

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**JAMILLE RODRIGUES DA SILVA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM  
CÃES DOS MUNICÍPIOS DE ILHÉUS E ITABUNA, BAHIA, BRASIL**

**ILHÉUS – BAHIA**

**2015**

**JAMILLE RODRIGUES DA SILVA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM  
CÃES DOS MUNICÍPIOS DE ILHÉUS E ITABUNA, BAHIA, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. George Rêgo Albuquerque

Co-Orientadora: Profa. Dra. Bianca Mendes Maciel

**ILHÉUS – BAHIA**

**2015**

**JAMILLE RODRIGUES DA SILVA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM  
CÃES DOS MUNICÍPIOS DE ILHÉUS E ITABUNA, BAHIA, BRASIL**

Ilhéus – BA, 27/02/2015

---

Prof. George Rêgo Albuquerque – *DSc*  
UESC/DCAA  
(Orientador)

---

Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes – *PhD*  
UFRRJ/DPA

---

Prof. Alexandre Dias Munhoz – *DSc*  
UESC/DCAA

**ILHÉUS – BAHIA  
2015**

*A Deus,*

porque foi imprescindível a fé, para que não perdesse a esperança e pudesse prosseguir, apesar dos obstáculos.

*“O que é impossível aos homens é possível a Deus” (Lucas 18:27)*

E aos meus filhos,

*Mikael e Nikole*, tesouro maior não há.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Primeiro, a DEUS, pela grande oportunidade em cursar o mestrado e por colocar em meu caminho pessoas que fazem grande diferença em minha vida; sem ti Senhor, não teria força e perseverança para prosseguir. Obrigada por orientar meus passos.

Ao meu orientador Prof. George Rêgo Albuquerque, por todo o aprendizado durante o mestrado. Professor, sou tão grata a você que não tenho palavras para descrever aqui, saiba que tenho profundo respeito, carinho e admiração à sua pessoa. Muito obrigada pelas oportunidades e por ser um orientador paciente e dedicado.

Aos meus pais, em especial minha mãe, pelo incentivo, e dedicação aos meus filhos na minha ausência. Mãe sem você não conseguiria realizar o mestrado e chegar até aqui.

A minha amiga Luana Araújo Ribeiro, grande incentivadora para que eu fizesse o mestrado, obrigada por acreditar na minha capacidade e despertar a vontade de conhecer novos caminhos.

A minha família, meu companheiro Kuelfren e meus filhos Mikael e Nikole, obrigada por compreender esta fase tão importante em minha vida, e me desculpem se faltei em algum momento especial, essa jamais foi minha intenção, pois sei que mesmo perto estava longe, pois precisei dedicar horas a fio em frente ao computador e fora de casa para dar continuidade ao mestrado. Amo muito vocês.

Aos profissionais do Centro de Controle de Zoonoses de Ilhéus e Itabuna, Bahia, em especial aos Médicos Veterinários, Aloísio Correa Leite (CCZ de Ilhéus) e Samir Hage (CCZ de Itabuna), a pesquisa teve início graças à colaboração e ajuda de vocês na coleta de material biológico, meu profundo agradecimento.

Aos colegas de pós-graduação, Daniele Rocha, Fábio Carvalho e Rodrigo Bezerra, seus ensinamentos foram importantes para que eu prosseguisse com minha pesquisa.

Aos funcionários do Hospital Veterinários e os demais colegas de pós-graduação pelos momentos de distração, que apesar de curtos foram de grande valia para amenizar o cansaço e a preocupação.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela oportunidade de cursar uma Pós-graduação *stricto sensu* em Ciência Animal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para desenvolvimento da pesquisa.

*“Qualquer benefício que tenhamos custou algo a alguém um dia.”*

*Içami Tiba*

**MUITO OBRIGADA!**

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Toxoplasma gondii* EM CÃES DOS MUNICÍPIOS DE ILHÉUS E ITABUNA, BAHIA, BRASIL

### RESUMO

Os cães apresentam importância epidemiológica por atuarem como sentinelas da infecção toxoplásmica humana, sendo bons indicadores de contaminação ambiental. Nestes animais resultados sorológicos para *Toxoplasma gondii* foram amplamente relatados no Brasil, com percentuais variando de 4,9 % a 91 %. Objetivou-se com este estudo isolar e caracterizar geneticamente cepas de *T. gondii* oriundas de tecidos de cães naturalmente infectados dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil. Para isto, foram coletados sangue de 21 cães provenientes dos Centros de Controle de Zoonoses dos respectivos municípios, seus soros foram testados para presença de anticorpos para *T. gondii* pela Hemaglutinação Indireta. Cérebros e corações dos cães soropositivos foram digeridos e inoculados em camundongos para isolamento e caracterização do parasita pela técnica de PCR-RFLP utilizando 10 marcadores genéticos (SAG1, SAG2 novo, SAG3, BTUB, C22-8, C29-2, GRA6, PK1, APICO e L358). O resultado sorológico apontou sete (33,3%) cães soropositivos. Entretanto, no bioensaio, *T. gondii* foi isolado em apenas 04 (57,1%) dos 07 cães soropositivos, sendo designados de TgDgBr 6, 13, 17 e 21. Todas as cepas foram virulentas, provocando alterações clínicas (pêlos arrepiados, letargia, abdômen distendido) e morte dos camundongos com intervalos de 08 a 20 dias após inoculação. A caracterização genética destes 04 isolados revelou 04 genótipos únicos, todos com diferentes combinações das linhagens clonais (tipos I, II e III) e 02 genótipos apresentando alelos atípicos. A RFLP com uso de vários marcadores demonstrou ser capaz de detectar a diversidade genética das cepas circulantes no Brasil.

Palavras-chave: Genótipos. Marcadores genéticos. PCR-RFLP. Toxoplasmose canina.

## ISOLATION AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *Toxoplasma gondii* FROM DOGS OF THE CITIES OF ILHÉUS AND ITABUNA, BAHIA, BRAZIL

### ABSTRACT

Dogs have epidemiological importance because they act as sentinels of human *Toxoplasma gondii* infection, being good indicators of environmental contamination. In these animals serological results for *T. gondii* were widely reported in Brazil, with percentages ranging from 4,9 to 91%. The objective of this study was to isolate and characterize genetically the *T. gondii* strains originating from dogs naturally infected tissue of the cities of Ilhéus and Itabuna, Bahia, Brazil. For this 21 dogs of blood was collected from the Zoonosis Control Centers of the respective cities, their sera were examined for antibodies to *T. gondii* by indirect hemagglutination test. Brains and hearts of seropositive dogs were bioassayed in mice for the isolation and characterization of the parasite by PCR-RFLP using 10 genetic markers (SAG1, newSAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, GRA6, PK1, APICO and L358). The serology scored seven (33,3%) seropositive dogs. However, in the bioassay, *T. gondii* was isolated in only 04 (57, 1%) of 07 seropositive dogs, being designated TgDgBr 6, 13, 17 and 21. All strains were virulent, causing clinical changes (rough hair coat, lethargy, distended abdomen) and death of mice with intervals 08-20 days after inoculation. Genotyping of these four *T. gondii* isolates revealed four unique genotypes, all with different combinations of clonal lineages (types I, II and III) and two genotypes having atypical allele. Using RFLP several markers showed be able to detect the genetic diversity of strains circulating in Brazil.

Keywords: Genotypes. Genetic markers. PCR-RFLP. Toxoplasmosis canine.

## LISTA DE FIGURAS

- 01.** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* .....05
- 02.** 1) Taquizoítos; 2) Bradizoítos (em cisto tecidual); 3) Oocisto não esporulado (A); oocisto esporulado com dois esporocistos, e com quatro esporozoítos indicados pelas setas (B) .....06
- 03.** Eletroforese em gel a 2% da PCR, com primers tox4 e tox5 utilizada para diagnóstico do DNA do *Toxoplasma gondii*. Marcador molecular (**M**); controle positivo com 529pb (**CP**); controle negativo (**CN**); e amostras negativas (cérebro do cão 16), linhas **1-5** .....34
- 04.** Eletroforese em gel da *nested*-PCR (*nPCR*) das amostras dos cães com marcador c22-8. Na seguinte ordem: marcador molecular (**M**), controle positivo (**CP**), controle negativo (**CN**) e amostras de cão (**6, 13, 17 e 21**) .....34
- 05.** Fragmentos de restrição para o **locus SAG1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas Sau96I e HaeIII dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo I .....55
- 06.** Fragmentos de restrição para o **locus SAG2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HinfI e TaqI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo II; **setas vermelhas**, fragmentos de alelo característico de alelo tipo III .....55
- 07.** Fragmentos de restrição para o **locus SAG3** de *Toxoplasma gondii* após digestão com a enzima NciI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo III .....56
- 08.** Fragmentos de restrição para o **locus BTUB** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsiEI e TaqI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados

TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis** fragmentos característicos de alelo tipo I, **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo II .....56

**09.** Fragmentos de restrição para o **locus c22-8** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsmAI e MbolI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo atípico .....57

**10.** Fragmentos de restrição para o **locus c29-2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HpyCH4IV e RsaI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo II .....57

**11.** Fragmentos de restrição para o **locus GRA6** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas MseI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo III .....58

**12.** Fragmentos de restrição para o **locus APICO** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas AflII e DdeI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo I .....58

**13.** Fragmentos de restrição para o **locus L358** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas MseI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo III .....59

**14.** Fragmentos de restrição para o **locus PK1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas Aval e RsaI, porém não houve digestão do controle positivo e dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I, II e III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21.....59

**LISTA DE TABELAS**

<b>01.</b> Pesquisas de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em cães no Brasil.....	11
<b>02.</b> Enzimas de restrição utilizadas para cada marcador genético de <i>T. gondii</i> na PCR-RFLP.....	30
<b>03.</b> Isolados de <i>Toxoplasma gondii</i> por ensaio biológico em camundongos inoculados com órgãos de cães naturalmente infectados de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil.....	32
<b>04.</b> Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de caninos naturalmente infectados por PCR associado ao ensaio biológico .....	33
<b>05.</b> Genotipagem dos isolados de <i>T. gondii</i> dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil, utilizando a RFLP.....	36

**LISTA DE QUADROS**

- 01.** Produtos utilizados na reação de PCR para cada amostra tecidual dos camundongos .....26
- 02.** Programação do termociclador para a reação da PCR das amostras teciduais dos camundongos .....26
- 03.** Produtos utilizados em cada amostra para PCR da reação primária e da *n*PCR da reação secundária .....28
- 04.** Programação do termociclador para Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e da *nested*-PCR (*n*PCR) das amostras destinadas à caracterização genética.....28
- 05.** Reagentes utilizados para digestão enzimática nos produtos da *n*PCR de cada amostra positiva para presença de DNA do *T. gondii*.....29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Por cento	<b>mL</b>	Mililitro
<b>°C</b>	Graus Celsius	<b>mM</b>	Milimolar
<b>µg</b>	Micrograma	<b>Ng</b>	Nanograma
<b>µL</b>	Microlitro	<b>nPCR</b>	<i>nested</i> PCR
<b>µM</b>	Micromolar	<b>pb</b>	Pares de base
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina	<b>PBS</b>	Solução salina tamponada
<b>CCZ</b>	Centro de controle de Zoonoses	<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico	<b>pH</b>	Concentração de hidrogênio iônico
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados	<b>RFLP</b>	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
<b>et al.</b>	e colaboradores	<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>g</b>	Força da gravidade	<b>TE</b>	Tampão tris-EDTA
<b>g</b>	Gramma	<b>Tris-</b>	(hidroximetil)aminometano
		<b>HCL</b>	hidroclorídrico
<b>mg</b>	Miligramas	<b>UI</b>	Unidade Internacional
<b>Mgcl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio		

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	3
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
<b>3.1 <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	4
<b>3.2 Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	6
3.2.1 Ciclo Extra-intestinal .....	7
3.2.2 Ciclo Intestinal .....	7
<b>3.3 Fontes de infecção de <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	8
<b>3.4 <i>Toxoplasma gondii</i> em cães</b> .....	9
<b>3.5 Biologia molecular de <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
<b>4.1 Coleta das amostras sanguíneas dos cães</b> .....	21
<b>4.2 Sorologia</b> .....	21
<b>4.3 Obtenção das amostras teciduais dos cães</b> .....	22
<b>4.4 Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos</b> .....	22
4.4.1 Digestão péptica .....	22
4.4.2 Bioensaio em camundongos .....	23
4.4.3 Observação dos camundongos .....	23
<b>4.5 Análise molecular de <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	24
4.5.1 Diagnóstico molecular de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	24
4.5.1.1 Extração de DNA das amostras teciduais de camundongos infectados .....	24
4.5.1.2 Quantificação de DNA .....	25
4.5.1.3 Detecção de <i>Toxoplasma gondii</i> pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) .....	25
4.5.2 Caracterização genética de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	27
4.5.2.1 PCR-RFLP.....	27

<b>5. RESULTADOS</b> .....	31
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>ANEXO</b> .....	55



## 1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, capaz de infectar animais homeotérmicos, incluindo cães e o homem.

Esta doença possui ampla distribuição mundial com importante implicação na saúde pública, causando graves sequelas em crianças congenitamente acometidas e doença grave em pacientes imunossuprimidos podendo levar ao óbito (DUBEY, 2004; DUBEY et al., 2012a). Apesar de ser assintomática na maioria dos casos, acomete milhares de pessoas todos os anos, e muitas destas podem apresentar sintomatologia, como problemas oculares que perduram por toda a vida (DUBEY et al., 2012a; 2012b).

Os cães apresentam importância epidemiológica por atuarem como sentinelas da infecção toxoplásmica humana, sendo bons indicadores de contaminação ambiental (DA SILVA et al., 2010a; DUBEY et al., 2012a), principalmente em áreas urbanas, onde os cães comem restos alimentares, incluindo lixo, ou recebem carne crua contendo cistos do parasita (SALB et al., 2008; EL BEHAIRY et al., 2013).

A toxoplasmose canina apenas possui importância quando associada a doenças imunossupressoras, como cinomose, sendo, geralmente, assintomática em cães imunocompetentes (FIALHO et al., 2009).

O Brasil possui alta prevalência de infecção pelo *T. gondii* em animais e humanos, onde a soroprevalência dessa infecção varia de 50 a 80% na população adulta (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Na Bahia, resultados sorológicos para o parasita em cães, principalmente provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), apresentam percentuais altos que varia de 36,5% a 63,5% (BARBOSA et al., 2003; CARLOS et al., 2010).

Recentemente a variabilidade genética dos isolados de *T. gondii*, de hospedeiros saudáveis ou doentes tem sido estudada mundialmente. Como também a associação dessa variedade com a virulência do parasita para a gravidade da doença em seres humanos ou animais (DUBEY et al., 2012a).

Através da Reação da Cadeia de Polimerase com Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), conseguiu-se demonstrar diferentes tipos de genótipos do parasita no Brasil e no mundo (PENA et al., 2008; DUBEY; SU, 2009; RAGOZO et al., 2010; DUBEY et al., 2012b).

No Brasil novos genótipos de *Toxoplasma gondii* são continuamente identificados a partir de diferentes espécies animais, incluindo cães, o que sugere diversidade extremamente elevada do parasita na população (RAGOZO et al., 2010). Essa diversidade genética revela presença de uma estrutura populacional atípica ou recombinante do protozoário, onde isolados de *T. gondii* no Brasil são biologicamente e geneticamente diferentes dos isolados na América do Norte, Europa e África, que possuem uma linhagem clonal típica (tipos I, II e III) definida (HOWE; SIBLEY, 1995; LEHMANN et al., 2006; VELMURUGAN et al., 2008).

Além disso, a gravidade das infecções toxoplásmicas no Brasil é maior do que em países com estrutura clonal típica, e isto pode estar associado a cepas atípicas proveniente da freqüente recombinação sexual do *T. gondii* neste país (AJZENBERG et al., 2004; DA SILVA et al., 2010b). Desta forma, acredita-se que genótipos recombinantes possuem forte influência sobre a virulência do parasita, estando ligados a casos graves de toxoplasmose em humanos imunocompetentes (DUBEY et al., 2012a).

