III	I	I	III	I	I	I	u-1	I	I

Registro	Cepas	Marcadores moleculares											
		SAG1	5'-3'SAG2	alt-SAG2	SAG3	Btub	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	CS3
(39)	TgCatBr41	I	III	III	III	I	III	u-1	I	I	u-1	III	I
(40)	TgCatBr18	I	III	III	III	III	II	u-1	I	I	u-1	I	I
(41)	TgCatBr6-20	I	-	I	III	III	II	u-1	I	I	u-1	I	I
(42)	TgCatBr25	I	III	III	III	III	II	u-1	I	I	II	I	I
(43)	TgCkBr107	I	III	III	III	III	II	u-1	I	I	I	III	I
(44)	TgDgBr8	I	III	III	III	III	II	I	I	I	I	I	I
(45)	TgCatBr20	I	III	III	III	III	III	I	III	III	III	III	I
(46)	TgCatBr10	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	I
(47)	TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	I
(48)	TgCatBr67	I	III	III	III	III	III	I	III	I	III	III	I
(49)	TgCatBr81	I	III	III	III	III	III	II	I	I	u-1	I	I
(50)	TgCatBr3	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	I
(51)	TgCatBr15	I	III	III	III	III	III	III	I	III	III	III	I
(52)	TgCkBr111	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	I
(53)	TgDgBr6	u-1	I	II	III	I	III	II	I	I	I	I	u-1
(54)	TgCatBr44	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	u-1	I	u-1
(55)	TgDgBr14	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	u-1
(56)	TgCatBr38	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	u-1
(57)	MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	u-1
(58)	TgCkBr116	u-1	II	II	III	III	II	II	-	II	II	I	u-1
(59)	TgCkBr155	u-1	III	III	III	III	III	u-1	I	I	III	I	u-1
(60)	TgCkBr149	II/III	III	III	III	III	III	I	III	III	I	III	II/III
(61)	CTG	II/III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	II/III
(62)	PTG	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II/III
(63)	TgCgCa1	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	I
(64)	GT1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
(65)	TgToucan	u-1	I	II	III	I	III	u-2	I	I	III	I	III