A alta contaminação ambiental com oocistos eliminados por felinos de diversas espécies no Brasil, possivelmente resultou em um alto índice de recombinação sexual do parasita nestes mesmos animais, possibilitando freqüente troca genética entre diferentes cepas, o que favoreceu o surgimento de novas cepas recombinantes e atípicas, e conseqüentemente, caracterizou a população do *T. gondii* no país como geneticamente diversificada (DARDÉ, 2008; PENA et al., 2008).

Portanto, a caracterização genética das cepas de *T. gondii* isoladas de diferentes espécies animais tem grande importância, pois permite avaliar a variabilidade genética, evolução e estrutura populacional do parasita em diferentes regiões geográficas, como também verificar se os fatores genéticos influenciam na virulência das cepas, ou seja, se os genótipos do parasita estão associados com o fenótipo da doença humana e animal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Objetivou-se com esta pesquisa isolar e caracterizar geneticamente as cepas de *T. gondii* oriundas de tecidos de cães naturalmente infectados dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar *T. gondii* de tecidos de cães criados nos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia;
- Caracterizar geneticamente as cepas de *T. gondii* isoladas;
- Caracterizar a patogenicidade das cepas isoladas em camundongos albinos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

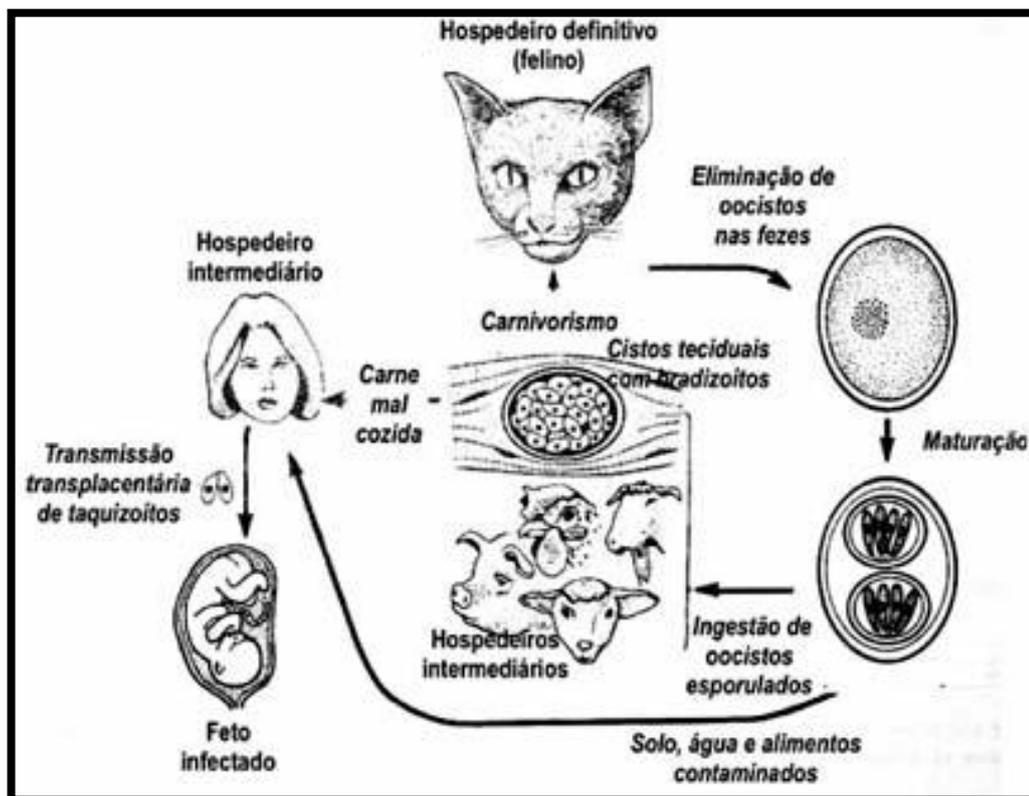
#### 3.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um parasita pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Coccidia, ordem Eucoccidiorida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (FIALHO et al., 2009; MONTEIRO, 2010). Causador de uma protozoonose endêmica mundialmente, conhecida como toxoplasmose. Este parasita é capaz de infectar todos os animais homeotérmicos, incluindo humanos, aves e mamíferos marinhos, além de poder contaminar espécies de vida marinha, como moluscos bivalves (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY et al., 2003a; RIBEIRO, 2013). E apesar de sua ampla distribuição mundial e diversidade de hospedeiros, existe apenas uma espécie do parasita (DUBEY, 2008).

O parasita foi descoberto concomitantemente em 1908, por Charles Nicolle e Louis Manceaux no roedor *Ctenodactylus gundii*, na Tunísia, África, e por Alfonso Splendore em coelho (*Oryctolagus cuniculus*), em São Paulo, no Brasil (DUBEY et al., 2012a; FIALHO et al., 2009). Estes cientistas trabalhavam com *Leishmania*, e por isso, inicialmente o parasita foi identificado erroneamente como *Leishmania* pelos pesquisadores dos dois países (DUBEY, 2009). Porém, Nicolle logo percebeu que tinha descoberto um novo organismo e o nomeou *Toxoplasma gondii* baseado na sua morfologia (*toxos* = arco, *plasma* = forma) e no hospedeiro encontrado, *Ctenodactylus gundii* (roedor), que na época foi descrito incorretamente como *Ctenodactylus gondii* (DUBEY, 2008).

Com relação ao ciclo de vida, *T. gondii* é heteroxeno facultativo, ou seja, seu ciclo pode ser completo no hospedeiro definitivo, compreendendo a fase sexual e assexuada, com formação de oocistos e cistos teciduais, respectivamente, ou ainda, pode haver hospedeiros intermediários, onde ocorre somente a fase assexuada do parasita (MONTEIRO, 2010). Logo, o ciclo do *T. gondii* independe da presença conjunta de hospedeiros definitivos e intermediários para manutenção do seu ciclo, podendo manter-se apenas pela ingestão de cistos teciduais, entre os hospedeiros intermediários, sem presença do hospedeiro definitivo (TENTER, 2009).

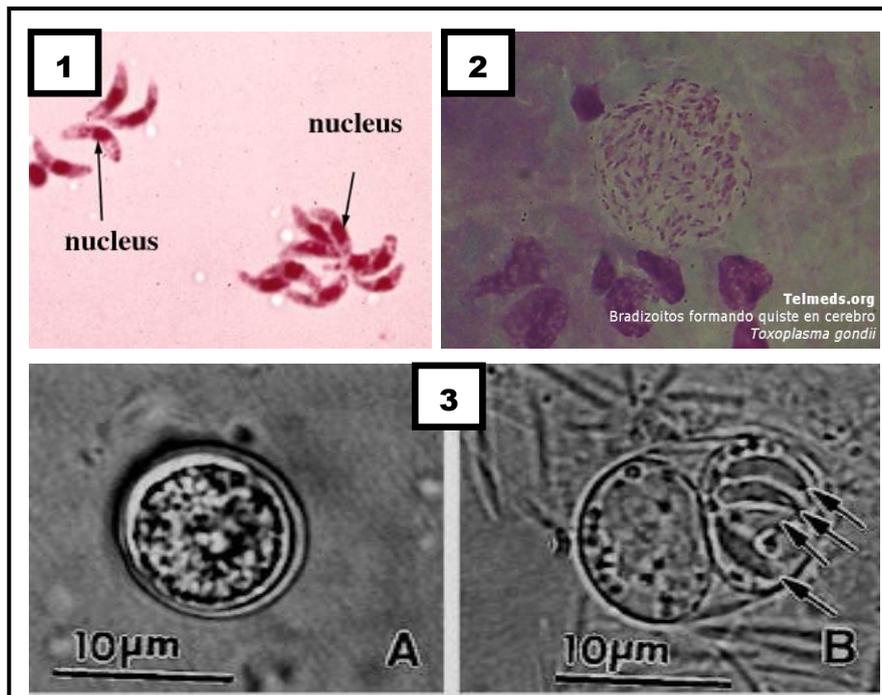
No seu ciclo, felinos, domésticos e selvagens, servem como hospedeiros definitivos, pois somente neles o parasita é capaz de realizar a gametogonia, ou seja, sua fase sexuada, e conseqüentemente excretar oocistos no ambiente, através das fezes destes animais (DUBEY; JONES, 2008), e os demais animais homeotérmicos servem como hospedeiros intermediários (Figura 1) (DUBEY, 2004).



Fonte: [www.universovisual.com.br](http://www.universovisual.com.br)

**Figura 01.** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

Este parasita possui três estágios infectantes, tanto para hospedeiros definitivos como hospedeiros intermediários, são os taquizoítos (individualmente ou em grupos), bradizoítos (em cistos teciduais) e esporozoítos (em oocistos esporulados) (Figura 2) (DUBEY, 2004).



Fonte: [www.telmeds.org](http://www.telmeds.org); [www.fpslivroaberto.blogspot.com.br](http://www.fpslivroaberto.blogspot.com.br)

**Figura 02.** 1) Taquizoítos; 2) Bradizoítos (em cisto tecidual); 3) oocisto não esporulado (A), oocisto esporulado com dois esporocistos e com quatro esporozoítos indicados pelas setas (B).

### 3.2 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Durante seu ciclo de vida o parasita pode seguir dois destinos diferentes, a depender do hospedeiro infectado, caso seja um hospedeiro intermediário irá seguir o ciclo extra-intestinal com apenas formação de cistos teciduais, e se hospedeiro definitivo poderá seguir tanto o ciclo extra-intestinal, como o ciclo intestinal formando oocistos.

### 3.2.1 Ciclo Extra-Intestinal

Após ingestão de cistos teciduais ou oocistos esporulados por qualquer hospedeiro (definitivo e intermediário), as formas infectantes (bradizoítos e/ou esporozoítos) são liberadas no intestino delgado, após rompimento da parede do cisto tecidual ou oocisto por enzimas proteolíticas do estômago e intestino, e invadem os enterócitos do hospedeiro dando origem aos taquizoítos (DUBEY, 2009). Estes se disseminam pela corrente sanguínea ou linfática e invadem diferentes células do hospedeiro, onde ficam envoltas pelo vacúolo parasitóforo, e então se multiplicam assexuadamente por endodiogenia repetidamente até rompê-las e penetrar em novas células, caracterizando a fase aguda da doença (JONES; DUBEY, 2010; MONTEIRO, 2010; SIBLEY et al., 2009). Após sucessivas multiplicações, os taquizoítos diminuem seu metabolismo e passam a ser chamados bradizoítos, formando parede cística, e originando os cistos teciduais, que se desenvolvem em órgãos viscerais e nos tecidos musculares e neurais, como cérebro, olho e músculo cardíaco, onde são mais prevalentes, e podem perdurar intactos nestas células durante toda a vida do hospedeiro (MONTEIRO, 2010; DUBEY, 2004; DUBEY; BEATTIE, 1988). Os taquizoítos são capazes de infectar e replicar em qualquer célula nucleada (DUBEY; FRENKEL, 1972; DUBEY, 2004).

### 3.2.2 Ciclo Intestinal

Felinos podem eliminar oocistos após infecção com qualquer estágio infectante do parasita (taquizoítos, bradizoítos e/ou esporozoítos) (DUBEY, 2004; TENTER, 2009). Bradizoítos presentes nos enterócitos dos felídeos desenvolvem cinco tipos de gerações de *T. gondii* (A-E) antes de iniciar o ciclo sexual (DUBEY; BEATTIE, 1988). Após dois a cinco dias de infecção, parasitas dos tipos D e E (esquizontes) multiplicam-se por esquizogonia, liberando merozoítos que, provavelmente, iniciam a formação de gametas, macrogametócito (gameta feminino) e microgametócito (gameta masculino) (DUBEY; BEATTIE, 1988; DUBEY; FRENKEL, 1972; JONES; DUBEY, 2010). O gameta masculino sofre divisões

celulares, produzindo microgametas biflagelados que fertilizam o macrogameta feminino, resultando na formação do zigoto, que desenvolve cápsula cística, com subsequente liberação de oocistos no lúmen intestinal e excreção junto às fezes dos felinos (DUBEY; FRENKEL, 1972). A formação de gametas é mais freqüente no íleo, apesar de poder ocorrer em qualquer região do intestino de felinos (DUBEY; BEATTIE, 1988).

Os oocistos eliminados tornam-se infectantes, após sofrerem esporulação no ambiente entre um a cinco dias, a depender das condições de umidade, temperatura e oxigenação (DUBEY; BEATTIE, 1988). Tais condições no solo úmido também favorecem a sobrevivência destes oocistos por longos períodos, que pode durar até 18 meses (DUBEY, 2004). O oocisto esporulado contém dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um (Figura 2) (DUBEY, 2004).

Os felídeos têm um importante papel na manutenção do parasita, pois apenas eles podem eliminar milhões de oocistos no ambiente após infecção, o que favorece a perpetuação do parasita, além de infecção de outros animais e contaminação de águas e alimentos no ambiente (DUBEY, 2009).

### **3.3 Fontes de infecção de *Toxoplasma gondii***

O homem e os animais, comumente, podem se infectar pela ingestão acidental de oocistos esporulados provenientes de água, alimentos ou solo contaminados; pela ingestão de cistos em tecidos de outros hospedeiros infectados (carnivorismo); ou congenitamente com taquizoítos por via transplacentária (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; DA SILVA et al., 2010b; DUBEY, 2004). O parasita também pode ser transmitido, porém com pouca importância epidemiológica, pela transfusão sanguínea, transplante de órgãos, ou pela ingestão de leite de cabra não pasteurizado (DUBEY; JONES, 2008; JONES et al., 2009).

Dentre as vias de infecção mencionadas, não se sabe qual delas é epidemiologicamente mais importante para uma população, pois as fontes de infecção variam em função de hábitos culturais e alimentares diferentes entre as diversas regiões do planeta (DA SILVA et al., 2010b; TENTER et al., 2000). Porém acredita-se que a transmissão do parasita para humanos e animais seja causada

principalmente pela ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida, ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados excretado no ambiente por felinos infectados ou diretamente das fezes felinas (DUBEY et al., 2008; TENTER, 2009).

No Brasil, relatos de toxoplasmose em humanos estão associados, principalmente, ao consumo de carne crua ou mal cozida e ingestão de oocisto em água ou alimentos contaminados (DUBEY et al., 2012a).

### **3.4 *Toxoplasma gondii* em cães**

Na espécie canina a primeira descrição da presença de *T. gondii* ocorreu na Itália no ano de 1910, descrita por Mello, em um cão doméstico de 04 meses de idade, que foi a óbito por toxoplasmose visceral aguda (DUBEY, 2008). No Brasil, foi descrita em cães, no ano de 1911, por Carini (VIDOTTO, 1992).

A toxoplasmose canina, como em outras espécies animais, é assintomática na maioria dos casos, tendo importância nos cães quando associada a enfermidades imunossupressoras, como por exemplo, cinomose, agravando a severidade dos sinais clínicos, especialmente os neurológicos (BRITO et al., 2002; DUBEY; JONES, 2008; MORETTI et al., 2006). Também em cães imunocomprometidos, com alterações fisiológicas imunossupressoras, como a prenhez em cadelas, onde a doença causa aborto, morte fetal e parto prematuro (BRESCIANI et al., 2001), e em filhotes afetados pela infecção congênita (MINEO et al., 2004).

No entanto, quando presente a sintomatologia clínica da doença em cães, esta afeta os sistemas neuromuscular, respiratório e gastrointestinal (FIALHO et al., 2009), provocando principalmente pneumonia, hepatite e encefalite (DUBEY; LAPPIN, 2006), e ocasionando também, sintomas inespecíficos nestes animais, como anorexia, diarréia intermitente, hipertermia, letargia e linfadenopatia (DOMINGUES et al., 1998; HIGA et al., 2000).

Bresciani et al. (2001) observaram sintomas inespecíficos como alterações respiratórias, secreção nasal e ocular, e linfadenopatia em cadelas gestantes inoculadas experimentalmente. Aumento do volume dos linfonodos submandibulares

e alterações oftalmológicas foram identificados na maioria dos cães jovens inoculados experimentalmente com diferentes cepas do parasita (ABREU et al., 2002).

As lesões oculares em cães são caracterizadas por ceratoconjuntivite, episclerite, esclerite, retinite, coroidite, uveíte anterior, neurite ótica, hiperplasia de epitélio ciliar e poliomiosite (DAVIDSON, 2000; DUBEY et al., 2003b; DUBEY, 1985; DUBEY; LAPPIN, 2006; MANDELL; HOLT, 2005; SWINGER et al., 2009; TOWNSEND, 2008). A aparência da fundoscopia são lesões cinza enegrecidas na área tapetal e infiltrado branco algodinoso na área não-tapetal (DAVIDSON, 2000).

Dentre as alterações neurológicas provocadas pela doença, observadas em cães, estão ataxia, andar em círculos, mioclonia, paralisia de membros, alterações de musculatura cervical, alterações de comportamento, tremores e convulsões (DUBEY; LAPPIN, 2006; HIGA et al., 2000; MORETTI et al., 2006).

Esta variedade na patogenicidade da doença pode ser determinada por muitos fatores, incluindo a virulência da cepa do parasito, volume do inóculo, o estágio do parasito (oocistos ou taquizoítos), além da imunidade individual do hospedeiro (DUBEY, 2004).

Resultados sorológicos para *T. gondii* foram amplamente relatados (Tabela 1) em cães no Brasil (DUBEY et al., 2012a), sendo os percentuais considerados altos, chegando a 91% (FIALHO et al., 2009), a depender da população em estudo, demonstrando que esta espécie possui uma alta suscetibilidade à infecção pelo parasito (GUIMARÃES et al., 1992).

Em alguns estudos, além da prevalência sorológica, foram avaliados também possíveis fatores de risco associados à infecção pelo *T. gondii* (DANTAS et al., 2013; DA SILVA et al., 2010a; MOURA et al., 2009). Como por exemplo, raça, idade, sexo, tipo de dieta, ambiente, presença de gatos e acesso à rua e /ou a água não tratada.

**Tabela 01.** Pesquisas de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães no Brasil.

Referência	Estado	Método sorológico <sup>1</sup>	Nº de cães avaliados	% de cães positivos	Origem dos animais
Ishizuka et al. (1974)	SP	RIFI SF	80	94%	Hospital Veterinário da USP <sup>2</sup>
Germano et al. (1985)	SP	RIFI	657	91%	Campanha de vacinação antirrábica
Barbosa et al. (2003)	BA	RIFI	225	63,55%	Errante
Cañón-Franco et al. (2003)	RO	RIFI	157	76,4%	Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil
Mineo et al. (2004)	MG	ELISA	369	30,3%	Hospital Veterinário da UFU <sup>3</sup> ; CVP <sup>4</sup> ; Errante
Guimarães et al. (2009)	MG	RIFI	218	60,7%	Domiciliado (CVP)
Moura et al. (2009)	SC	RIFI	400	22,3%	Domiciliado
Carlos et al. (2010)	BA	HAI	529	36,5%	Domiciliado; Errante

<sup>1</sup> **Método Sorológico:** RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; SF: Sabin-Feldman; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; HAI: Hemaglutinação Indireta; MAD: Aglutinação Direta.

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo - USP.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Uberlândia – UFU

<sup>4</sup> CVP= Clínica veterinária particular

**Tabela 01.** Pesquisas de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães no Brasil (continuação).

Referência	Estado	Método sorológico <sup>1</sup>	Nº de cães avaliados	% de cães positivos	Origem dos animais
Da Silva et al. (2010a)	SP	RIFI	205	25,4%	Domiciliado
Coiro et al. (2011)	SP	RIFI	302	20,8%	Domiciliado; e Peridomiciliado
Araújo et al. (2011)	PR	MAD	42	54,8%	Campanha de vacinação antirrábica
Lopes et al. (2011)	PI	RIFI	530	18%	Hospital Veterinário da UFPI <sup>5</sup>
Zulpo et al. (2012)	PR	RIFI	112	50,89%	Hospital Veterinário UEL <sup>6</sup>
Dantas et al. (2013)	RN	RIFI	476	11,5%	CVP <sup>7</sup>
Dreer et al. (2013)	PR	RIFI	175	70,85%	Errante
Langoni et al. (2013)	SP	RIFI	342	26,9%	Campanha de posse responsável

<sup>1</sup> **Método Sorológico:** RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; SF: Sabin-Feldman; ELISA: Ensaio Imunoenzimático; HAI: Hemaglutinação Indireta; MAD: Aglutinação Direta.

<sup>5</sup> Universidade Federal do Piauí – PI

<sup>6</sup> Universidade Estadual de Londrina - UEL

<sup>7</sup> CVP= Clínica veterinária particular

Na avaliação de alguns fatores de risco associados à infecção pelo parasita, Azevedo et al. (2005) verificaram correlação da infecção com a presença de gatos na residência.

Alguns autores observaram que animais errantes capturados pelos CCZ, de áreas rurais ou que simplesmente tem acesso à rua, têm maior chance de se

infectar com o parasita do que animais domiciliados, devido à maior chance de exposição ao parasita no ambiente contaminado (DANTAS et al., 2013; DA SILVA et al., 2010a; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004; CARLOS et al., 2010; MINEO et al., 2004; MOURA et al., 2009).

Além disso, a idade dos cães muitas vezes tem se mostrado um fator de risco importante, pois quanto mais velhos, maior a chance de exposição ao parasita (BARBOSA et al., 2003; CAÑÓN-FRANCO et al., 2004; CARLOS et al., 2010; DANTAS et al., 2013; LANGONI et al., 2013; LOPES et al., 2011; MOURA et al., 2009; TENTER, 2009;), em função de maior número de contato com as formas infectantes do parasita, no ambiente e em fontes alimentares diversas (YAN et al., 2012).

Isto demonstra que soroprevalência alta é encontrada principalmente em cães idosos, habituados a comer carne crua ou mal cozida, e em cães errantes ou de vida livre que vivem em ambiente rural (BRITO et al., 2002; BRESCIANI et al., 2007; YAN et al., 2012). Esta alta soroprevalência em cães errantes ou de meio rural indica ampla distribuição do *T. gondii* no ambiente, demonstrando que os oocistos do parasita são uma importante fonte de infecção para seres humanos e outros animais em áreas urbanas e rurais, com presença de felídeos em geral (ETHEREDGE et al., 2004; YAN et al., 2012).

Os caninos possuem alta suscetibilidade para esta zoonose e estão expostos as mesmas fontes de infecção que humanos e outros animais (DA SILVA et al., 2010a; YAN et al., 2012). Desta forma, os cães atuam como sentinelas da infecção toxoplásmica humana, sendo bons indicadores de contaminação ambiental (DA SILVA et al., 2010a; DUBEY et al., 2012a), principalmente em áreas urbanas, onde os cães comem restos alimentares, incluindo lixo, ou ingerem carne crua contendo cistos do parasita (SALB et al., 2008; EL BEHAIRY et al., 2013).

Contudo, cães vadios ou de vida livre são considerados como os melhores indicadores do parasita no ambiente urbano, pois estes costumam circular livremente no ambiente, sendo mais expostos às fontes de infecção do parasita (DA SILVA et al., 2010a; YAN et al., 2012).

Do ponto de vista da saúde pública, estes animais desempenham papel secundário na transmissão de *T. gondii* para humanos, podendo atuar como vetores mecânico por xenosmofilia (LINDSAY et al., 1997; SCHARES et al., 2005), devido ao hábito de rolar no chão e até mesmo em cima de fezes de gatos, contaminando

os pêlos com oocistos esporulados e podendo transmiti-los para pessoas, principalmente crianças (ETHEREDGE et al., 2004; FRENKEL; PARKER, 1996). Além disso, estes animais podem também transmitir oocistos mecanicamente através das fezes, devido à ingestão acidental de oocistos esporulados provenientes do ambiente e de fontes contaminadas, ou ainda pelo hábito de coprofagia, representando risco potencial para infecção humana (LINDSAY et al., 1997), uma vez que oocistos esporulados do parasito podem atravessar o trato gastrointestinal desses animais e serem excretados nas fezes dos mesmos na sua forma infecciosa (LINDSAY et al., 1997; SCHARES et al., 2005).

### **3.5 Biologia molecular de *Toxoplasma gondii***

A caracterização genética dos isolados de *T. gondii*, de hospedeiros saudáveis ou doentes, vem sendo estudada mundialmente (DUBEY; JONES, 2008). Com o intuito de avaliar a associação dos genótipos com a virulência do parasito e à gravidade da doença em seres humanos ou animais (DUBEY et al., 2012a), como também realizar o estudo filogenético do parasita em diferentes regiões do mundo (DA SILVA et al., 2010b).

Para tanto, muitas técnicas moleculares têm sido utilizadas para estudar a diversidade genética de cepas do *T. gondii* (SHWAB et al., 2014). Dentre estas, o Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização genotípica em isolados obtidos de animais e humanos (SU et al., 2006).

A técnica PCR-RFLP consiste no uso de enzimas de restrição (endonucleases de digestão) capazes de clivar a molécula de DNA (amplificada pela PCR) do parasita, ao reconhecerem uma sequência específica de quatro, seis ou oito pares de bases, onde posteriormente, as regiões clivadas são visualizadas como fragmentos ou bandas pela eletroferese em gel de agarose (SU et al., 2006; BORGES, 2012; ZUKUROV, 2012). Tal técnica permite ainda que o perfil de restrição de um determinado gene possa ser comparado com o perfil do gene de outras cepas (BORGES, 2012; ZUKUROV, 2012).

Com os métodos de caracterização molecular, foi possível identificar linhagens distintas dentro da espécie *T. gondii* (DUBEY et al., 2012a). Com isso, Howe e Sibley (1995) classificaram *T. gondii* em três linhagens genéticas distintas (tipos I, II e III), utilizando a PCR-RFLP em isolados da América do Norte e Europa, analisando somente um ou dois *loci*, principalmente o gene SAG2 (AJZENBERG et al., 2002; DARDÉ, 2004).

Essa estrutura populacional predominantemente clonal do parasita possivelmente esta relacionada com a disseminação do parasita na natureza apenas pela ingestão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários, sem necessitar da fase sexuada nos hospedeiros definitivos (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; KHAN et al., 2005; 2006; 2011). Alguns autores sugerem também, que o aspecto clonal das linhagens de *T. gondii* nestas regiões, pode ter sido favorecido pela criação intensiva de animais domésticos para produção de carne, somado a domesticação do gato (AJZENBERG et al., 2004; LEHMANN et al., 2006).

Recentemente, estudos de genotipagem do parasita tem utilizado diversos marcadores (SAG1, 5'+3'SAG2, SAG3, SAG2 novo, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, APICO e CS3) capazes de avaliar diferentes *loci* gênicos no DNA do parasita, e conseqüentemente revelar a diversidade do parasita (SHWAB et al., 2014). Pois, segundo Dardé (2004) e Delhaes et al. (2010) a tipagem genética com análise de múltiplos *loci* é necessária para avaliar a real diversidade da população de *T. gondii*.

Como existem várias enzimas para marcadores genéticos, sendo uma para cada conjunto de bases nucleotídeas diferentes, a caracterização genética baseada em um ou dois *loci* impossibilita a identificação de cepas recombinantes e alelos atípicos, que possuem alelos incomuns em diferentes locus (FERREIRA et al., 2006; DA SILVA et al., 2010b). Portanto, para uma melhor avaliação genotípica do parasita, faz-se necessário a utilização de diferentes marcadores moleculares capazes de indicar um maior grau de polimorfismo, ou seja, detectar mutações no genoma do parasito, e conseqüentemente identificar cepas atípicas ou recombinantes (PENA et al., 2008; SU et al., 2006). Com isso, a genotipagem em um ou dois *loci*, além de limitar a identificação de linhagens atípicas do parasita, possibilita apenas identificação de linhagens clonais (I, II e III) (KHAN et al., 2005; SIBLEY et al., 2009). Por isso, que estudos filogenéticos do parasita baseado em apenas um *loci*, como SAG2, em regiões com presença endêmica de cepas

recombinantes, devem ser reconsiderados (DA SILVA et al., 2010b; SUL et al., 2006).

A análise da PCR-RFLP com 10 marcadores em mais de 1000 isolados de *T. gondii* em todo o mundo permitiu revelar a diversidade genética do parasita. Apesar, dos marcadores serem desenvolvidos com base em sequências de DNA de linhagens clonais (tipos I, II e III), eles são capazes de revelar alelos não clonais (denominados u-1, L-2) (SHWAB et al., 2014; SU et al., 2006).

A estrutura populacional com três linhagens clonais distintas (tipo I, II e III) é predominante apenas na Europa, América do Norte (AJZENBERG et al., 2002; HOWE; SIBLEY, 1995) e na África (RAJENDRAN et al., 2012; VELMURUGAN et al., 2008). Onde o genótipo do tipo II foi associado à maioria das infecções humanas, com exceção das formas congênitas e oculares que estão associadas aos genótipos do tipo I ou recombinantes. E cepas do tipo II e III foram freqüentemente encontradas nos isolados de animais, independente da condição clínica (DELHAES et al., 2010; DUBEY et al., 2012b; DUBEY; SU, 2009; FUENTES et al., 2001; KHAN et al., 2006; SIBLEY et al., 2009). Como por exemplo, na França, vários estudos de genotipagem em isolados de *T. gondii*, provenientes de animais e humanos, observaram que a grande maioria (90%) dos isolados são do tipo II (DELHAES et al., 2010).

Entretanto, genótipos dos isolados de humanos e animais provenientes de alguns países da América do Sul, como Brasil e Colômbia, são geneticamente mais diversificados, sendo denominados de isolados atípicos ou recombinantes, que apresentam combinações de alelos das linhagens I, II e III, e alelos ausentes em outras regiões do mundo (AJZENBERG et al., 2004; CAÑÓN-FRANCO et al., 2014; DUBEY; SU, 2009; FERREIRA et al., 2006; LEHMANN et al., 2006), o que difere da estrutura clonal distinta descrita anteriormente por pesquisadores em outros países. Ainda, segundo Dubremetz e Lebrun (2012), muitas cepas brasileiras mostraram possuir genótipos recombinantes, com alelos da linhagem clonal (tipo I, II e III) em quase todos *loci* avaliados.

Acredita-se que essa estrutura populacional atípica com elevada variedade genética na América do Sul, possivelmente esteja relacionada ao alto índice de recombinação sexual do parasito nessa região (PENA et al., 2008), em função do ciclo florestal envolvendo felinos selvagens e suas presas, favorecendo a reprodução sexuada do parasita (DELHAES et al., 2010). Logo, oocisto pode ser a

principal fonte de infecção do *T. gondii* no Brasil, implicando em maior frequência da fase sexuada do parasita nos felinos presentes na fauna brasileira (FERREIRA et al., 2006).

Pena et al. (2008) em estudo genético de isolados de galinhas, cães e gatos do Brasil, identificaram genótipos semelhantes que foram classificados como linhagens clonais comuns neste país, designados como tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV.

No estado de São Paulo, em Botucatu, isolados de cães com sintomatologia neurológica e sorologicamente positivos para toxoplasmose, foram caracterizados como tipos I e III, sendo o primeiro isolamento realizado a partir de cães naturalmente infectados no Brasil (SILVA et al., 2005). Ainda no estado de São Paulo, em cães provenientes do CCZ, houve caracterização genética de 19 isolados com 10 marcadores, e foram identificados 12 genótipos, o tipo clonal III e outros 11 genótipos recombinantes (DUBEY et al., 2007a). Posteriormente, Pena et al. (2008) observaram que 04 destes genótipos recombinantes identificados por Dubey et al. (2007a) pertenciam a linhagem clonal brasileira tipo BrII e tipo BrIII.

Em Minas Gerais, Brasil, foi observado similaridade entre os genótipos circulantes em humanos e animais. Onde dos 24 isolados de cães, galinhas e humanos, analisados com 11 marcadores genéticos, obteve-se 12 genótipos, sendo 04 genótipos novos e 08 genótipos previamente identificados de animais domésticos (cães, gatos e galinhas) em outras regiões brasileiras (SILVA et al., 2014). Neste estudo os genótipos circulantes em cães foram BrII, BrIII, #108 e 02 novos genótipos (SILVA et al., 2014).

Ainda, Carneiro et al. (2013) ao avaliar 26 isolados de crianças infectadas congenitamente, obteve 16 genótipos, dentre estes, 07 genótipos foram anteriormente relatados em animais no Brasil, também pertencentes à linhagem clonal brasileira tipo BrII e BrIII, os quais já foram relatados em isolados de animais domésticos, como cães (PENA et al., 2008).

Langoni et al. (2012) avaliando a presença de *T. gondii* em cães com distúrbios neurológicos, identificaram 03 genótipos diferentes, sendo 01 genótipo único e 02 anteriormente relatados (BrI e P89).

A caracterização genética dos isolados de *T. gondii* de cães em outros países, identificaram tanto linhagens clonais como cepas diversificadas. Como em Gizé, no Egito, onde os 22 isolados obtidos de 43 cães errantes soropositivos

revelaram 03 genótipos, pertencentes às linhagens clonais II e III, e uma infecção mista, indicando diversidade limitada na África (EL BEHAIRY et al., 2013).

Em Granada, Estados Unidos, estudos de genotipagem de 12 isolados de cães identificaram 06 genótipos incluindo tipos II, III, II variante e outros 03 genótipos, revelando possibilidade de alta diversidade do parasita nesta região (DUBEY et al., 2013).

Dubey et al. (2007b) avaliando 08 isolados de cães no Vietnã com 10 marcadores genéticos, identificaram 02 genótipos, que já haviam sido identificados em isolados de cães da Colômbia na América do Sul.

Isolados ou cepas de *T. gondii* em diferentes espécies animais variam quanto a sua virulência e patogenicidade (DIAS; FREIRE, 2005), sendo esta virulência dos isolados, diferenciada e classificada através da morbidade e mortalidade em camundongos albinos (DUBEY, et al., 2011; DUBEY et al., 2012b; RAGOZO et al., 2010). No entanto, a diferenciação em camundongos, necessariamente, não reflete a virulência em outros hospedeiros, porém é aplicada como modelo para caracterizar isolados do parasito sob este aspecto (DIAS; FREIRE, 2005).

Antes do desenvolvimento de marcadores genéticos, isolados de *T. gondii* eram agrupados por virulência em camundongos albinos (DUBEY et al., 2012a). Um novo marcador genético adicional, CS3, capaz de localizar o cromossomo VIIa que está ligado à virulência do parasito, vem sendo usado para determinar à virulência em camundongos (PENA et al., 2008; RAGOZO et al., 2010).

Em função disso, passaram a associar a virulência em camundongos ao tipo genético da cepa (DUBEY et al., 2012a). Classificando os genótipos do tipo II e III, como cepas que levam à infecção crônica e produção de cistos teciduais em camundongos, e cepas do tipo I como extremamente virulentas para camundongos, causando parasitemia, o que pode aumentar o risco de transmissão transplacentária com severa infecção nos fetos (DA SILVA et al., 2010b).

No Brasil, as análises de virulência em camundongos indicaram que a cepa tipo BrI é altamente virulenta, a tipo BrIII é não virulenta e os tipos BrII e BrIV são mediamente virulentas (PENA et al., 2008).

Além disso, suspeita-se que genótipos recombinantes ou com alelos atípicos, como os encontrados no Brasil, possuam forte influência sobre a virulência, ou seja, capacidade de provocar doença grave (DARDÉ, 2008; DA SILVA et al., 2010b). Acreditando-se que essa variedade genotípica esteja relacionada com a gravidade

da toxoplasmose congênita ou com sintomatologia da doença em pessoas imunocompetentes (DELHAES et al., 2010; DUBEY et al., 2012a; CARNEIRO et al., 2013;).

Dubey et al. (2012a) relata que cepas atípicas ou recombinantes do Brasil são mais virulentas que as cepas da Europa e EUA, sendo a virulência das cepas atípicas mais evidentes em pessoas imunocompetentes, onde genótipos recombinantes estão associados à alta ocorrência de toxoplasmose ocular em pessoas com este perfil imunológico no Brasil (DARDÉ, 2008; DUBEY et al., 2012a; KHAN et al., 2006). Alguns estudos também demonstram que a toxoplasmose congênita com cepas atípicas, possui sinais clínicos mais graves (DELHAES et al., 2010; CARNEIRO et al., 2013).

Ferreira et al. (2006) sugere que a diversidade de alelos em vários *loci*, influência na diversidade fenotípica observada na virulência de cepas recombinantes do parasita, principalmente com a quantidade de alelos tipo I e atípicos presentes nestes *loci*. Já que genótipos tipo I são considerados altamente virulentos para camundongos (DARDÉ, 2008).

A virulência em camundongos depende de diversos fatores como, a fase do parasita, via de inoculação, dose administrada, tipos de camundongos utilizados e a estirpe (cepa) do parasita (DUBEY et al., 2004; JONES; DUBEY, 2010).

A inoculação intraperitoneal em camundongos durante bioensaio é necessária para avaliar a virulência do isolado e associá-la com supostos genótipos, pois genótipos recombinantes ou atípicos não possuem virulência definida como os da linhagem clonal (DARDÉ, 2008).

A influência do genótipo do parasita sobre a severidade da doença no homem está associada com as diferenças de virulência das cepas em experimentos animais realizados em todo o mundo (DA SILVA et al., 2010b).

Sendo assim, a virulência do parasita é principalmente definida com base na mortalidade de camundongos infectados em até quatro semanas de infecção, sendo classificada em virulenta, mediamente virulenta e não virulenta. Para isto, cepas são consideradas virulentas quando há 100% de mortalidade dos camundongos infectados em quatro semanas, mediamente virulenta quando mortalidade maior que 30% e menor que 100% em camundongos infectados, e não virulenta quando mortalidade inferior ou igual a 30% (PENA et al., 2008).

Os resultados da genotipagem no Brasil sugerem que *T. gondii* possui uma estrutura no país, onde a frequente troca genética entre membros das cepas de linhagens clonais, gerou uma variedade de linhagens recombinantes e atípicas que se expandem em diversas áreas geográficas (PENA et al., 2008).

Logo, a caracterização genética dos isolados de *T. gondii*, além de fornecer informações sobre a variabilidade genética do parasita, também permite averiguar os tipos de genótipos circulantes em diversos hospedeiros, como também correlacionar estes genótipos com a severidade da doença em camundongos albinos (DARDÉ, 2008; KHAN et al., 2006; SU et al., 2006).

Além disso, a melhoria da técnica de genotipagem com uso de vários marcadores revelou que o genoma do parasita possui uma maior complexidade não apenas na América do Sul, mas também na América do Norte, principalmente em isolados de animais selvagens (RAJENDRAN et al., 2012; SHWAB et al., 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente metodologia foi realizada conforme os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Ética e Bem Estar Animal, com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais, da Universidade Federal da Bahia (protocolo nº 016/2011).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Parasitologia e de Genética do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA.

### 4.1 Coleta das amostras sanguíneas dos cães

Os cães foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) dos municípios de Ilhéus e Itabuna, no estado da Bahia. A coleta de sangue ocorreu durante a eutanásia destes animais. Foram utilizados cães que foram eutanasiados pelo CCZ, não havendo eutanásia específica para o experimento.

Foram colhidas amostras de sangue de 22 cães mediante punção da veia jugular, cefálica ou safena, ou pela via intracardíaca, utilizando-se agulhas descartáveis e tubo a vácuo, sem anticoagulante.

Para obtenção dos soros, os tubos foram centrifugados a  $1465g$  por 10 minutos a  $25^{\circ}C$ . E posteriormente, cada soro obtido foi acondicionado em microtubo e armazenado a  $-20^{\circ}C$  até a realização da sorologia.

### 4.2 Sorologia

Para a realização da sorologia para pesquisa de anticorpos contra *T. gondii* foi utilizada a reação de Hemaglutinação Indireta (HAI) com o kit Imuno-HAI TOXOPLASMOSE (Wama Diagnóstica®), com ponto de corte 1:16 e seguindo os procedimentos descritos no kit. Sendo considerada reação positiva, quando as hemácias não se depositaram no fundo da cavidade formando um botão.

### 4.3 Obtenção das amostras teciduais de cães

Foram selecionados 07 cães positivos na sorologia e coletados seus cérebros e corações. Os órgãos foram acondicionados individualmente em sacos plásticos limpos contendo soro fisiológico e solução antibiótica (1000UI de penicilina G potássica e 100µg de estreptomicina/mL), e refrigerados por no máximo 05 dias até realização da digestão péptica.

### 4.4 Isolamento de *Toxoplasma gondii* em camundongos

#### 4.4.1 Digestão péptica

Os órgãos dos cães foram processados no Laboratório de Parasitologia Veterinária, do Hospital Veterinário da UESC. Cada órgão (cérebro e coração) foi homogeneizado individualmente em agitador mecânico com um mínimo de PBS. De cada homogeneizado foi retirado 40g, colocado em *Erlenmeyer* de 250 mL e, a este, adicionou-se solução de pepsina ácida (pH 1,1 -1,2) até completar o volume de 200 mL.

O procedimento de digestão baseou-se em Dubey (1998), com algumas modificações. Cada *Erlenmeyer*, contendo o material de cada amostra a ser digerida, foi colocado em uma incubadora *shaker* e mantido à temperatura de 37°C por uma hora. Decorrido este tempo, cada amostra digerida foi passada em tamiz com gaze dupla, e o filtrado de cada amostra foi distribuído em 12 tubos de 50 mL e centrifugado a 1383 g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao material restante adicionou-se solução neutralizadora de bicarbonato de sódio 1,2% (pH 8,3) até completar o volume de 10 mL, e homogeneizou-se a solução com o soluto. Novamente o material contido nos tubos foi centrifugado a 1383 g por 20 minutos e posteriormente o sobrenadante descartado. Por fim, foi adicionado de 5 a 10 mL de solução antibiótica, contendo 1000UI de penicilina G potássica e 100µg de estreptomicina / mL de PBS, em apenas um dos tubos. Homogeneizou-se a solução antibiótica com o soluto do 1º tubo, e posteriormente o conteúdo do 1º tubo foi repassado para o 2º tubo, e assim

sucessivamente até obter o volume dos 12 tubos em um único tubo para inocular em camundongos.

#### 4.4.2 Bioensaio em camundongos

Para inoculação foram utilizados camundongos Swiss Webster provenientes do biotério da UESC.

Duas doses de 01 mL de suspensão contendo o produto da digestão péptica foram inoculadas via intraperitoneal em cada camundongo albino com um intervalo de 24 horas. Foram utilizados três camundongos por amostra, 03 para cérebro e 03 para coração, totalizando 42 animais.

#### 4.4.3 Observação dos camundongos

Os animais foram mantidos com ração comercial própria para espécie e água *ad libitum*, sendo observados diariamente durante 06 semanas (42 dias). Aqueles que morreram, ou tiveram aumento do volume abdominal ou outros sinais que sugerissem infecção pelo *T. gondii* foram examinados para eventual presença do parasito utilizando o líquido peritoneal.

Para a técnica de observação de taquizoítos em líquido peritoneal, uma gota deste líquido foi colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio óptico. Animais que vieram a óbito ou que foram eutanasiados quando doentes tiveram órgãos como baço, fígado, coração, pulmão e cérebro retirados, acondicionados individualmente em microtubos, e armazenados a -80°C, para posterior extração de DNA.

Os animais que não vieram a óbito em 42 dias pós-inoculação (p.i) foram eutanasiados e seus órgãos também foram retirados e tiveram o mesmo destino que os órgãos dos animais acima.

## 4.5 Análise molecular de *Toxoplasma gondii*

### 4.5.1 Diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii*

#### 4.5.1.1 Extração de DNA das amostras teciduais de camundongos infectados

Inicialmente, obteve-se fragmentos de 50 a 100 mg da amostra tecidual descongelada, ou seja, de cada órgão retirado dos camundongos que foram armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estes fragmentos foram macerados em gral e pistilo com nitrogênio líquido, e acondicionados em microtubos para iniciar a extração de DNA.

Para extração de DNA dessas amostras, foi utilizado o *kit* Easy-DNA (Invitrogen®), e o procedimento realizado conforme o protocolo nº 03 do kit.

Para o isolamento de DNA, foi adicionado em cada amostra, 350  $\mu\text{L}$  de solução A, homogeneizou em vortex e incubou-se em banho seco (Dry Bath – Heat & Cool Control®) a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após o banho seco, foi adicionado nas amostras 150  $\mu\text{L}$  de solução B e homogeneizou-se novamente (vortex) até que as amostras estivessem uniformemente viscosas. Posteriormente, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio nas amostras e homogeneizou-se (vortex) cada uma, até que a mistura ficasse homogênea e a viscosidade diminuísse. As amostras foram centrifugadas a 27638 *g* por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para separar as fases. E após centrifugação, a fase superior (que contém o material genético) de cada amostra foi transferida para um novo microtubo para proceder à precipitação do DNA.

Na solução de DNA, contida em cada microtubo novo das amostras, foi adicionado 01 mL de álcool 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$  e homogeneizou-se (vortex) brevemente. Estas amostras foram incubadas no congelador por 30 minutos. E posteriormente, elas foram centrifugadas a velocidade máxima (27638 *g*) por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O etanol foi removido e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de álcool a 80% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , invertendo o tubo de cada amostra 05 vezes antes de centrifugar a 27638 *g* por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação o etanol a 80% foi removido e os tubos, contendo somente o *pellet*, foram novamente centrifugados a 27638 *g* por 3 minutos. Após centrifugação o etanol residual foi removido e dos tubos com *pellet* foram deixados abertos para secar a temperatura ambiente por 5 minutos. Depois o sedimento (*pellet*) de cada tubo foi reconstituído com 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE e 2  $\mu\text{L}$  de RNase de 2 mg/ml. Posteriormente os tubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, e em seguida as

amostras com DNA, prontas para uso, foram acondicionadas a -20°C até realização da quantificação de DNA e realização do PCR.

#### 4.5.1.2 Quantificação de DNA

Após realização da extração de DNA, este foi quantificado com o auxílio do Nanodrop 2000c (Termo Scientific®). Onde foi possível avaliar a concentração de DNA após extração. As amostras que foram quantificadas acima de 1000 ng foram padronizadas para 1000ng/10µL.

#### 4.5.1.3 Detecção de *Toxoplasma gondii* pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR para amplificação do DNA do *T. gondii* foi realizada utilizando o método descrito por Homan et al. (2000), usando os *primers* Tox4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) e Tox5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT), que amplificaram um fragmento de 529 pb (Genebank No.AFI46527) do DNA do *T. gondii*.

A PCR foi desenvolvida contendo 5 µL do DNA extraído e acrescido de 14,8 µL de uma mistura com 0,2 mM de cada *primer*, 100 mM dNTPs (Invitrogen®), 20mM Tris-HCL (pH 8,0), 1,25 mM Mgcl<sub>2</sub> e 2 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) (Quadro 01). A amplificação do DNA do parasita foi feita em 35 ciclos em um termociclador Veriti (Applied Biosystems®), usando as seguintes condições: 7 minutos a 94°C para desnaturação em um ciclo único, seguindo-se 33 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão. O ciclo 35 foi realizado com um tempo de extensão de 10 minutos a 72°C (Quadro 02). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio ou SYBR® Safe DNA Gel Stain e fotodocumentados por L-Pix Image-Loccus Biotecnologia.

**Quadro 01.** Produtos utilizados na reação de PCR para cada amostra tecidual dos camundongos.

<b>Produtos</b>	<b>Volume</b>	<b>Especificações</b>
Água <i>Milliq</i> ou ultrapura	30,2 µL	
Tampão da <i>Taq</i>	5 µL	Invitrogen®
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µL	Invitrogen®
<i>Primer Tox4</i>	3 µL	Invitrogen®
<i>Primer Tox5</i>	3 µL	Invitrogen®
dNTPs	1 µL	Invitrogen®
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,3 µL	Invitrogen®
DNA da amostra	5 µL	
<b>Volume final</b>	<b>50 µL</b>	

**Quadro 02.** Programação do termociclador para a reação da PCR das amostras teciduais dos camundongos.

<b>Fases</b>	<b>Nº de ciclos</b>	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
Desnaturação	1	7 minutos	94°C
Desnaturação		1 minuto	94 °C
Anelamento	33	1 minuto	55°C
Extensão		1 minuto	72°C
Extensão final	1	10 minutos	72°C

Para o controle positivo foi utilizado taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, e água ultrapura como controle negativo. Um controle negativo e um positivo foram incluídos em cada amplificação de PCR.

#### 4.5.2 Caracterização genética de *Toxoplasma gondii*

##### 4.5.2.1 PCR-RFLP

O DNA extraído do tecido de todos os camundongos infectados, detectados pela PCR, e da cepa controle foram analisados através da técnica de *multilocus* PCR-RFLP perante os marcadores genéticos: SAG1, SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, GRA6, L358, PK1 e APICO (SU et al., 2006; DUBEY et al., 2007b; PENA et al., 2008).

A amplificação da sequência de DNA foi realizada pela técnica de *nested*-PCR (*nPCR*), sendo primeiro amplificada pela PCR usando *primers* externos (reação primária) para cada marcador. Esta amplificação foi realizada com um volume final de 50 µL para cada amostra, em uma mistura contendo 20 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada dNTPs (Invitrogen®), 0,15 µM de cada *primer*, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase e 5,0 µL do DNA extraído (Quadro 03). A reação primária do PCR consistiu de 35 ciclos com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C. O ciclo 35 foi realizado com um tempo de extensão de 10 minutos a 72°C (Quadro 04).

**Quadro 03.** Produtos utilizados em cada amostra para PCR da reação primária e da *n*PCR da reação secundária.

Produtos	Volume para reação primária (PCR)	Volume para reação secundária ( <i>n</i> PCR)	Especificações
Água <i>Milliq</i> ou ultrapura	28,5 µL	32,5 µL	-
Tampão da <i>Taq</i> polimerase (Tris-HCL)	5 µL	-	Invitrogen®
MgCl <sub>2</sub>	3 µL	3 µL	Invitrogen®
<i>Primer</i> direto	3 µL	3 µL	Invitrogen®
<i>Primer</i> reverso	3 µL	3 µL	Invitrogen®
dNTPs	2 µL	2µL	Invitrogen®
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,5 µL	0,5 µL	Invitrogen®
DNA da amostra	5 µL	-	-
Produto da reação primária	-	1 µL	-
Volume final	50 µL	45 µL	

**Quadro 04.** Programação do termociclador para Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e da *nested*-PCR (*n*PCR) das amostras destinadas à caracterização genética.

Fases	Nº de ciclos	Tempo	Temperatura
Desnaturação	1	5 minutos	94°C
Desnaturação		1 minuto	94 °C
Anelamento	33	1 minuto	58°C (PCR); 60°C, 62°C, 64°C ( <i>n</i> PCR)*
Extensão		1 minuto	72°C
Extensão final	1	10 minutos	72°C

\* 60°C para SAG1, novo SAG2, SAG3, BTUB, c22-8, c29-2, L358; 62°C para APICO e PK1; 64°C para GRA6.

Os produtos amplificados pelo PCR da primeira reação (1,5  $\mu\text{L}$  de cada amostra) foram utilizados para amplificação em *nested*-PCR (35 ciclos) com *primers* internos (segunda reação) para cada marcador. Esta reação secundária consistiu em temperatura e tempo iguais aos da primeira reação, porém com uma temperatura de anelamento de 60°C, 62°C ou 64°C, a depender do marcador, e um volume final da reação de 45  $\mu\text{L}$  (Quadro 03).

Para revelar o padrão de digestão (RFLP), 07  $\mu\text{L}$  dos produtos da *n*PCR foram adicionados a 8  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo tampão da reação (NEB), 0,1 mg/mL de BSA e uma unidade da enzima de restrição, caso o marcador tivesse apenas uma enzima de restrição colocava-se duas unidades desta mesma enzima (Quadro 05). A reação foi conduzida e incubada de acordo com os tempos de cada enzima (Tabela 02) (DUBEY; SU, 2009; FRAZÃO-TEXEIRA et al., 2011).

Os produtos da digestão enzimática de cada PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2,5, 2,6 ou 3%, dependendo do marcador) corados com brometo etílico a 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e visualizado em fotodocomentador de luz ultravioleta (L-Pix Image-Loocus).

**Quadro 05.** Reagentes utilizados para digestão enzimática nos produtos da *n*PCR de cada amostra positiva para presença de DNA do *T. gondii*.

Reagentes	Volumes
Água <i>Milliq</i> ou ultrapura	6,1 $\mu\text{L}$
Tampão NEB 2 ou 4	1,5 $\mu\text{L}$
BSA 100x	0,2 $\mu\text{L}$
Enzima de restrição 1	0,1 $\mu\text{L}$
Enzima de restrição 2	0,1 $\mu\text{L}$
Produto da <i>N</i> pcr	7 $\mu\text{L}$
<b>Volume final</b>	<b>15 <math>\mu\text{L}</math></b>

**Tabela 02.** Enzimas de restrição utilizadas para cada marcador genético de *Toxoplasma gondii* na PCR-RFLP.

Marcador genético	Primes* Externos (PCR)	Primers Internos (nPCR)	nPCR (bp)	Enzimas de restrição	Incubação (temperatura e tempo), Tampão NEB (Nº), concentração do gel (%)
SAG1	D: GTTCTAACCCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	D: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	Sau96I HaeII	37°C 1 h, NEB4, gel 2,6%
SAG2 novo	D: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	D: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTGACCCAGCGGGAGCAC	546	Hinfl TaqI	37°C 50 min, 65°C 50 min, NEB4, gel 2,5%
SAG3	D: CAACTCTCACCATTCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	D: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCCGAGAAGGA	225	NciI	37°C 1 h, NEB4, gel 2,5%
BTUB	D: TCCAAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAAATGACGGAAGAA	D: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	441	BsiEI TaqI	60°C 1 h, NEB4, gel 2,5%
GRA6	D: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	D: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	MseI	37°C 1 h, NEB4, gel 2,5%
c22-8	D: TGATGCATCCATGCGTTTAT R: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	D: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	BsmAI MbolI	37°C 50 min, 60°C 50 min, NEB4, gel 2,5%
c29-2	D: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	D: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	HpyCH4IV RsaI	37°C 1 h; NEB4, gel 2,5%
L358	D: CTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCTCGAAGACAGG	D: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	HaeIII NlaIII	37°C 1 h, NEB4, gel 2,5%
PK1	D: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	D: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	AvaI RsaI	37°C 1 h, NEB4, gel 2,5%
APICO	D: TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	D: TGCAAATTCTGAATTCTCAGTT R: GGGATTGCAACCCTTGATA	640	AfIII DdeI	37°C 1 h, NEB4, gel 3%

\***Primers:** D = *primer* direto, R = *primer* reverso, indicando 5' e 3' respectivamente.

## 5 RESULTADOS

A análise sorológica das 21 amostras de soro canino, dos municípios de Ilhéus e Itabuna, detectou sete (33,3%) cães positivos para presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, sendo dois de Ilhéus e cinco de Itabuna.

No ensaio biológico dos órgãos dos 07 cães soropositivos, foi possível isolar 04 cepas do parasita, sendo que todas as cepas isoladas foram virulentas para os camundongos, provocando alterações clínicas (pêlos arrepiados, letargia, abdômen distendido) e morte dos camundongos com intervalo de 8 a 20 dias pós-infecção (Tabela 03). Além disso, foi possível observar taquizoítos no fluido peritoneal de todos os camundongos positivos.

Como foi realizado um total de 14 bioensaios, pois foram utilizados dois órgãos (cérebro e coração) de 07 cães soropositivos para inoculação em um total de 42 camundongos, o índice total de recuperação do parasita nos camundongos inoculados foi 50% (7/14), ou seja, o parasita estava presente em 07 dos 14 órgãos bioensaiados.

Na análise molecular das amostras de tecido dos camundongos inoculados com os órgãos dos 07 cães soropositivos, a PCR tradicional, com os *primers* tox4 e tox5 (Figura 03), identificou 04 (57,1%) cães positivos para a presença do DNA do *T. gondii*, sendo detectado em 57,1% (4/7) nas amostras inoculadas com coração e 42,8% (3/7) nas amostras infectadas com cérebro canino (Tabela 04). Estas mesmas amostras caninas positivas na PCR com os *primers* tox4 e tox5, também foram positivas na *nested*-PCR com os 10 *primers* (externos e internos) utilizados, obtendo-se amplificação correspondente ao tamanho dos pares de bases de cada marcador molecular utilizado, confirmando a identificação molecular do parasita naquelas amostras teciduais (Figura 4).

**Tabela 03.** Isolados de *Toxoplasma gondii* por ensaio biológico em camundongos inoculados com órgãos de cães naturalmente infectados de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil.

Cães positivos	Órgão inoculado	Camundongos (nº de mortos/ nº de infectados)	Sobrevida (dias p.i.)	Presença de isolados no fluido peritoneal	Isolados de <i>T. gondii</i>
5	Cérebro	0 <sup>a</sup> /3 <sup>b</sup>	-	-	
	Coração	0/3	-	-	
6	Cérebro	0/3	-	-	
	Coração	3/3	9 – 10 <sup>c</sup>	+	TgDgBr 6
8	Cérebro	0/3	-	-	
	Coração	0/3	-	-	
13	Cérebro	3/3	7 – 8	+	TgDgBr 13
	Coração	3/3	7 – 8	+	
16	Coração	0/3	-	-	
	Cérebro	0/3	-	-	
17	Cérebro	3/3	14 – 20	+	TgDgBr 17
	Coração	3/3	9	+	
21	Cérebro	3/3	10	+	TgDgBr 21
	Coração	3/3	8 – 10	+	

<sup>a</sup> Número de camundongos mortos;

<sup>b</sup> Número total de camundongos inoculados;

<sup>c</sup> Período, em dias, da morte dos camundongos após inoculação.

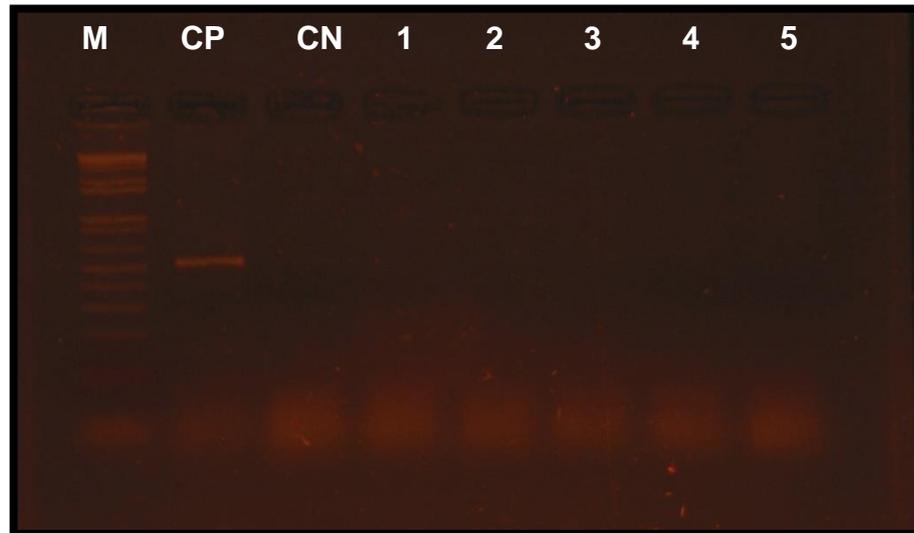
**Tabela 04.** Detecção de *Toxoplasma gondii* em amostras de caninos naturalmente infectados por PCR associado ao ensaio biológico.

CANINOS <sup>a</sup>	PCR do ensaio biológico									
	Inoculação de Cérebro					Inoculação de Coração				
	Pulmão	Baço	Fígado	Coração	Cérebro	Pulmão	Baço	Fígado	Coração	Cérebro
5	0 <sup>b</sup> /3 <sup>c</sup>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
6	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
8	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
13	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
16	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
17	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3
21	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
<b>SUBTOTAL (A)</b>	3/7 (42,8%)	3/7 (42,8%)	3/7 (42,8%)	3/7 (42,8%)	3/7 (42,8%)	4/7 (57,1%)	4/7 (57,1%)	4/7 (57,4%)	4/7 (57,1%)	4/7 (57,1%)
<b>SUBTOTAL (B)</b>	3/7 (42,8%)					4/7 (57,1%)				
<b>TOTAL (A+B)</b>	7/14 (50%)									

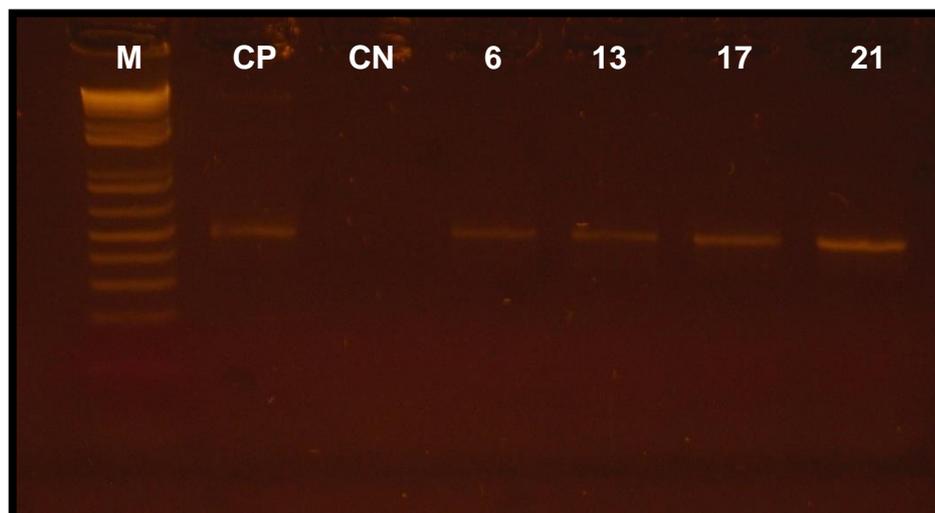
<sup>a</sup> cães soropositivos;

<sup>b</sup> Número de camundongos positivos;

<sup>c</sup> Número de camundongos inoculados.



**Figura 03.** Eletroforese em gel a 2% da PCR, com os *primers* tox4 e tox5 utilizada para diagnóstico do DNA do *Toxoplasma gondii*. Marcador molecular (**M**); controle positivo com 529pb (**CP**); controle negativo (**CN**); e amostras negativas (cérebro do cão 16), linhas 1-5.



**Figura 04.** Eletroforese em gel da *nested-PCR* (*nPCR*) das amostras dos cães com marcador c22-8. Na seguinte ordem: marcador molecular (**M**), controle positivo (**CP**), controle negativo (**CN**) e amostras de cão (**6, 13, 17 e 21**).

A genotipagem dos quatros isolados com a técnica de RFLP com o uso de 09 marcadores revelou quatro genótipos com diferentes combinações das linhagens clonais (tipos I, II e III) e 2 genótipos apresentando alelos atípicos (u-1) no locus c22-8. Tais isolados foram designados TgDgBr6, 13, 17 e 21, sendo Tg para *Toxoplasma gondii*, Dg para cães e Br para Brasil, e o número identifica o cão positivo para presença de DNA do parasita (Tabela 05). Como as enzimas (AVAI e RSAI) não clivaram o DNA das amostras e do controle positivo, não avaliamos o locus PK1 na RFLP.

**Tabela 05.** Genotipagem dos isolados de *T. gondii* dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil, utilizando a RFLP.

Isolados	Virulência	Marcadores genéticos										Genótipo <sup>b</sup>	Referência	
		SAG1	SAG2	SAG3	BTUB	c22-8	c29-2	GRA6	L358	APICO	PK1			
TgDgBr 6	Virulento	I	III	III	I	I	II	III	I	I	NA	Único	Presente trabalho	
TgDgBr 13	Virulento	I	III	III	II	I	II	III	III	I	NA	Único		
TgDgBr 17	Virulento	I	II	III	II	u – 1 <sup>a</sup>	II	III	I	I	NA	Único		
TgDgBr 21	Virulento	I	I	III	I	u – 1	II	III	III	I	NA	Único		
TgPgBr06, 08, 11, 12, 14, 15	-	I	I	III	III	I	NA	NA	NA	III	I	5	Bezerra et al. (2012b)	
TgPgBr7	-	I	I	III	III	u-1	NA	NA	NA	III	NA	6		
TgPgBr9	-	I	I	III	II	I	NA	NA	NA	III	I	7		
TgPgBr10	-	u-1	I	III	III	III	NA	NA	NA	III	I	8		
TgPgBr13	-	I	I	III	I	III	NA	NA	NA	III	u-1	9		
TgPgBr16	-	I	I	III	I	I	NA	NA	NA	III	I	10		
TgShBr54	-	I	I	I	III	III	u-1	III	u-1	III	u-1	54		Maciel et al. (2014)
TgShBr124	-	I	I	I	III	III	u-1	III	u-1	III	u-1	124		
TgShBr127	-	I	I	I	III	III	u-1	III	u-1	III	u-1	127		

<sup>a</sup> u-1 Alelo atípico; NA = Sequência não analisada para este marcador; <sup>b</sup> Genótipos avaliados por ToxoDB PCR-RFLP (WWW.toxodb.org).

## 6 DISCUSSÃO

As amostras sanguíneas e teciduais dos caninos foram coletadas de acordo com a demanda de animais eutanasiados nos CCZ dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, não havendo morte específica para o projeto, o que justifica um N amostral não muito grande.

Neste estudo, anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 33,3% (7/21) dos cães naturalmente infectados que foram eutanasiados. Este percentual enquadra-se nos valores de prevalência do protozoário na população canina em diferentes regiões brasileiras, que varia entre 4,9 a 91% conforme FIALHO et al. (2009), e também com valores anteriormente referidos, em Ilhéus e Itabuna, na Bahia, por Carlos et al. (2010) que encontraram soropositividade contra o parasita em 36,5% dos 529 soros caninos testados pelo HAI, onde a maioria dos cães testados eram errantes e de área rural.

Isso demonstra que o coccídio está circulante na população canina da Bahia, e que isolados de caninos naturalmente infectados são importantes para avaliação das cepas de *T. gondii* circulantes nesta região. Uma vez, que cães funcionam como sentinelas na disseminação da infecção toxoplásmica humana, pois estão expostos a riscos similares, seja alimentares, como carne e outro alimento contaminado, ou ambiental (presença de oocistos na água ou solo) (ARAÚJO et al., 2011).

Esta alta soropositividade para *T. gondii* em cães errantes naturalmente infectados é explicado, por muitos autores, pelo fácil acesso destes animais a fontes de infecção do agente, o que inclui carne crua contaminada com cistos do parasita, fornecida por humanos, encontrada no lixo ou na carcaça de animais caçados, e ainda pelo maior contato com oocistos no ambiente contaminado (ARAÚJO et al., 2011; BRESCIANI et al., 2007; CARLOS et al., 2010; DANTAS et al., 2013;)

Além disso, a alta soroprevalência em caninos pode estar associada com alta densidade da população felina e conseqüentemente elevada excreção de oocistos no ambiente por estes animais, pois segundo Dubey (2004), praticamente todos os gatos soropositivos já lançaram oocisto junto às fezes, resultando em contaminação do ambiente, e conseqüentemente na infecção de outros animais (EL BEHAIRY et al., 2013).

Como a soropositividade nestes animais pode estar associado à contaminação ambiental e/ou fontes alimentares, sugere-se que possíveis genótipos circulantes em cães possam também estar circulantes em humanos, uma vez que ambos possuem fontes similares de infecção e convívio próximo.

No bioensaio, quatro isolados foram obtidos a partir de 07 amostras teciduais (cérebro e coração) canina. Logo, este estudo obteve um índice de 50% (7/14) de recuperação do parasita, onde dos 14 órgãos bioensaiados, *T. gondii* estava presente em 07 órgãos. O índice de recuperação do parasita neste estudo foi semelhante ao de El Behairy et al. (2013) que obtiveram um índice de 51,16% em um total de 43 bioensaios com coração de cães no Egito.

No presente estudo, três animais (cão 05, 08 e 16) considerados positivos na sorologia foram negativos no bioensaio e na PCR. Isso pode ser explicado pelos parasitas não estarem viáveis nos tecidos destes cães ou não estarem presentes nos órgãos utilizados para bioensaio, ou ainda o tecido utilizado apresentava uma baixa concentração de cistos teciduais, pois conforme Pena et al. (2008) é impossível controlar a dosagem de parasitas viáveis nos produtos da digestão utilizados na inoculação. A mesma explicação pode ser dada para os camundongos inoculados com amostra de cérebro do cão 06, que foram negativos no bioensaio e PCR. Uma vez, que o bioensaio permite reproduzir a infecção com parasitas viáveis presentes nas amostras, além de, também aumentar consideravelmente a detecção do DNA de *T. gondii* pela PCR em amostras de camundongos infectados, possuindo uma alta sensibilidade (Bezerra et al., 2012a). Isto explica o porquê, a técnica de bioensaio em camundongos é ainda o método mais eficaz e utilizado na maioria das pesquisas para obtenção de isolados do parasita (HOMAN et al., 2000; SHWAB et al., 2014).

Neste estudo a maior proporção de isolados, 57,1% (4/7) foi obtida das amostras de coração canino do que das amostras de cérebro 42,8% (3/7). El Behairy et al. (2013) obtiveram percentual semelhante, 51,1% (22/43), com bioensaio do coração de 43 cães soropositivos. Muitas pesquisas de isolamento e caracterização de isolados em animais têm utilizado o miocárdio como principal amostra tecidual para bioensaio (CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013; DUBEY et al., 2008a; 2008b; DUBEY et al., 2011; DUBEY et al., 2012b; EL BEHAIRY et al., 2013).

Assim como nesta pesquisa, outros estudos também utilizaram o bioensaio em camundongos, não apenas, para obter isolados do *T. gondii* para genotipagem, mas também para avaliar a virulência destes isolados, e posteriormente associá-los aos genótipos identificados (CARNEIRO et al., 2013; DUBEY et al., 2011; DUBEY et al., 2012b; EL BEHAIRY et al., 2013; SHWAB et al., 2014). Pois o bioensaio permite definir a virulência da cepa durante o isolamento pela interação parasita-camundongo, e correlacionar esta virulência com o tipo de genótipo encontrado (DUBREMETZ; LEBRUN, 2012; PENA et al., 2008).

No presente estudo, com cães naturalmente infectados, a caracterização genética dos quatro isolados caninos através da *multilocus* PCR-RFLP com 09 marcadores, detectou 04 genótipos distintos, de cepas recombinantes e com *loci* atípico ( $\mu$ -1), circulantes nesta micro-região baiana.

Esses resultados corroboram com o de vários autores que através da PCR-RFLP com vários marcadores, também conseguiram detectar genótipos recombinantes, revelando diversidade genética de *T. gondii* com amostras de animais e humanos no Brasil (BEZERRA et al., 2012; CARNEIRO et al., 2013; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013; DUBEY et al., 2007a; LANGONI et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2012; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2011; PENA et al., 2014; PENA et al., 2008;).

Tais estudos junto a este demonstram que é fundamental a genotipagem avaliando múltiplos *loci*, para identificar a real diversidade genética das cepas de *T. gondii* circulantes no Brasil (DÁRDE, 2008; SU et al., 2006). Ainda, Pena et al. (2008) acrescentam que apesar dos marcadores utilizados para RFLP serem desenvolvidos com base no DNA das linhagens clonais (I, II e III), eles são capazes de revelar alelos atípicos ( $\mu$ -1,  $\mu$ -2) nos locus SAG1, novo SAG2, c22-8, c29-2 e PK1. No presente trabalho, foi identificado alelos atípicos em dois genótipos (TgDgBr 17 e 21) no locus c22-8.

Além disso, não houve semelhança dos genótipos encontrados nesta pesquisa, com nenhum genótipo de *T. gondii* em isolados de cães do Brasil, avaliados por Dubey et al. (2007a), Pena et al. (2008), Langoni et al. (2012) e Silva et al. (2014). Como também, não houve semelhança (Tabela 05) com os genótipos identificados por Bezerra et al. (2012b) e Maciel et al. (2014), em isolados de suínos e ovinos, respectivamente, na mesma região micro-baiana desta pesquisa. Pois as amostras deste estudo possui alelos diferentes em vários loci dos alelos

encontrados por Bezerra et al. (2012b) e Maciel et al. (2014), principalmente no locus APICO, onde todos alelos encontrados foram do tipo I, o qual não foi encontrado, neste mesmo locus, pelos pesquisadores citados.

Estes dados de alta diversidade genética com cepas recombinantes de *T. gondii* relatados no Brasil sugerem que genótipos recombinantes são freqüentes e estão amplamente disseminados, em função do alto índice de recombinação sexual destes parasitas (SIBLEY; AJIOKA, 2008). E que ainda, estes genótipos recombinantes infectam qualquer hospedeiro, estando circulantes tanto em animais como em humanos.

Todas as cepas encontradas, neste estudo, foram virulentas para camundongos, pois todos os camundongos apresentaram sinais clínicos de toxoplasmose aguda, seguida de morte com menos de 30 dias após inoculação, corroborando com Pena et al. (2008) e Da Silva et al. (2010b), onde uma cepa é considerada virulenta quando há 100% de mortalidade dos camundongos em até 04 semanas após infecção. Estes resultados de virulência foram semelhantes com os encontrados por Silva et al. (2014) nas cepas recombinantes (D5 e D6) isoladas de cães.

A virulência observada neste estudo pode ser justificada pela maioria dos genótipos terem alelos do tipo I em mais de um locus, e alelos atípicos, o que pode influir no fenótipo de cepas recombinantes, implicando em maior virulência. Pois, sabe-se que alelos do tipo I são considerados altamente virulentos, resultando na mortalidade de camundongos infectados (DARDÉ, 2008; FERREIRA et al., 2006; SILVA et al., 2014). Por isso, acredita-se que genótipos recombinantes e cepas atípicas possuem forte influência sobre a virulência do parasita, sendo naturalmente mais virulentos que genótipos clonais, e por isso ligado a casos graves de toxoplasmose em humanos imunocompetentes (AJZENBERG et al., 2004; DA SILVA et al., 2010b; DUBEY et al., 2012a).

Portanto, a recombinação pode ser capaz de promover novos mecanismos patogênicos em cepas recombinantes, resultando em novos genótipos que promovem casos mais graves de toxoplasmose em pessoas imunocompetentes, e sejam mais patogênicos em camundongos infectados, podendo ainda, com sua expansão ocasionar doenças emergentes (Dardé, 2008).

A estrutura populacional do parasita, no Brasil, composta de cepas recombinantes, como as encontradas neste estudo, possivelmente está associada

com um alto índice de contaminação ambiental, por oocistos do parasita, resultando em infecção de hospedeiros intermediários e, conseqüentemente, em aumento na oportunidade de recombinação genética do parasita em felinos presentes na fauna brasileira.

## 7 CONCLUSÕES

1. Isolados de *T. gondii* foram obtidos das amostras teciduais caninas, principalmente de tecido cardíaco.
2. Os quatro isolados são diferentes entre si e com genótipos únicos pela ToxoDB, jamais descritos no Brasil e no mundo.
3. Todas as cepas isoladas foram virulentas para camundongos infectados.

## REFERÊNCIAS

ABREU, C.B.; NAVARRO, I.T.; REIS, A.C.F.; SOUZA, M.S.B.; MACHADO, R.; MARANA, E.R.M.; PRUDÊNCIO, L.B.; MATTOS, M.R.; TSUTSUI, V.S. Toxoplasmose ocular em cães jovens inoculados com *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 807 – 812, 2002.

AJZENBERG, D.; BANULS, A.L.; TIBAYRENC, M.; DARDE, M.L. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 27 – 38, 2002.

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

ARAÚJO, D.A.; SILVA, A.V.; ZANETTE, D.F.; SILVA, D.R.; CORREA, N.A.B.; VESLASQUEZ, L.G.; NETO, A.P. Investigação dos fatores associados à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em cães e seres humanos de Porto Figueira, PR. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 98 – 111, 2011.

AZEVEDO, S.S.; BATISTA, C.S.; VASCONCELLOS, S.A.; AGUIAR, D.M.; RAGOZO, A.M.; RODRIGUES, A.A.; ALVES, C.J.; GENNARI, S.M. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n.1, p. 51 – 56, 2005.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; JONES, J.L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C.C.F.; OREFICE, F.; ADDISS, D.J. Highly Endemic, Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 9, nº 1, 2003.

BARBOSA, M.V.F.; GUIMARÃES, J.E.; ALMEIDA, M.A.O.; GONDIM, L.F.P.; REGIS, G.B. Frequência de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em soros de cães errantes da cidade de Salvador-Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 457 – 465, 2003.

BEZERRA, R.A.; CARVALHO, F.S.; GUIMARÃES, L.A.; ROCHA, D.S.; SILVA, F.L.; WENCESLAU, A.A.; ALBUQUERQUE, G.R. Comparison of methods for detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of naturally exposed pigs. **Parasitology Research**, v.110, n. 2, p. 509 – 514, 2012a.

BEZERRA, R.A.; CARVALHO, F.S.; GUIMARÃES, L.A.; ROCHA, D.S.; MACIEL, B.M.; WENCESLAU, A.A.; LOPES, C.W.; ALBUQUERQUE, G.R. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 153 – 161, 2012b.

BRESCIANI, K.D.S.; TONIOLLO, G.H.; COSTA, A.J.D.; SABATINI, G.A.; MORAES, F.R.D. Clinical parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. **Ciência Rural**, v. 31, p. 1039 – 1043, 2001.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; NUNES, C.M.; SERRANO, A.C.M.; MOURA, A.B.; STOBBE, N.S.; PERRI, S.H.V.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e estudo de fatores de risco em cães de Araçatuba-SP. **ARS Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 40 – 46, 2007.

BRITO, A.F.; SOUZA, L.C.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 31 – 35, 2002.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438 – 442, 2002.

BORGES, N.M.F. Técnicas moleculares para identificação de bactérias em alimentos. **Universidade Federal de Goiás (UFG)**. Disponível em <<http://www.slideshare.net/nataliaborges/tecnicas-moleculares>>. Acesso em: março de 2014.

CAÑÓN FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; RICHTZENHAIN, L.J.; NOGUEIRA, Y.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; GENNARI, S.M. Evaluation of the performance of the modified direct agglutination test (MAT) for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 452 – 456, 2003.

CAÑÓN-FRANCO, W.A.; BERGAMASCHI, D.P.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondonia, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.28, p. 113 – 118, 2004.

CAÑÓN-FRANCO, W.A.; OROZCO, L.; GÓMEZ-MARÍN, J.E.; DUBEY, J.P. An overview of seventy years of research (1944-2014) on toxoplasmosis in Colombia, South America. **Parasites & Vectors**, v.7, p. 1 – 15, 2014.

CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE, G.R.; BEZERRA, R.A.; SICUPIRA, P.M.L.; MUNHOZ, A.D.; LOPES, C.W.G. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e principais fatores de risco associados à infecção canina na região de Ilhéus-Itabuna, estado da Bahia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.32, n. 2, p. 115 – 121, 2010.

CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE, G M.; COSTA J. G.L.; PINHEIRO, B.V.; VASCONCELOS-SANTOS, D.V.; FERREIRA, A.M.; SU, C.; JANUÁRIO, J.N.; ALMEIDA VITOR, R.W. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Revealed Highly Diverse Genotypes for Isolates from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in South-eastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 5, nº 3, p 901 – 907, 2013.

CLEMENTINO-ANDRADE, M.M.; PINHEIRO, B.V.; CUNHA, M.M.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE-NETO, V.F.; VITOR, R.W.A. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 587 – 589, 2013.

COIRO, C.J.; LANGONI, H.; DA SILVA, R.C.; ULLMANN, L.S. Fatores de risco para leptospirose, leishmaniose, neosporose e toxoplasmose em cães domiciliados e peridomiciliados em Botucatu-SP. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 393 – 407, 2011.

DANTAS, S.B.A.; FERNANDES, A.R..F.; NETO, O.L.S.; MOTA, R.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S. Ocorrência e fatores de risco associados às infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães no município de Natal, estado do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 2042 – 2048, 2013.

DARDÉ, M.L. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. **Anali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, p. 57 – 63, 2004.

DARDÉ, M.L. *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, p. 366 – 371, 2008.

DAVIDSON, M.G. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1051 – 1052, 2000.

DIAS, R.A.F.; FREIRE, R.L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 239 – 248, 2005.

DA SILVA, R.C.; LIMA, V.Y.; TANAKA, E. M.; DA SILVA, A.V.; SOUZA, L.C.; LANGONI, H. Risk factors and presence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in dogs from the coast of São Paulo State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 161 – 166, 2010a.

DA SILVA, A.V.; DA SILVA, R.C.; ZAMPROGNA, T.O.; LUCAS, T.M. *Toxoplasma gondii* in swine with emphasis in Brazilian contribution. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, nº 1, p. 120 – 130, 2010b.

DELHAES, L.; AJZENBERG, D.; SICOT, B.; BOURGEOT, P.; DARDÉ, M.; DEICAS, E.; HOUFFIN-DEBARGE, V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. **Prenatal Diagnosis**, v. 30, p. 902 – 905, 2010.

DOMINGUES, L.M.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; CARVALHO, C.S.; COSTA, A.J.; MALHEIROS, E.B. Canine toxoplasmosis: a comparative evaluation of the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the indirect immunoenzymatic assay (ELISA) and the indirect immunofluorescence reaction (IFI). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 79 – 85, 1998.

DREER, M.K.P.; GONÇALVES, D.D.; CAETANO, I.C.S.; GERÔNIMO, E.; MENEGAS, P.H.; BERGO, D.; LOPES-MORÍ, F.L.R.; BENITEZ, A.; FREITAS, J.C.; EVERS, F.; NAVARRO, I.T.; MARTINS, L.A. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.19, p. 1 – 5, 2013.

DUBEY, J.P.; FRENKEL, J.K. Cyst- induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 19, p. 155 – 177, 1972.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in dogs. **Canine Practice**, v. 28, p. 7 – 28, 1985.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. Toxoplasmosis of Animals and man. **Boca Raton, Florida: CRC Press**, p. 220, 1988.

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

DUBEY, J.P.; ZARNKE, R.; THOMAS, N.J.; WONG, S.K.; BONN, W.V.; BRIGGS, M.; DAVIS, J.W.; EWING, R.; MENSE, M.; KWOK, O.C.H.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis*

*canis*-like infections in marine mammals. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 275 – 296, 2003a.

DUBEY, J.P.; ROSS, A.D.; FRITZ, D. Clinical *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni* and *Sarcocystis* spp. Infectious in dogs. **Parasitology**, v. 45, p. 141 – 146, 2003b.

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

DUBEY, J.P.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and neosporosis. In **Infectious diseases of the dog and the cat**. 3<sup>a</sup> ed. Saunders, p. 754-775, 2006.

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

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. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 347-351, 2007b.

DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p.467 – 475, 2008.

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H.F.J.; NUNES DE OLIVEIRA, L.; LEIFER, C.A.; GENNARI, S.M.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; SU,C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. . **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 3-4, p.299 – 305, 2008a.

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. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 999-1006, 2008b.

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

DUBEY, J.P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 877 – 882, 2009.

DUBEY, J.P., SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and here did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 109 – 195, 2009.

DUBEY, J.P., RAJENDRAN, C., FERREIRA, L.R., MARTINS, J., KWOK, O.C.H., HILL, D.E., VILLENA, I., ZHOU, H., SU, C., JONES, J.L. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from goats, from a retail meat store, destined for human consumption in the USA. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 827 – 833, 2011.

DUBEY, J.P., LAGO, E.G., GENNARI, S.M., SU, C., JONES, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, p. 1 – 50, 2012a.

DUBEY, J.P., HILL, D.E., ROZEBOOM, D.W., RAJENDARAN, C., CHOUDHARY, S., FERREIRA, L.R., KWOK, O.C.H., SU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 14 – 18, 2012b.

DUBEY, J.P.; TIWARI, K.; DEALLIE, C.; SHARMA, R.; THOMAS, D.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L.R.; OLIVEIRA, S.; VERMA, S.K.; KWOK, O.C.H.; SU, C. Isolation and RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from the domestic dogs (*Canis familiaris*) from Grenada, West Indies revealed high genetic variability. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 623 – 626, 2013.

DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1403 – 1410, 2012.

EL BEHAIRY, A.M.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.H.; HILALI, M.; SU, C.; DUBEY, J.P. Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 25 – 29, 2013.

ETHEREDGE, G.D.; MICHAEL, G.; MUEHLENBEIN, M.P.; FRENKEL, J.K. The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in kuna and Embera children in eastern Panama. **Panama American Journal of Public Health**, v. 6, n. 3, p. 176 – 186, 2004.

FIALHO, C.G., TEXEIRA, M.C., ARAUJO, F.A.P. Animal Toxoplasmosis in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37(1), p. 1 – 23, 2009.

FERREIRA, A.M.; VITOR, R.W.A.; GRAZZINELLI, R.T.; MELO, M.N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 22-31, 2006.

FRAZÃO-TEXEIRA, E.; SUNDAR, N.; DUBEY, J.P.; GRIGG, M.E.; DE OLIVEIRA, F.C.R. Multilocus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 33 – 39, 2011.

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

FUENTES, I., RUBIO, J.M., RAMIREZ, C., ALVAR, J. Genotypic characterization of *toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 1566 – 1570, 2001.

GERMANO, P.M.L.; ERBOLATO, E.B.; ISHIZUKA, M.M.; Estudo sorológico da toxoplasmose canina, pela prova de imunofluorescência indireta, na cidade de Campinas, 1981. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.22, n.1, p. 53 – 58, 1985.

GUIMARÃES, A.M.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; CURY, M.C.; SPIEWAK, G. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n.1, p.67 – 68, 1992.

GUIMARÃES, A.M.; ROCHA, C.M.B.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; ROSADO, I.R.; MORAIS, L.G.; SANTOS, R.R.D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 49 – 53, 2009.

HIGA, A.C.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L.M.; MALHEIROS, E.B. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum antigens* in dogs sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.2, p. 91 – 95, 2000.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; DE BRAEKELEER, J.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529 pb DNA fragment in *Toxoplasma*

*gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n.1, p. 69 – 75, 2000.

HOWE, D.K., SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal Infectious Diseases**, v. 64, p. 5193 – 5198, 1995.

ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F. Estudo comparativo entre as provas de Sabin-Feldman e Imunofluorescência Indireta para a avaliação de anticorpos anti-*Toxoplasma* em soro de cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, p. 127 – 132, 1974.

JONES, J.L., DARGELAS, V., ROBERTS, J., PRESS, C., REMINGTON, J.S., MONTOYA, J.G. Risk factors for *toxoplasma gondii* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 878 – 884, 2009.

JONES, J.L.; DUBEY, J.P. Waterborne toxoplasmosis – Recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10 – 25, 2010.

KHAN, A.; SU, C.; GERMAN, M.; STORCH, G.A.; CLIFFORD, D.B.; SIBLEY, L.D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains from immunocompromised patients reveals high prevalence of type I strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5881 – 5887, 2005.

KHAN, A.; JORDAN, C.; MUCCIOLI, C.; VALLOCHI, A.L.; RIZZO, L.V.; BELFORT JR, R.; VITOR, R.W.A.; SILVEIRA, C.; SIBLEY, L.D. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1 – 8, 2006.

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

LANGONI, H.; MATTEUCCI, G.; MEDICI, B.; CAMOSSO, L.G.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; DA SILVA, R.C. Detection and molecular analysis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* from dogs with neurological disorders. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 365 – 368, 2012.

LANGONI, H.; FORNAZARI, F.; SILVA, R.C.; MONTI, E.T.; VILLA, F.B. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p. 1327 – 1330, 2013.

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

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; BUTLER, J.M.; BLAGBURN, B.L. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 27 – 33, 1997.

LOPES, M.G.; MENDONÇA, I.L.; FORTES, K.P.; AMAKU, M.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M. Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 111-114, 2011.

MACIEL, B.M.; MOURA, R.L.S.; CARVALHO, F.S.; COSTA, E.A.; ALBUQUERQUE, G.R. Identification and genetic characterization of a new Brazilian genotype of *Toxoplasma gondii* from sheep intended for human consumption. **Parasitology International**, v. 63, p. 567 – 570, 2014.

MANDELL, D.C.; HOLT, E. Ophthalmic emergencies. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, n. 2, p. 455 – 480, 2005.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; NÄSLUND, K.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.; MINEO, J.R. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* serological status of different canine populations from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n.3, p. 414 – 417, 2004.

MORETTI, L.D.; SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C; LANGONI, H. Case Report: *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis Rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 359-363, 2006.

MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; TEXEIRA, E.B.; PISETTA, G.M.; HEUSSER JUNIOR, A. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p. 52-56, 2009.

MONTEIRO, S.G. Parasitologia na Medicina Veterinária. **Editora Roca**, 356 p., 2010.

PENA, H.F.L.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n.5, p. 561 – 569, 2008.

PENA, H.F.J.; MOROZ, L.R.; SOZIGAN, R.K.B.; AJZENBERG, D.; CARVALHO, F.R.; MOTA, C.M.; MINEO, T.W.P.; MARCILLI, A. Case report: Isolation and biological and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from canine cutaneous toxoplasmosis in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4419 – 4420, 2014.

RAGOZO, A.M.A., PENA, H.F.J., YAI, L.E.O., SU, C., GENNARI, S.M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 307 – 312, 2010.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J.P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infectious, Genetics and Evolutions**, v. 12, p. 359 – 368, 2012.

RIBEIRO, L.A. Identificação de DNA de *Toxoplasma gondii* através do método de reação em cadeia de polimerase (PCR) em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) do litoral sul da Bahia. 2013. 74 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)** – Universidade Estadual de Santa, Ilhéus, 2013.

SALB, A.L.; BARKEMA, H.W.; ELKIN, B.T.; THOMPSON, R.C.A.; WHITESIDE, D.P.; BLACK, S.R.; DUBEY, J.P.; KUTZ, J. Dogs as sources and sentinels of parasites in human and wildlife, Northern Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 60 – 63, 2008.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal of Parasitology**, v. 35, p. 1525 – 1537, 2005.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual Reviews**, v. 62, p. 329 – 351, 2008.

SIBLEY, L.D.; KHAN, A.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 364, p. 2749 – 2761, 2009.

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

SILVA, L.A.; ANDRADE, R.O.; CARNEIRO, A.C.A.V.; VITOR, R.W.A. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in southeastern Brazil. **Plos ONE**, v. 9, p. 1 – 7, 2014.

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

SHWAB, E.K.; ZHU, X.; MAJUMDAR, D.; PENA, H.F.J.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, p. 453 – 461, 2014.

SWINGER, R.L.; SCHIMIDT, K.A.; DUBIELZIG, R.R. Case Report: Keratoconjunctivitis associated with *Toxoplasma gondii* in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v.12, n.1, p. 56 – 60, 2009.

TENTER, A.M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 364 – 369, 2009.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12 – 13, p. 1217 – 1258, 2000.

TOWNSED, W.M. Canine and feline uveitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 323 – 346, 2008.

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

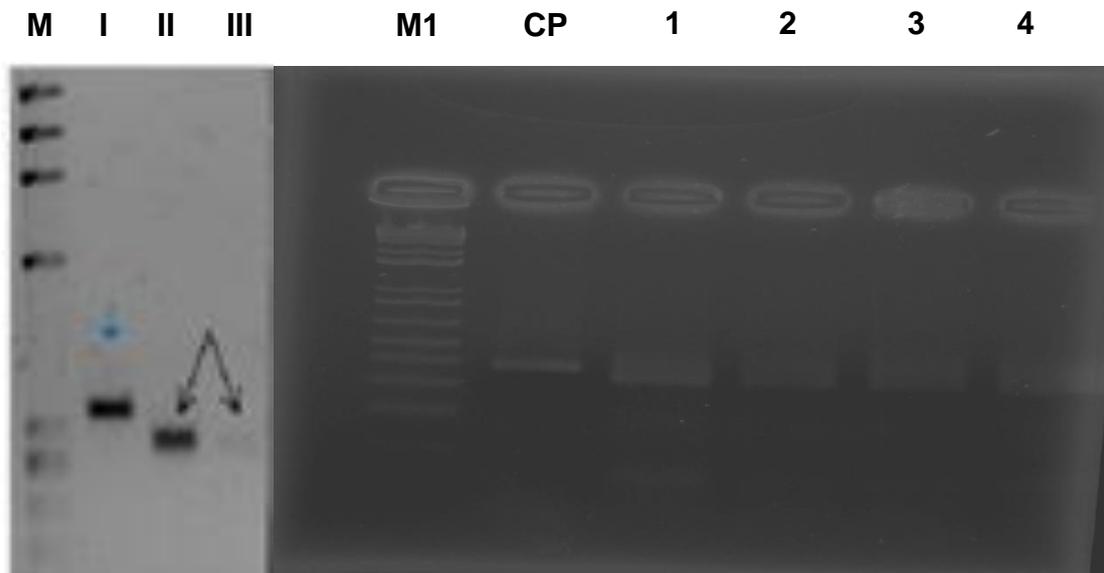
VIDOTTO, O. Toxoplasmose: Epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v.13, n. 1, p. 69 – 75, 1992.

YAN, C.; FU, L.; YUE, C.; TANG, R.; LIU, Y.; LIAN LV; SHI, N.; ZENG, P.; ZHANG, P.; WANG, D.; ZHOU, D.; ZHU, X.; ZHENG, K. Stray dogs as indicators of *Toxoplasma gondii* distributed in the environment: the first report across an urban-rural gradient in China. **Parasites & Vectors**, v.5, p. 1 – 6, 2012.

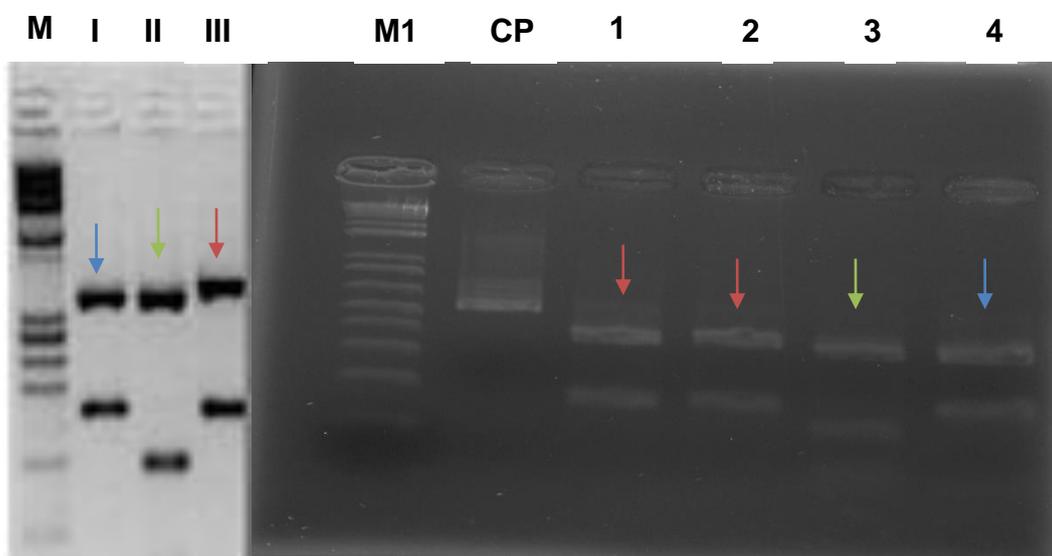
ZUKUROV, J.P.L. **Princípio da PCR: polymerase chain reaction**. Disponível em: [http://www.biomolweb.kit.net/pages\\_html/pcr.html](http://www.biomolweb.kit.net/pages_html/pcr.html)>. Acesso em: março de 2014.

ZULPO, D.L.; LEITE, J.H.A.C.; CUNHA, I.A.L.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; JÚNIOR, V.E.C.; SANTOS, H.L.E.P.L.; GARCIA, J.L. Occurrence of anti-*leishmania* spp., *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs sera from Veterinary Hospital from Universidade Estadual de Londrina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1897 – 1906, 2012.

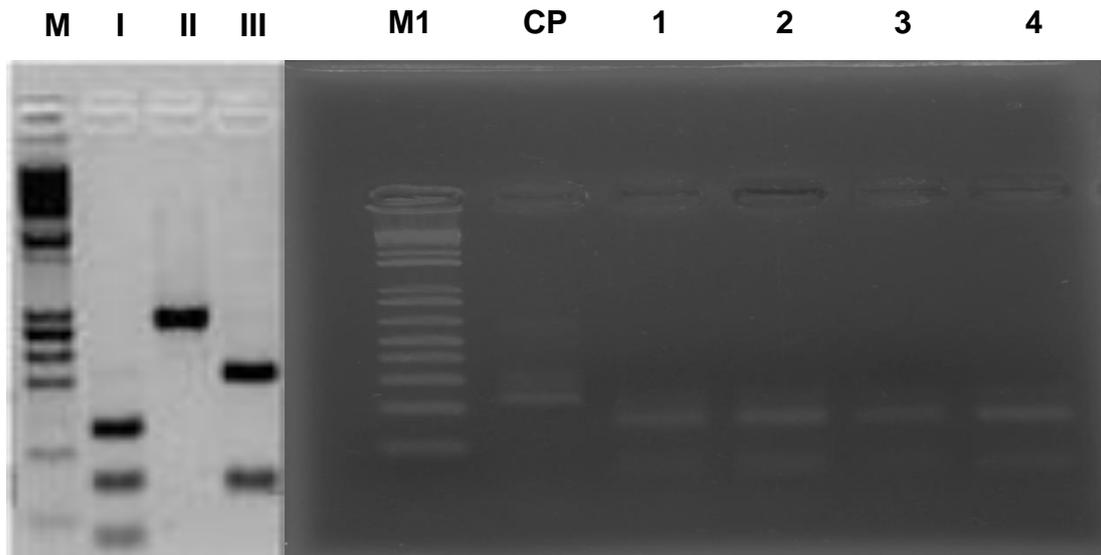
## ANEXO



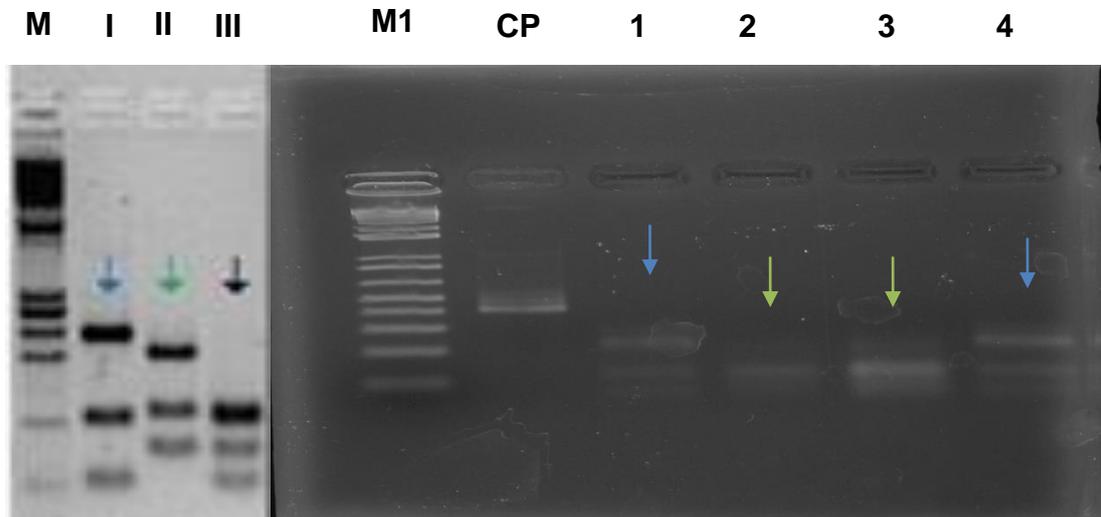
**Figura 05.** Fragmentos de restrição para o **locus SAG1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas *Sau96I* e *HaeIII* dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/*HaeIII*; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo I.



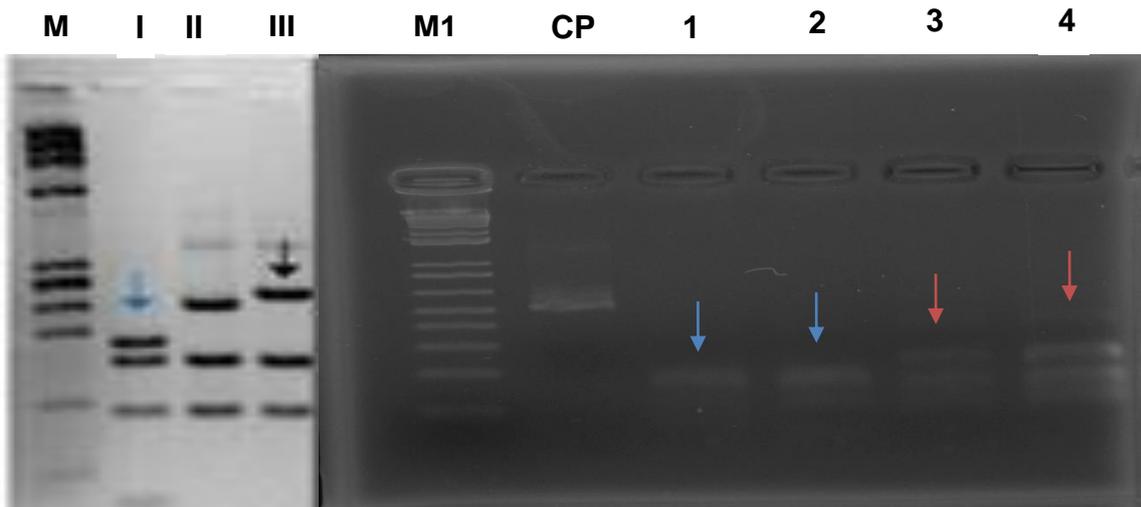
**Figura 06.** Fragmentos de restrição para o **locus SAG2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas *HinfI* e *TaqI* dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/*HaeIII*; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo II; **setas vermelhas**, fragmentos de alelo característico de alelo tipo III.



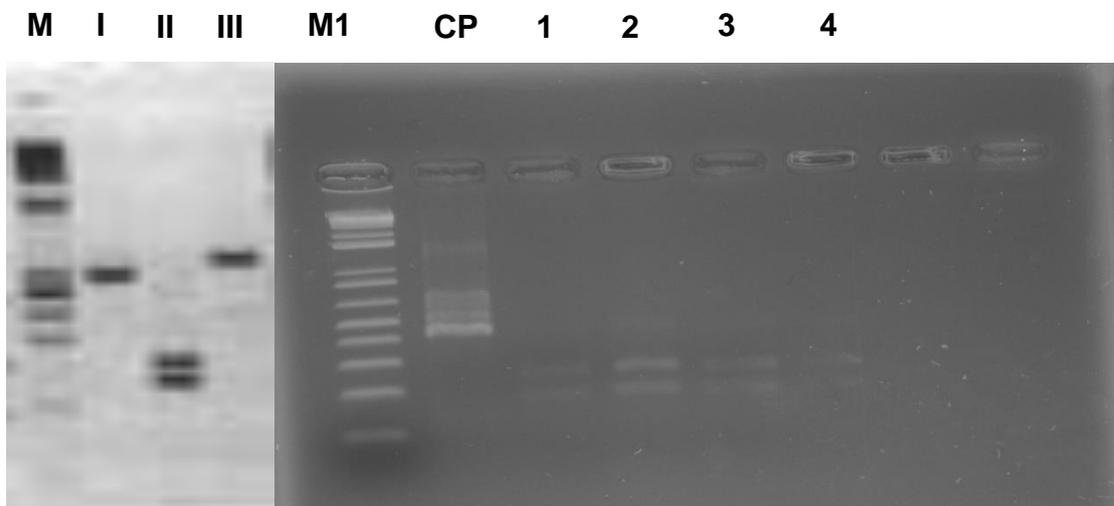
**Figura 07.** Fragmentos de restrição para o **locus SAG3** de *Toxoplasma gondii* após digestão com a enzima NciI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo III.



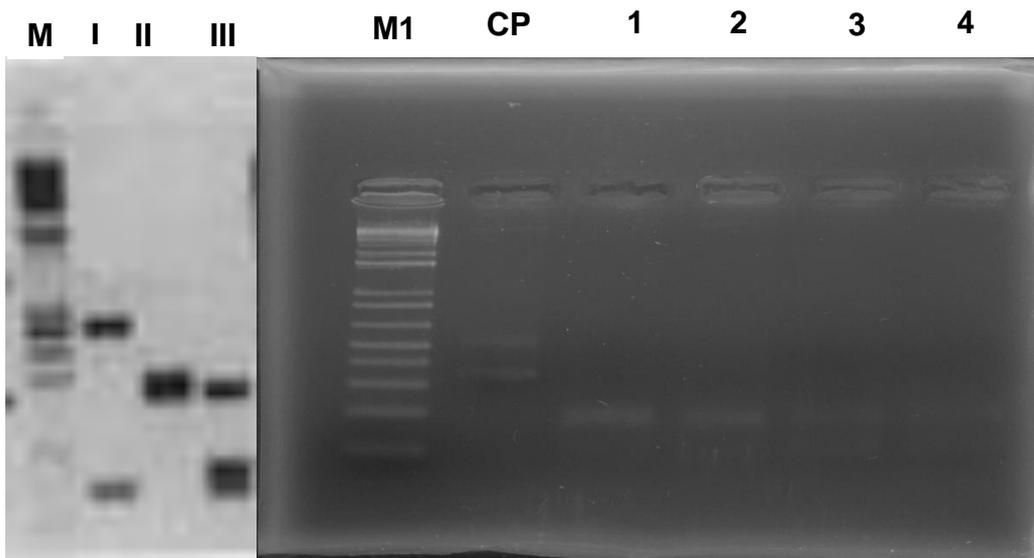
**Figura 08.** Fragmentos de restrição para o **locus BTUB** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsiEI e TaqI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis** fragmentos característicos de alelo tipo I, **setas verdes**, fragmentos característicos de alelo tipo II.



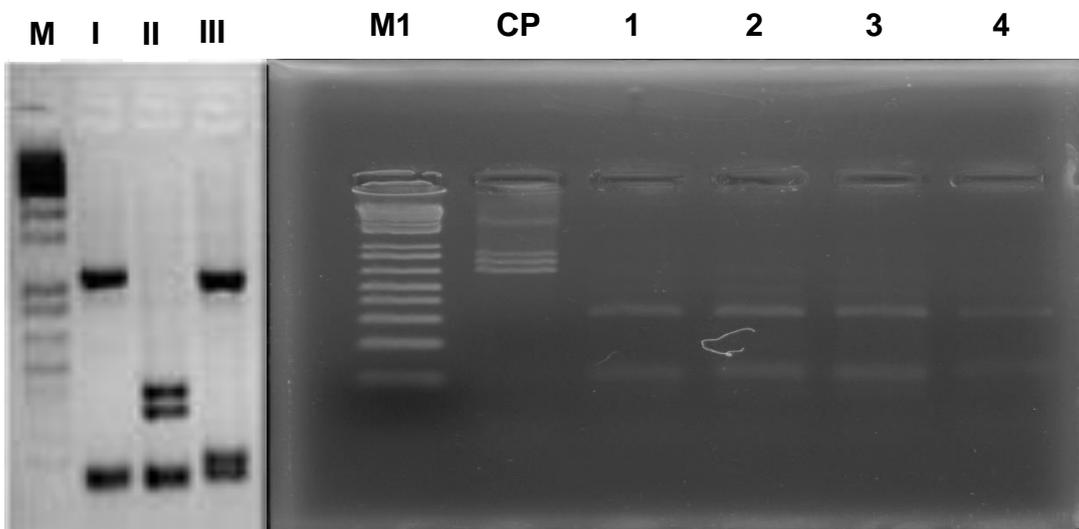
**Figura 09.** Fragmentos de restrição para o **locus c22-8** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas BsmAI e MbolI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo atípico.



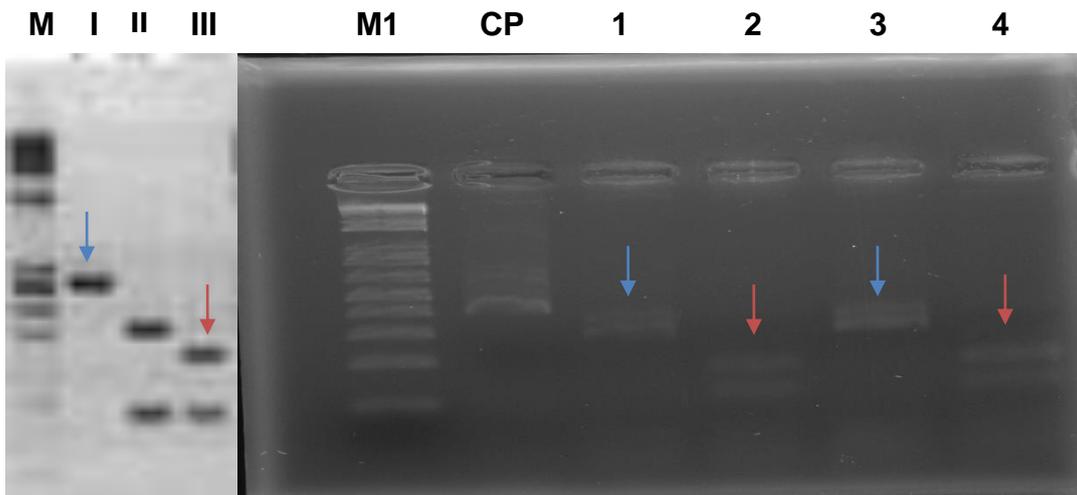
**Figura 10.** Fragmentos de restrição para o **locus c29-2** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas HpyCH4IV e RsaI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo II.



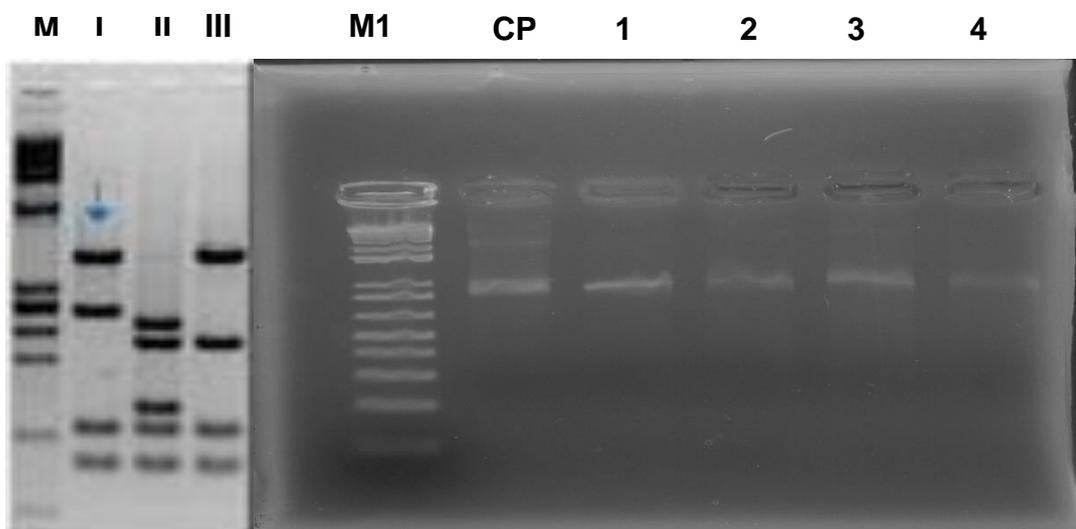
**Figura 11.** Fragmentos de restrição para o **locus GRA6** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas MseI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo III.



**Figura 12.** Fragmentos de restrição para o **locus APICO** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas AflII e DdeI dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/Hae III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21, possuindo fragmentos característicos de alelo tipo I.



**Figura 13.** Fragmentos de restrição para o locus **L358** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas *MseI* dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/*Hae* III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000 pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21; **setas azuis**, fragmentos característicos de alelo tipo I; **setas vermelhas**, fragmentos característicos de alelo tipo III.



**Figura 14.** Fragmentos de restrição para o locus **PK1** de *Toxoplasma gondii* após digestão com as enzimas *AvaI* e *RsaI*, porém não houve digestão do controle positivo e dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21. **M**, marcador molecular Phix174/*Hae* III; **I**, **II** e **III**, DNAs referência tipos I, II e III; **M1**, marcador molecular com 1000pb; **CP**, controle positivo; **1 a 4** DNA dos isolados TgDgBr6, 13, 17 e 21.